

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991290 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2017.12.21

(51) Int. Cl. *A61K 49/14* (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ И ИММУННЫХ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ
ЭКСПРЕССИИ PD-L1

(31) 62/438,575; 62/519,534

(32) 2016.12.23; 2017.06.14

(33) US

(86) PCT/US2017/068025

(87) WO 2018/119313 2018.06.28

(71) Заявитель:
ДЗЕ ДЖОНС ХОПКИНС
ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
Ниммагада Сридхар, Помпер
Мартин Г., Чаттерджи Самит, Лесняк
Войцех Г. (US), Кумар Дхирадж (IN)

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

(57) В качестве раскрываемого объекта изобретения предлагаются композиции, наборы и способы, включающие визуализирующие средства, которые позволяют осуществлять детекцию лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). Раскрытые в настоящем изобретении визуализирующие средства могут применяться для детекции заболеваний и расстройств у субъекта, таких как рак, инфекция и воспаление.

A1

201991290

201991290

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-557671EA/032

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ И ИММУННЫХ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ PD-L1

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В этой заявке испрашивается приоритет предварительных заявок на патент США № 62/438575, зарегистрированной 23 декабря 2016 года, и № 62/519534, зарегистрированной 14 июня 2017 года, содержание которых включено в настоящее изобретение путем ссылок на них.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЛИ РАЗРАБОТКА, ФИНАНСИРУЕМАЯ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА

Это изобретение было создано при государственной поддержке в процессе проведения исследований по гранту NIH R01CA16631, который был предоставлен Национальным институтом здравоохранения США (NIH). Правительство обладает определенными правами на это изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Молекулярная визуализация позволяет получать важную информацию о состоянии иммунного микроокружения опухоли и определять иммунотерапевтические подходы для повышения эффективности применения методов иммуномодуляции. Известно немного средств визуализации, которые могут быстро предоставить информацию об объектах-мишенях иммуномодулирующей терапии.

Иммунотерапия, которая вовлекает собственную иммунную систему пациента в процесс уничтожения раковых клеток, играет центральную роль при лечении различных типов рака (Topalian et al., 2016). Несмотря на то, что уже достигнуты значительные терапевтические эффекты, многие типы рака не реагируют на иммуномодулирующую терапию. Существующая сопутствующая диагностика, при которой используют методы иммуногистохимии (IHC), дает только моментальный снимок окружающей опухоль динамической иммунной среды и часто не позволяет точно предсказать эффект лечения (Mansfield and Dong, 2016). Неинвазивные методы визуализации дают возможность получать в

режиме реального времени количественную оценку биологической природы опухоли и проводить целенаправленную разработку лекарственных средств (Willmann et al., 2008).

Позитронно-эмиссионная томография (PET), наиболее известный молекулярный и количественный метод трансляционной визуализации, применяется для периодически повторяющегося измерения общей экспрессии мишени во всех очагах поражения у данного пациента. Молекулярно нацеленные меченые вещества для использования в PET, такие как [^{18}F]фторэстрадиол (^{18}F -FES), для обнаружения положительного по эстрогеновому рецептору (ER) рака молочной железы, позволяют предсказать результат лечения и выживаемость без прогрессирования заболевания (Peterson et al., 2008 и Linden et al., 2006). Меченые вещества для использования в PET, а также визуализирующие средства для других методов визуализации, включающих, но этим не ограничивая, магнитно-резонансную томографию (MRI), флуоресцентную визуализацию, ближнюю инфракрасную (NIR) визуализацию, фотоакустическую визуализацию и рамановскую визуализацию, которые могут обеспечить быструю и в реальном режиме времени оценку экспрессии мишени, имеющей отношение к иммуномодулирующей терапии, могли бы обеспечить значительный положительный эффект при проводимых в настоящее время клинических испытаний.

Лиганд 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) представляет собой белок иммунной контрольной точки, сверхэкспрессирующийся при некоторых типах рака, и он способствует подавлению иммунитета опухоли. Экспрессия PD-L1 в опухоли служит признаком ответа опухоли на терапию, нацеленную на PD-1 и PD-L1. Было показано, что радиоактивно меченные антитела против PD-L1 могут быть использованы для неинвазивной оценки экспрессии PD-L1 в ксенотрансплантатах опухолей человека и на моделях сингенных опухолей (Heskamp et al., 2015; Maute et al., 2015; Chatterjee et al. al., 2016; Deng et al., 2016; Hettich et al., 2016; Josefsson et al., 2016). Несмотря на то, что конъюгаты радиоактивно меченых антител все чаще используются для визуализации опухолеспецифических белков, тем не менее, для увеличения контраста и выявления очага поражения требуется более

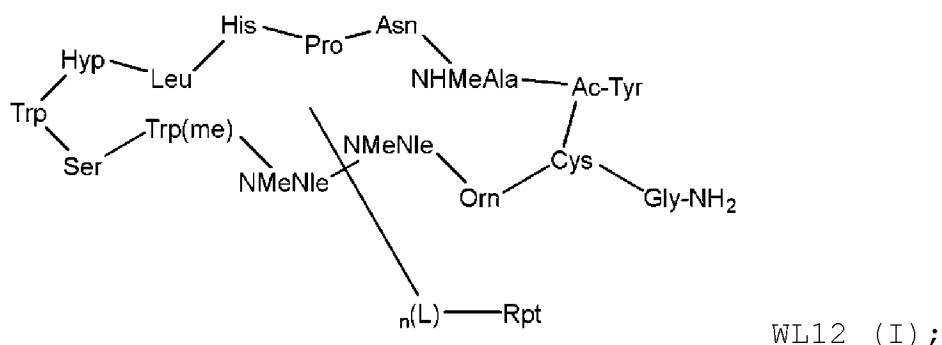
длительное время их выведения (до нескольких дней) (Pandit-Taskar et al., 2015; Oosting et al., 2016).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагается визуализирующее средство, включающее конъюгат пептида, обладающего специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), и репортерный фрагмент, и, необязательно, линкер, где линкер, в случае его присутствия, соединяет пептид и репортерный фрагмент, и, в случае отсутствия линкера, репортерный фрагмент присоединен непосредственно к пептиду через первичный амин аминокислоты пептида. В других аспектах, репортерный фрагмент, например, непосредственно вводят в пептид, где репортерный фрагмент включает меченную радиоактивным изотопом аминокислоту пептида, такую как меченный радиоактивным изотопом йодтирозин или фтортирозин.

В конкретных аспектах, пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, взаимодействует с аминокислотами Y56, E58, A113, M115 и Y123 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1).

В некоторых аспектах, пептид представляет собой WL12, и визуализирующее средство представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из формулы (I), формулы (II) и формулы (III):



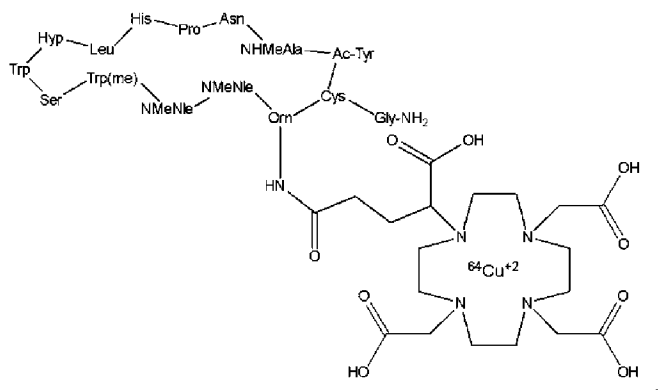
DK-A-221- (L)_n-Rpt (II) или

DK-A-222- (L)_n-Rpt (III);

где n представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0 и 1; L представляет собой линкер; и Rpt представляет собой репортерный фрагмент; и где репортерный

фрагмент или линкер, в случае его присутствия, присоединены к первичной аминогруппе аминокислоты пептида, включающего визуализирующее средство формулы (I), формулы (II) или формулы (III).

В конкретных аспектах, соединение формулы (I) представляет собой WL12 DOTA:



В других аспектах, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагается способ визуализации для детекции лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), где способ включает: (а) обеспечение эффективного количества визуализирующего средства, включающего конъюгат пептида, обладающего специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), и репортерный фрагмент, и, необязательно, линкер, где линкер, в случае его присутствия, соединяет пептид и репортерный фрагмент, и, в случае отсутствия линкера, репортерный фрагмент присоединен непосредственно к пептиду через первичный амин аминокислоты пептида; (b) контактирование одной или более клеток или тканей с визуализирующим средством; и (с) создание изображения для детекции PD-L1. В конкретных аспектах, визуализирующее средство представляет собой соединение формулы (I) или пептид, который взаимодействует с Y56, E58, A113, M115 и Y123 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1).

В некоторых аспектах, раскрытые визуализирующие средства могут быть применены для детекции заболеваний и расстройств, таких как рак, инфекция и воспаление, у субъекта.

В еще одних аспектах, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагается набор реагентов для детекции лиганда 1

белка программируемой смерти клеток (PD-L1), где набор реагентов включает визуализирующее средство, включающее конъюгат пептида, обладающего специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), и репортерный фрагмент, и, необязательно, линкер, где линкер, в случае его присутствия, соединяет пептид и репортерный фрагмент, и, в случае отсутствия линкера, репортерный фрагмент присоединен непосредственно к пептиду через первичный амин аминокислоты пептида.

Изложенные выше конкретные аспекты раскрытого объекта настоящего изобретения полностью или частично рассмотрены путем обсуждения раскрытого объекта настоящего изобретения, другие аспекты станут очевидными в процессе дальнейшего знакомства с описанием изобретения в сочетании с сопровождающими примерами и фигурами, описанными более подробно ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Поэтому, после описания раскрытого объекта настоящего изобретения в общих чертах, далее будут даны разъяснения относительно сопровождающих фигур, которые не обязательно изображены в масштабе.

На фигуре 1A, фигуре 1B и фигуре 1C показано WL12 связывание с PD-L1. На фигуре 1A приведено структурное представление WL12 и его аналогов и аминокислотная последовательность WL12 (WL12 аминокислотная последовательность=цикло-(-Ac-Tyr-NMeAla-Asn-Pro-His-Leu-Hyp-Trp-Ser-Trp(метил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂). На фигуре 1B показан предполагаемый способ связывания WL12 с PD-L1. WL12 образует подобную бета-складчатому слою структуру в бороздке PD-L1. WL12 изображен в голубом цвете. Представление поверхности PD-L1 изображено в сером цвете, с ленточками и ключевыми боковыми цепями, изображенными в пурпурном цвете. И на фигуре 1C показано, что WL12 имитирует PD-1 связывание с PD-L1. Структура PD-1 изображена в бирюзовом цвете. Две главные взаимодействующие бета-стяжки PD-1 хорошо совпадают с конформацией, принимаемой WL12, связанным с PD-L1.

На фигуре 2 приведен спектр кругового дихроизма в далекой ультрафиолетовой области для пептида WL12.

На фигуре 3 приведен масс-спектр WL в режиме электрораспылительной ионизации (ESI). Теоретическая химическая формула: $C_{91}H_{128}N_{22}O_{20}S_2$. Наблюдаемая величина m/z : 1882,7 - $(M+1)^{+1}$, 941,9 - $(M+2)^{+2}/2$. Рассчитанная величина: 1882,19.

На фигуре 4 показана очистка WL12D методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC).

На фигуре 5 приведен масс-спектр PDL1-PD в режиме низкого разрешения. Теоретическая химическая формула: $C_{91}H_{128}N_{22}O_{20}S_2$. Точная масса: 2339,14. Молекулярная масса: 2340,65. Наблюдаемая величина m/z : 2340,9 - $(M+1)^{+1}$, 1171,1 - $(M+2)^{+2}/2$ и 781,1 - $(M+2)^{+3}/3$.

На фигуре 6 показана очистка $[PDL1-PD-Cu^{2+}]$ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC).

На фигуре 7 приведен масс-спектр комплекса $[PDL1-PD-Cu^{2+}]$ в режиме низкого разрешения. Теоретическая химическая формула: $C_{110}H_{156}N_{26}O_{29}S$. Точная масса: 2400,05. Молекулярная масса: 2402,18. Наблюдаемая величина m/z : 2402,6 - $(M+1)^{+1}$, 1201,9 - $(M+2)^{+2}/2$.

На фигуре 8А, фигуре 8В и фигуре 8С показано *in vitro* определение характеристики связывания PD-L1 с пептидом WL12. На фигуре 8А приведены результаты исследования конкурентного ингибирования, демонстрирующие аффинность аналогов WL12 при ингибировании взаимодействия PD-1:PD-L1. На фигуре 8В приведены гистограммы проточной цитометрии клеточных линий, используемых для *in vitro* исследований, демонстрирующие переменную экспрессию PD-L1. И на фигуре 8С показано, что $[^{64}Cu]WL12$ характеризуется повышенным связыванием с клетками с высокой экспрессией PD-L1, которая может быть блокирована избытком пептида (PEP).

На фигуре 9 показана характерная кривая PD-L1 связывания с PD-1; $K_D = 69,66 \pm 11,65$ нМ (95% CI 44,82-94,48 нМ).

На фигуре 10 показана характерная кривая ингибирования PD-L1 связывания с PD-1 с комплексом WL12D- Cu^{2+} ; $IC_{50} = 2,97$ нМ (95%

CI 2,17 - 40,5 нМ), $K_i=1,38$ нМ (95% CI 1,01-1,89 нМ).

На фигуре 11 приведены хроматограммы высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) радиоизотопного индикатора [^{64}Cu]WL12 (красный цвет) и "холодного" комплекса WL12- Cu^{2+} .

На фигуре 12 приведены хроматограммы высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) смеси PDL1-PD и [PDL1-PD- Cu^{2+}].

На фигуре 13 приведены средние значения интенсивности флуоресценции различных клеточных линий, используемых для исследования усвоения.

На фигуре 14 показана корреляция между средними значениями интенсивности флуоресценции (MFI) клеточной линии и %ID.

На фигуре 15A и фигуре 15B продемонстрирована быстрая *in vivo* детекция экспрессии PD-L1 в опухоли с помощью [^{64}Cu]WL12. NSG мышам с hPD-L1 опухолями (красная стрелка) и CHO опухолями (голубая стрелка) вводили внутривенно 150 мкКи [^{64}Cu]WL12, и через 10, 30, 60 и 120 минут после инъекции радиоизотопного индикатора получали изображения. На фигуре 15A приведены изображения поперечного сечения (наверху) и 3D объемного рендеринга (внизу), демонстрирующие специфическое накопление [^{64}Cu]WL12 в hPD-L1 опухолях. И на фигуре 15B показано, что PD-L1 ИHC демонстрирует сильную иммунологическую реактивность (коричневый цвет) в hPD-L1 опухолях.

На фигуре 16 показано специфическое поглощение [^{64}Cu]WL12 в hPD-L1-опухолях у NSG мышей. Характерное изображение NSG мыши, несущей hPD-L1 опухоль и CHO опухоль, которой инъецировали [^{64}Cu]WL12, через 24 часа после инъекции радиоизотопного индикатора, полученное с помощью позитронно-эмиссионной томографии - компьютерной томографии (PET-CT) с использованием метода объемного рендеринга. Повышенное поглощение в hPD-L1 (красная стрелка) опухоли по сравнению с CHO (голубая стрелка) опухолью подтверждает PD-L1 опосредованное поглощение

радиоизотопного индикатора.

На фигуре 17 приведены данные *ex vivo* исследования биораспределения [^{64}Cu]WL12 у NSG мышей с hPD-L1 опухолями и CHO опухолями. NSG мышам вводили внутривенно 20 мкКи [^{64}Cu]WL12, и собирали ткани через 60 и 120 мин после введения. Для исследований блокирования, мыши получали избыток пептида (per) с инъекцией радиоизотопного индикатора.

На фигуре 18A, фигуре 18B и фигуре 18C показано: (фигура 18A) структура конъюгата WL12-IR800CW (химическая формула: $\text{C}_{137}\text{H}_{177}\text{N}_{24}\text{O}_{34}$, молекулярная масса: 2864,34), (фигура 18B) хроматограмма высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) WL12-IR800CW со спектром в ультрафиолетовой и видимой области (UV-Vis), зарегистрированным под пиком (обозначено стрелкой), указывающие на конъюгацию красителя с пептидом; и (фигура 18C) ESI-MS масс-спектр конъюгата WL12-IR800CW, коррелирующий с ожидаемой молекулярной массой.

На фигуре 19A, фигуре 19B и фигуре 19C показана оценка WL12-IR800CW у мышей, несущих CHO и hPDL1 опухоли: (фигура 19A) характерные изображения мыши, которой инъецировали 5 нмоль WL12-IR800CW, и *ex vivo* органов, зарегистрированные через 24 часа после инъекции конъюгата, (фигура 19B, блокирование) характерные изображения мыши, которой инъецировали 25 нмоль немодифицированного WL12 и 5 нмоль WL12-IR800CW, полученные через 24 часа после инъекции (pi); и (фигура 19C) количественная *ex vivo* оценка биораспределения WL12-IR800CW в выбранных органах и опухолях, полученных у мышей, подвергнутых обработке с помощью 1 нмоль, 3 нмоль и 5 нмоль конъюгата и блокированию с помощью WL12 (цифра обозначает соответствующие органы, n=4).

На фигуре 20A, фигуре 20B, фигуре 20C и фигуре 20D показано, что поглощение [^{111}In]атезолизумаба в ксенотрансплантатах немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и трижды негативного рака молочной железы (TNBC) человека совершенно не зависит от экспрессии. (A) Анализ методом проточной цитометрии различных клеточных линий TNBC и NSCLC, показывающий изменяющуюся экспрессию PD-L1; (B) связывание [^{111}In]AtzMab с линиями раковых

клеток зависит от экспрессии PD-L1; (C) повышенное поглощение [^{111}In]AtzMab в ксенотрансплантатах PD-L1high MDAMB231 TNBC по сравнению с PD-L1low SUM149; и (D) повышенное поглощение [^{111}In]AtzMab в ксенотрансплантатах PD-L1high H2444 NSCLC по сравнению с PD-L1low H1155. Показана соответствующая гистология. Из публикации Chatterjee, et al., Oncotarget, 2016.

На фигуре 21A, фигуре 21B, фигуре 21C и фигуре 21D показано, что [^{64}Cu]WL12-PET позволяет осуществлять детекцию накопления AtzMab в опухолях. (A) Изображение [^{64}Cu]WL12 во всем теле указывает на специфическое накопление радиоактивности на hPD-L1 опухолях через 60 минут после инъекции (p.i.); (B) поглощение [^{64}Cu]WL12 значительно снижается в hPD-L1 опухолях у мышей, получающих дозу AtzMab 20 мг/кг за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора; (C) соответствующие исследования биораспределения, подтверждающие потенциальную возможность применения [^{64}Cu]WL12 для детекции взаимодействия AtzMab PD-L1 в опухолях; и (D) WL12 ингибирует связывание AtzMab с PD-L1. Клетки hPD-L1, инкубированные с последовательными разведениями WL12, окрашивали с помощью Cy5-AtzMab или с помощью производимого фирмой BD антитела BD-MIN1-PE. Графическая зависимость средней величины интенсивности флуоресценции (MFI) относительно концентрации пептида дает величину IC_{50} , равную 2,5 нМ и 37,8 нМ для Cy5-AtzMab и BD-MIN1-PE, соответственно.

На фигуре 22 показано, что [^{64}Cu]WL12-PET позволяет осуществлять детекцию накопления AtzMab в ксенотрансплантатах трижды негативного рака молочной железы. Поглощение [^{64}Cu]WL12 значительно снижается в опухолях MDAMB231 у мышей, получающих дозу AtzMab 20 мг/кг за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора.

На фигуре 23A, фигуре 23B и фигуре 23C представлены (A) структура конъюгата WL12-IR800 (химическая формула: $\text{C}_{137}\text{H}_{177}\text{N}_{24}\text{O}_{34}$, молекулярная масса: 2864,34); (B) хроматограмма высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) WL12-IR800 со спектром в ультрафиолетовой и видимой области (UV-Vis), зарегистрированным под пиком (обозначено стрелкой), указывающие на конъюгацию красителя с пептидом; и (C) ESI-MS масс-спектр

конъюгата WL12-IR800, коррелирующий с ожидаемой молекулярной массой.

На фигуре 24А, фигуре 24В и фигуре 24С показана оценка WL12-IR800 у мышей, несущих CHO и hPDL1 опухоли: (А) характерные изображения мыши, которой инъецировали 5 нмоль WL12-IR800, и *ex vivo* органов, зарегистрированные через 24 часа после инъекции конъюгата; (В, блокирование) характерные изображения мыши, которой инъецировали 25 нмоль немодифицированного WL12 и 5 нмоль WL12-IR800, полученные через 24 часа после инъекции (pi); и (С) количественная *ex vivo* оценка биораспределения WL12-IR800 в выбранных органах и опухолях, полученных у мышей, подвергнутых обработке с помощью 1 нмоль, 3 нмоль и 5 нмоль конъюгата и блокированию с помощью WL12 (цифра обозначает соответствующие органы, n=4).

На фигуре 25А и фигуре 25В приведена оценка [^{68}Ga]WL12 в моделях CHO и CHO-hPDL1 опухолей: (А) изображения, полученные с помощью позитронно-эмиссионной томографии – компьютерной томографии (PET-CT) с использованием метода объемного рендеринга, поглощения [^{68}Ga]WL12 в CHO-hPD-L1 (красная стрелка, высокая экспрессия PD-L1) и в CHO (черная стрелка, низкая экспрессия PD-L1) опухолях (n=3) подтверждают PD-L1 опосредованное поглощение радиоизотопного индикатора; и (В) *ex vivo* анализ биораспределения через 1 час после инъекции [^{68}Ga]WL12 в той же самой модели опухоли. В группах с блокирующей дозой совместно инъецировали 50 микрограмм охлажденного пептида.

На фигуре 26 приведена оценка [^{18}F]WL12 в моделях CHO и CHO-hPDL1 опухолей. (А) изображения, полученные с помощью позитронно-эмиссионной томографии – компьютерной томографии (PET-CT) с использованием метода объемного рендеринга, поглощения [^{18}F]WL12 в CHO-hPD-L1 (красная стрелка, высокая экспрессия PD-L1) и CHO (голубая стрелка, низкая экспрессия PD-L1) опухолях (n=3) подтверждают PD-L1 опосредованное поглощение радиоизотопного индикатора.

На фигуре 27 представлены данные для мышей с MDAMB231 и SUM149 опухолями, которым инъецировали атезолизумаб в дозе 20 мг/кг. Через двадцать часов после дозирования mAb, мышам

инъекции 20 мКи [^{64}Cu]WL12, и проводили исследования по биораспределению через 24 часа после инъекции радиоизотопного индикатора. Данные показывают, что связывание атезолизумаба с PD-L1 в опухолях может быть количественно измерено с помощью [^{64}Cu]WL12.

На фигуре 28 показано определение дозозависимой занятости PD-L1 для терапевтического антитела атезолизумаба против PD-L1. Мышам с опухолью молочной железы MDAB231 инъекции в различных дозах атезолизумаба, и через 24 часа мышам инъекции [^{64}Cu]WL12, и проводили исследование биораспределения через 2 часа после инъекции радиоизотопного индикатора. Данные показывают, что накопление [^{64}Cu]WL12 в опухолях снижается с увеличением дозы антитела.

На фигуре 29 приведены изменения в зависимости от времени и дозы занятости PD-L1 атезолизумабом, измеренные с помощью [^{64}Cu]WL12. Мышам, несущим опухоль MDAMB231, вводили атезолизумаб в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг. Через 24 или 120 часов после дозирования mAb, мышам инъекции [^{64}Cu]WL12, и измеряли накопление радиоактивности в опухоли путем проведения исследований по биораспределению. Как и ожидалось, при дозе 10 мг/кг наблюдалась полное блокирование PD-L1 как через 24 часа, так и через 120 часов. В то время как при дозе 1 мг/кг, повышенное накопление [^{64}Cu]WL12 можно наблюдать через 120 часов, но не после 24 часов, что позволяет сделать предположение о вымывании атезолизумаба из опухоли с течением времени при использовании низких доз mAb. Эти данные дают основания предположить, что использование раскрытых в настоящем изобретении пептидов позволяет анализировать терапевтическое время удерживания mAb в PD-L1 опухоли.

На фигуре 30 приведены химические структуры DK-A-221 и DK-A-222.

На фигуре 31A и фигуре 31B приведены данные, относящиеся к PD-L1 связывающему пептиду DK222. NOTA конъюгированный DK222 синтезировали и оценивали на мышах, несущих CHO/CHO-HPD-L1 опухоли. Изображения (A) и данные по биораспределению (B) демонстрируют исключительно высокие фармакокинетические свойства

[⁶⁴Cu]DK222.

На фигуре 32 представлено биораспределение [⁶⁴Cu]DK222 у NSG мышей, несущих CHO/CHO-hPD-L1 опухоли.

На фигуре 33А, фигуре 33В и фигуре 33С показано, что WL12 ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1 терапевтическими средствами *in vitro*. На фигуре 33А показано, что режим связывания WL12 с PD-L1 (зеленый и бирюзовый цвет) накладывается на режим связывания PD-1 с AtzMab (красный и бирюзовый цвет), с AveMab (оранжевый и бирюзовый цвет) и с DurMab (голубой и бирюзовый цвет). Невзаимодействующие остатки показаны серым цветом. Разнообразие контактов, охватывающих совместно используемую область связывания (бирюзовый цвет), иллюстрирует многообразие механизмов связывания различных терапевтических mAbs. На фигуре 33В показано, что WL12 ингибирует Cy5-конъюгированный-AtzMab, AveMab и DurMab в отношении PD-L1, что продемонстрировано путем исследования конкурентного ингибирования. Средние величины интенсивности флуоресценции определяли методом проточной цитометрии. На фигуре 33С показано, что [⁶⁴Cu]WL12 связывание с PD-L1-положительными HCC827, H226, hPD-L1 и MDAMB231 клетками ингибируется в присутствии 60 нМ AtzMab, AveMab и DurMab, при сравнении PBS контролем. Также продемонстрировано [⁶⁴Cu]WL12 связывание в PD-L1-негативными CHO и SUM149 клетками. ****, $P < 0,0001$; NS, статистически незначимо.

На фигуре 34А представлена поверхность молекулы, окружающая поверхность взаимодействия PD-L1 с PD-1. Общие остатки, принимающие участие во взаимодействиях с PD-1 конкурирующими терапевтическими средствами, изображены бирюзовым цветом, молекулярные контакты, специфические для PD-1 взаимодействий, показаны пурпурным цветом, и не взаимодействующие остатки показаны серым цветом. Для иллюстрации наложения при молекулярном взаимодействии, структура связанного PD-1 изображена пурпурным цветом, а предсказанная конформация WL12 изображена серым цветом.

На фигуре 34В показано, что WL12 ингибирует связывание Cy5-конъюгированного PD-1-Fc белка с PD-L1 в hPD-L1 клетках. Средние

величины интенсивности флуоресценции определяли методом проточной цитометрии.

На фигуре 35С показано, что WL12 (5 нМ) ингибирует связывание Cy5-конъюгированного-AtzMab, AveMab и DurMab (2 нМ) с PD-L1 в HCC827 и H226 клетках. Средние величины интенсивности флуоресценции определяли методом проточной цитометрии, и на фигуре 35D приведены средние величины интенсивности флуоресценции, определенные методом проточной цитометрии, из фигуры 34В и фигуры 35С.

На фигуре 35А, фигуре 35В, фигуре 35С, фигуре 35D, фигуре 35Е, фигуре 35F, фигуре 35G, фигуре 35Н и фигуре 35I продемонстрировано, что PD-L1 захват с помощью PD-L1 mAbs количественно оценивается в опухоли с использованием [^{64}Cu]WL12 в ксенотрансплантатах с переменной экспрессией PD-L1. На фигурах 35А-35Н показано пониженное поглощение [^{64}Cu]WL12 в H226 (фигура 35А, фигура 35В), HCC827 (фигура 35С, фигура 35D) и hPD-L1/CHO (фигура 35G, фигура 35Н) ксенотрансплантатах у мышей, подвергнутых обработке с помощью 20 мг/кг AtzMab за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора, по сравнению с контролями, подвергнутыми обработке с помощью физиологического раствора. Изображения [^{64}Cu]WL12, полученные с помощью позитронно-эмиссионной томографии - компьютерной томографии (PET-CT) с использованием метода объемного рендеринга (фигура 35А, фигура 35D, фигура 35G) и *ex vivo* биораспределение (фигура 35В, фигура 35Е, фигура 35Н). На фигуре 35С, фигуре 35F и фигуре 35I показано иммуногистохимическое (IHC) окрашивание для PD-L1, которое показано для соответствующей опухоли ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; NS, статистически незначимо.

На фигуре 36А, фигуре 36В, фигуре 36С и фигуре 36D представлена экспрессия PD-L1 в различных клеточных линиях и соответствующие средние величины интенсивности флуоресценции. На фигуре 36В, фигуре 36С и фигуре 36D приведено *Ex vivo* биораспределение [^{64}Cu]WL12 у мышей, несущих H226 (В), HCC827 (С) или hPD-L1/CHO (D) опухоли, которые получали дозу AtzMab 20 мг/кг за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора.

Приведенные данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения. ****, $P < 0,0001$; ***, $P < 0,001$; NS, статистически незначимо.

На фигуре 37А, фигуре 37В, фигуре 37С, фигуре 37D, фигуре 37Е и фигуре 37F продемонстрированы динамические изменения экспрессии PD-L1 в опухоли и его взаимодействие при воздействии AtzMab, при детекции с использованием [^{64}Cu]WL12. На фигуре 37А показана повышенная экспрессия PD-L1 на поверхности клетки в случае клеток A549-iPDL1, подвергнутых обработке с помощью доксициклина в течение 6 часов и 72 часов. Гистограмма проточной цитометрии. На фигуре 37В показано, что WL12 ингибирует (5 нМ) связывание Cy5-conjugated-AtzMab, AveMab и DurMab (2 нМ) с клетками A549-iPD-L1, подвергнутыми обработке с помощью доксициклина в течение 72 h. На фигуре 37С показано, что [^{64}Cu]WL12 связывание с клетками A549-iPDL1 (72 часа доксициклин) значительно снижается в присутствии 60 нМ AtzMab, по сравнению с контролями. На фигуре 37D и фигуре 37Е показано, что поглощение [^{64}Cu]WL12 в ксенотрансплантатах A549-iPDL1 значительно меньше у мышей, которым вводят внутривенно AtzMab за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора, по сравнению с контролями, которым вводят физиологический раствор, и аналогично исходным ксенотрансплантатам A549. Изображения всего тела, полученные с помощью позитронно-эмиссионной томографии – компьютерной томографии (PET-CT) с использованием метода объемного рендеринга (D), и *ex vivo* количественная оценка (фигура 37Е). На фигуре 37F показано иммуногистохимическое (IHC) окрашивание для PD-L1 в соответствующей опухоли. ****, $P < 0,0001$; NS, статистически незначимо.

На фигуре 38 показано *ex vivo* биораспределение [^{64}Cu]WL12 у мышей, несущих A549-iPDL1 и A549 контрольную опухоль, которым вводили доксициклин в течение 72 часов и подвергали обработке с помощью 20 мг/кг AtzMab за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора. ****, $P < 0,0001$; NS, статистически незначимо.

На фигуре 39А, фигуре 39В, фигуре 39С, фигуре 39D, фигуре 39Е, фигуре 39F продемонстрировано взаимодействие PD-L1 опухоли

в результате воздействия трех различных PD-L1 терапевтических средств mAbs, количественно оцениваемое с использованием [^{64}Cu]WL12. Фигура 39А - фигура 39Е. Поглощение [^{64}Cu]WL12 в ксенотрансплантате MDAMB231 значительно снижается у мышей, получающих AtzMab (20 мг/кг), AveMab (10 мг/кг) или DurMab (10 мг/кг) за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора. Изображения всего тела мышей, полученные с помощью позитронно-эмиссионной томографии - компьютерной томографии (PET-СТ) с использованием [^{64}Cu]WL12 и метода объемного рендеринга, которые подвергались обработке с помощью физиологического раствора (фигура 39А), AtzMab (фигура 39В), AveMab (фигура 39С), DurMab (фигура 39D), и *ex vivo* биораспределение (фигура 39Е)). На фигуре 39F показано иммуногистохимическое (IHC) окрашивание для PD-L1 в соответствующей опухоли.****, $P < 0,0001$; NS, статистически незначимо.

На фигуре 40 показано *ex vivo* биораспределение [^{64}Cu]WL12 у мышей, несущих опухоль MDAMB231, которые были подвергнуты обработке с помощью AtzMab (20мг/кг), AveMab (10 мг/кг) или DurMab (10 мг/кг) за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора. ****, $P < 0,0001$; NS, статистически не значимо.

На фигуре 41А, фигуре 41В, фигуре 41С, фигуре 41D и фигуре 41Е продемонстрировано влияние дозы и времени на занятость опухоли PD-L1 в результате воздействия AtzMab, количественно оцениваемое с помощью [^{64}Cu]WL12. На фигуре 41А показана зависимость доза-воздействие, отображающая уменьшение свободных лигандов PD-L1 у мышей с опухолями MDA-MB-231 при увеличении дозы AtzMab (мг/кг). Изображения всего тела мышей, полученные с помощью позитронно-эмиссионной томографии - компьютерной томографии (PET-СТ) с использованием [^{64}Cu]WL12, несущих опухоль MDAMB231, которые получали 0,06 мг/кг, 0,6 мг/кг и 3,2 мг/кг AtzMab (фигура 41А). На фигуре 41В и фигуре 41С показана *ex vivo* количественная оценка поглощения [^{64}Cu]WL12 в опухолях мышей, подвергнутых обработке с помощью возрастающих доз AtzMab (от 0,0009 до 24 мг/кг). AtzMab инъецировали за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора (фигура 41В). Процент свободного лиганда PD-L1 рассчитывали относительно медианы величины

свободных лигандов PD-L1, измеренной при 0 мг/кг (фигура 41C). Голубые незакрашенные кружки: измеренные свободные лиганды PD-L1 для каждого уровня дозы у мышей. Красная пунктирная линия: средняя предсказанная на основе модели зависимость доза-эффект. На фигуре 41D и фигуре 41E показано воздействие дозы AtzMab (мг/кг) на занятость опухоли PD-L1 в течение времени, которая характеризуется увеличением свободных лигандов PD-L1 при дозе AtzMab 0,6 или 1 мг/кг, но не при дозе AtzMab 10 или 20 мг/кг, что повторяет нелинейную кинетику для mAb. Изображения всего тела мышей, полученные с помощью позитронно-эмиссионной томографии – компьютерной томографии (PET-CT) с использованием [^{64}Cu]WL12 (D) и *ex vivo* биораспределение (E). ****, $P < 0,0001$; NS, статистически не значимо.

На фигуре 42 показано *ex vivo* биораспределение [^{64}Cu]WL12 у мышей, несущих опухоль MDAMB231, при увеличении дозы AtzMab (от 0,0009 до 12 мг/кг) за 24 часа до инъекции радиоизотопного индикатора.

На фигуре 43 показаны структурное представление DK-A-221 и DK-A-222 и их аналогов, и аминокислотная последовательность DK-A-221 (аминокислотная последовательность DK-A-221=цикло-(-Ac-Tyr-NMeAla-Asn-Pro-His-Glu-Hyp-Trp-Ser-Trp(карбоксиметил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂).

Этот патент или комплект материалов заявки содержит, по меньшей мере, один чертеж, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикация патентной заявки с цветными чертежами будут предоставлены патентным ведомством после запроса и проведения необходимой оплаты.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытый объект настоящего изобретения далее будет описан более подробно в сочетании с сопровождающими фигурами, на которых представлены некоторые, но не все, варианты осуществления раскрытого объекта настоящего изобретения. На протяжении всего описания изобретения, одни и те же номера относятся к одним и тем же элементам. Раскрытый объект настоящего изобретения может быть осуществлен во многих различных формах, и его не следует толковать таким образом, что

он ограничивается изложенными в изобретении вариантами осуществления; напротив, эти варианты осуществления представлены так, чтобы это раскрытие удовлетворяло бы требованиям законодательства. В действительности, специалист в области техники, к которой относится раскрытый объект настоящего изобретения, после ознакомления с описанными выше идеями и относящимся к ним фигурам, может предложить много модификаций и других вариантов осуществления раскрытого объекта настоящего изобретения. Поэтому, следует иметь в виду, что раскрытый объект настоящего изобретения никоим образом не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и подразумевается, что модификации и другие варианты осуществления входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

I. КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ВИЗУАЛИЗИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

В некоторых вариантах осуществления, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагаются высокоспецифические визуализирующие средства для позитрон-эмиссионной томографии (PET) на основе пептида для детекции белка иммунной контрольной точки, такого как PD-L1. Эти визуализирующие средства могут применяться, в частности, для детекции экспрессии PD-L1 опухоли и вскоре после введения их субъекту.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагается визуализирующее средство, включающее конъюгат пептида, обладающего специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), и репортерный фрагмент, и, необязательно, линкер, где линкер, в случае его присутствия, соединяет пептид и репортерный фрагмент, и, в случае отсутствия линкера, репортерный фрагмент присоединен непосредственно к пептиду через первичный амин аминокислоты пептида. В других вариантах осуществления, например, репортерный фрагмент непосредственно вводят в пептид, где репортерный фрагмент включает меченую радиоактивным изотопом аминокислоту пептида, такую как меченые радиоактивным изотопом йодтирозин или фтортирозин.

В некоторых вариантах осуществления, пептид, обладающий специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), может взаимодействовать с четырьмя конкретными аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, пептид может взаимодействовать с аминокислотами Y56, E58, D61 и A113 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В некоторых вариантах осуществления, пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может взаимодействовать с пятью конкретными аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, пептид может взаимодействовать с аминокислотами Y56, E58, A113, M115 и Y123 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В некоторых вариантах осуществления, пептид, который взаимодействует с PD-L1, представляет собой пептид WL12. Пептид WL12 может иметь аминокислотную последовательность цикло-(-Ac-Tyr-NMeAla-Asn-Pro-His-Leu-Hyp-Trp-Ser-Trp(метил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂ (SEQ ID NO.:1). В некоторых вариантах осуществления, WL12 может взаимодействовать с четырьмя аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, WL12 может взаимодействовать с аминокислотами Y56, E58, D61 и A113 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В некоторых вариантах осуществления, WL12 может взаимодействовать с пятью аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, WL12 может взаимодействовать с аминокислотами Y56, E58, A113, M115 и Y123 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В других вариантах осуществления, пептид, который взаимодействует с PD-L1, представляет собой DK-A-221. Пептид DK-A-221 может иметь аминокислотную последовательность цикло-(-Ac-Tyr-NMeAla-Asn-Pro-His-Glu-Hyp-Trp-Ser-Trp(Карбоксиметил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂ (SEQ ID NO.: 2). В некоторых вариантах осуществления, DK-A-221 может взаимодействовать с четырьмя аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, DK-A-221 может

взаимодействовать с аминокислотами Y56, E58, D61 и A113 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В некоторых вариантах осуществления, DK-A-221 может взаимодействовать с пятью аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, DK-A-221 может взаимодействовать с аминокислоты Y56, E58, A113, M115 и Y123 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В других вариантах осуществления, пептид, который взаимодействует с PD-L1, представляет собой DK-A-222. В некоторых вариантах осуществления, DK-A-222 может взаимодействовать с четырьмя аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, DK-A-222 может взаимодействовать с аминокислотами Y56, E58, D61 и A113 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В некоторых вариантах осуществления, DK-A-222 может взаимодействовать с пятью аминокислотами лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1). В конкретных вариантах осуществления, DK-A-222 может взаимодействовать с аминокислотами Y56, E58, A113, M115 и Y123 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1).

В некоторых вариантах осуществления, пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% идентична последовательности SEQ ID NO.: 1. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% идентична последовательности SEQ ID NO.: 2. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 85% идентична последовательности SEQ ID NO.: 1. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 85% идентична последовательности SEQ ID NO.: 2. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична последовательности SEQ ID NO.: 1. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична последовательности SEQ ID NO.: 2. Пептид, обладающий

специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 95% идентична последовательности SEQ ID NO.: 1. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая, по меньшей мере, на 95% идентична последовательности SEQ ID NO.: 2. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая на 100% идентична последовательности SEQ ID NO.: 1. Пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, может иметь последовательность, которая на 100% идентична последовательности SEQ ID NO.: 2.

Общепринятый термин "процент идентичности" относится к сходству между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, определяемому путем сравнения последовательностей. В науке, "идентичность" также означает степень родства последовательностей между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, в зависимости от конкретного случая, которую определяют путем нахождения соответствия между сегментами таких последовательностей. "Идентичность" и "сходство" могут быть легко рассчитаны известными методами, включающими, но этим не ограничивая, методы, описанные в следующих монографиях: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); and Sequence Analysis Primer (Gribbskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991). Предпочтительные методы для определения идентичности позволяют достигать наилучшего совпадения между исследуемыми последовательностями. Методы для определения идентичности и сходства адаптированы для использования в форме общедоступных компьютерных программ. Выравнивание последовательностей и расчеты процента идентичности могут быть осуществлены с использованием программы MegaAlign из

пакета программ для биоинформационных вычислений LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). Множественное выравнивание последовательностей может быть проведено с использованием метода выравнивания Clustal (Higgins and Sharp (1989) *CABIOS*. 5:151-153) с параметрами, принимающими значение по умолчанию, включая параметры по умолчанию для парных выравниваний.

Используемые в изобретении термины "аминокислота" и "остаток" являются взаимозаменяемыми и, применительно к пептиду или полипептиду, относятся как к природным, так и к синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот, миметикам аминокислот и к неприродным аминокислотам, которые с химической точки зрения аналогичны природным аминокислотам.

Термины "природная аминокислота" и "кодируемая в природе аминокислота" используются взаимозаменяемо и относятся к аминокислоте, которая кодируется генетическим кодом, а также к тем аминокислотам, которые кодируются генетическим кодом и которые модифицируют после синтеза, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин.

"Аналог аминокислоты" представляет собой соединение, которое имеет такую же базовую химическую структуру, что и природная аминокислота, то есть, α -углерод, который соединен с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и группой R, например, гомосерином, норлейцином, метионинсульфоксидом или метионинметилсульфониом. Такие аналоги могут иметь модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но будут сохранять ту же самую базовую химическую структуру, что и природная аминокислота.

Термины "неприродная аминокислота" и "некодируемая в природе аминокислота" используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, которое имеет такую же базовую химическую структуру, что и природная аминокислота, но оно не встроено в растущую полипептидную цепь с помощью комплекса трансляции. "Неприродная аминокислота" также включает, но этим не ограничивая, аминокислоты, которые образуются в результате модификации

(например, посттрансляционных модификаций) кодируемой в природе аминокислоты (включающей, но этим не ограничивая, 20 стандартных аминокислот), но они сами не встроены в природе не встроено в растущую полипептидную цепь с помощью комплекса трансляции. Неограничивающий перечень примеров неприродных аминокислот, которые могут быть встроены в полипептидную последовательность или использоваться вместо немутантного остатка в полипептидной последовательности, включает β -аминокислоты, гомоаминокислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты с дериватизированными боковыми цепями. Примеры включают (в L-форме или D-форме; сокращенное обозначение в скобках): цитруллин (Cit), гомоцитруллин (hCit), $N\alpha$ -метилцитруллин (NMcCit), $N\alpha$ -метилгомоцитруллин ($N\alpha$ -MeH^oCit), орнитин (Orn), $N\alpha$ -метилорнитин ($N\alpha$ -MeOrn или NMeOrn), саркозин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hQ), $N\alpha$ -метиларгинин (NMeR), $N\alpha$ -метиллейцин ($N\alpha$ -MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), $N\alpha$ -метилглутамин (NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновую кислоту (Oic), 3-(1-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (IgI), пара-йодфенилаланин (pI-Phe), пара-аминофенилаланин (4AmP или 4-Amino-Phe), 4-гуанидинофенилаланин (Guf), глициллизин (сокращенно "K(N ϵ -глицил)" или "K(глицил)" или "K(gly)"), нитрофенилаланин (nitrophe), аминофенилаланин (aminophe или Amino-Phe), бензилфенилаланин (benzylphe), γ -карбоксиглутаминовую кислоту (γ -carboxyglu), гидроксипролин (hydroxypro), п-карбоксил-фенилаланин (Cpa), α -аминоадипиновую кислоту (Aad), $N\alpha$ -метилвалин (NMeVal), $N\alpha$ -метиллейцин (NMeLeu), $N\alpha$ -метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклогексилглицин (Chg), ацетиларгинин (acetylarg), α, β -диаминопропионовую кислоту (Dpr), α, γ -диаминомасляную кислоту (Dab), диаминопропионовую кислоту (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метил-фенилаланин (MePhe), β, β -дифенил-аланин (BiPhA),

аминомасляную кислоту (Abu), 4-фенил-фенилаланин (или бифенилаланин; 4Bip), α -амино-изомасляную кислоту (Aib), бета-аланин, бета-аминопропионовую кислоту, пиперидиновую кислоту, аминокaproновую кислоту, аминокептановую кислоту, аминокимелиновую кислоту, десмозин, диаминокимелиновую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпаргин, гидроксизин, алло-гидроксизин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилглицин, N-метилизольцин, N-метилвалин, 4-гидроксипролин (Hyp). γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксизин, ω -метиларгинин, 4-амино-O-фталевую кислоту (4APA), N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин, O-фосфотирозин и другие аналогичные аминокислоты, и дериватизированные формы любой из конкретно упомянутых в списке аминокислот.

"Пептид" или "белок" включает стяж, по меньшей мере, из трех аминокислот, связанных вместе пептидными связями. Термины "белок" и "пептид" могут использоваться взаимозаменяемо. Пептид может относиться к индивидуальному пептиду или коллекции пептидов. Кроме того, одна или более из аминокислот в раскрытом в настоящем изобретении визуализирующем средстве могут быть модифицированы, например, путем добавления химического структурного элемента, такого как карбогидратная группа, фосфатная группа, фарнезильная группа, изофарнезильная группа, сульфоксидная группа, группа жирной кислоты, линкер, для конъюгации, функционализации или другой модификации, и другого подобного химического структурного элемента. В некоторых вариантах осуществления, другие модификации могут включать введение D-аминокислот, других молекул, конъюгированных с N-концом и C-концом, конъюгацию флуоресцентных зондов, биомолекул, таких как полиэтиленгликоль, таргетирующих лигандов и других подобных веществ, ретро-инверсию и другие подобные модификации. Ни одна из модификаций не должна оказывать существенного негативного влияния на требуемую биологическую активность пептида.

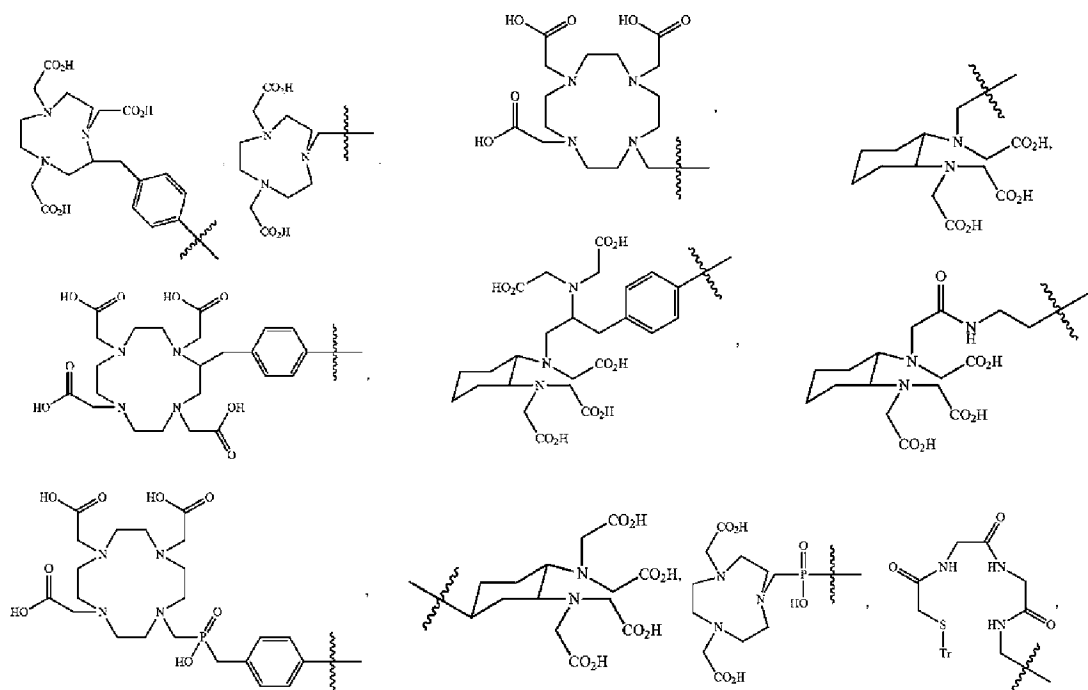
В некоторых вариантах осуществления раскрытого в настоящем изобретении визуализирующего средства, репортерный фрагмент выбирают из группы, состоящей из хелатообразующего средства, меченого радиоактивным изотопом субстрата, флуоресцентного красителя, фотоакустической репортерной молекулы и активной в рамановском спектре репортерной молекулы.

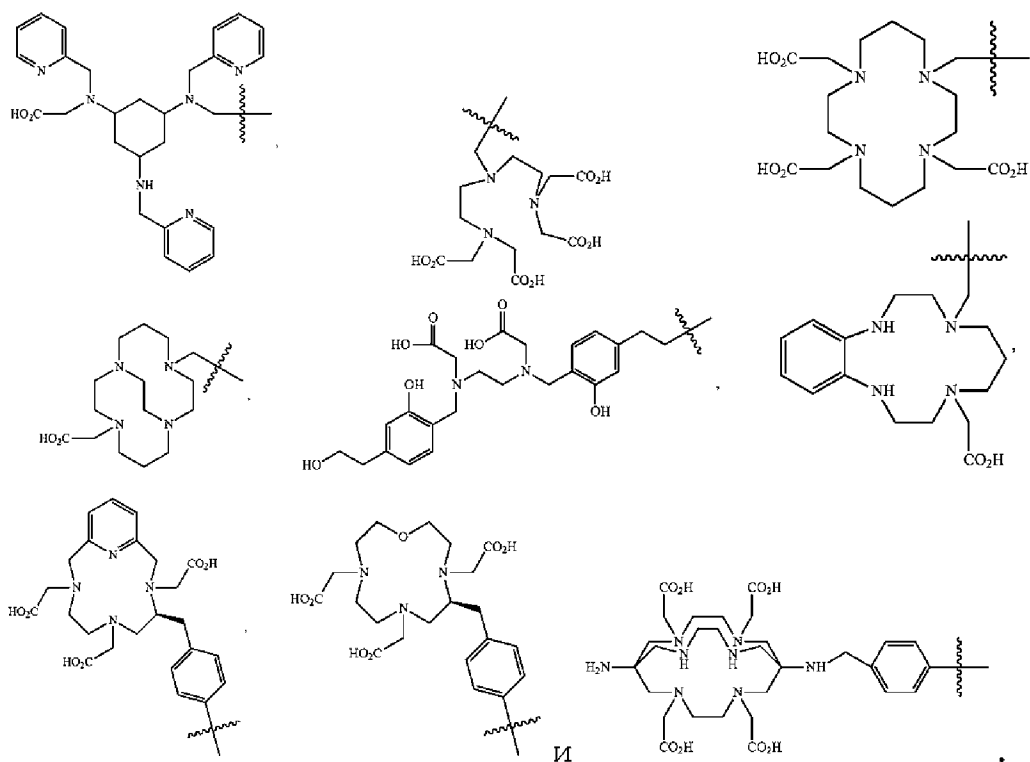
В некоторых вариантах осуществления раскрытого в настоящем изобретении визуализирующего средства, репортерный фрагмент представляет собой хелатообразующее средство, и хелатообразующее средство выбирают из группы, состоящей из DOTAGA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-(глутаровая кислота)-4,7,10-триуксусная кислота), DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), DOTASA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-(2-янтарная кислота)-4,7,10-триуксусная кислота), CB-DO2A (10-бис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазацикло[5.5.2]тетрадекан), DEPA (7-[2-(Бис-карбоксиметиламино)-этил]-4,10-бис-карбоксиметил-1,4,7,10-тетрааза-циклододец-1-ил-уксусная кислота)), Зр-С-DEPA (2-[(карбоксиметил)][5-(4-нитрофенил-1-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]пентан-2-ил)-амино]уксусная кислота)), TCMC (2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7,10-тетрааза-1,4,7,10-тетра-(2-карбамонилметил)-циклододекан), охо-DO3A (1-окса-4,7,10-триазациклододекан-5-S-(4-изотиоцианатобензил)-4,7,10-триуксусная кислота), p-NH₂-Bn-Охо-DO3A (1-окса-4,7,10-тетраазациклододекан-5-S-(4-аминобензил)-4,7,10-триуксусная кислота), TE2A ((1,8-N,N'-бис-(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан), MM-TE2A, DM-TE2A, CB-TE2A (4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазацикло[6.6.2]-гексадекан), CB-TE1A1P (4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1-(метанфосфоновая кислота)-8-(метанкарбоновая кислота), CB-TE2P (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,8-бис(метанфосфоновая кислота), TETA (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота), NOTA (1,4,7-триазациклононан-N,N',N''-триуксусная кислота), NODA (1,4,7-триазациклононан-1,4-диацетат); NODAGA (1,4,7-триазациклононан-1-глутаровая кислота-4,7-уксусная кислота), (NOTAGA) 1,4,7-триазонан-1,4-диил)-диуксусная кислота, DFO (десфероксамин), NETA ([4-[2-(бис-

карбоксиметиламино)-этил]-7-карбоксиметил-[1,4,7]триазонан-1-ил}-уксусная кислота), TACN-TM (N,N',N'', трис(2-меркаптоэтил)-1,4,7-триазаациклононан), Diamsar (1,8-диамино-3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло(6,6,6)эйкозан, 3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло[6.6.6]эйкозан-1,8-диамин), Sarar (1-N-(4-аминобензил)-3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло[6.6.6]эйкозан-1,8-диамин), AmBaSar (4-((8-амино-3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло[6.6.6]эйкозан-1-ил-амино) метил) бензойная кислота) и BaBaSar.

В некоторых вариантах осуществления, пептид, линкер, репортерный конъюгат приготавливают методами клик-химии. Смотрите, например, патентный документ International patent application publication no. WO/2017/027870 to Pomper et al., for Triazole Conjugated Ureas, Thioureas, Carbamates, and "Reversed" Carbamates for PSMA-Targeted Imaging Agents and Uses Thereof, published Feb. 16, 2017, и патентный документ U.S. patent application publication no. 20140341804 for Homomultivalent and Heteromultivalent Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen (Pmsa) and Uses Thereof, to Pomper et al., published Nov. 20, 2014, содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение путем ссылки на них.

В конкретных вариантах осуществления, хелатообразующее средство имеет структуру, выбранную из следующих структур:





В еще одних конкретных вариантах осуществления, репортерный фрагмент представляет собой хелатообразующее средство, и хелатообразующее средство дополнительно включает радиоактивный изотоп металла, выбранный из группы, состоящей из $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{55}Co , ^{57}Co , ^{47}Sc , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{152}Gd , ^{82}Rb , ^{89}Zr и ^{166}Dy .

В других вариантах осуществления раскрытых в настоящем изобретении визуализирующих средств, репортерный фрагмент представляет собой меченый радиоактивным изотопом субстрат, и меченый радиоактивным изотопом субстрат включает радиоактивный изотоп металла, выбранный из группы, состоящей из ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{126}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{80}Br , $^{80\text{m}}\text{Br}$, ^{82}Br , ^{83}Br и ^{211}At . В конкретных вариантах осуществления, меченый радиоактивным изотопом субстрат включает ^{18}F -меченый субстрат. В еще одних конкретных вариантах осуществления, ^{18}F -меченый субстрат выбирают из группы, состоящей из 2-фтор-РАВА, 3-фтор-РАВА, 2-фторманнита и N-сукцинимидил-4-фторбензоата. В некоторых вариантах осуществления, субстрат метят с помощью ^{18}F , используя например метод AlF , основанный на образовании хелата фторида алюминия с NOTA, NODA или любым другим известным подходящим

хелатообразующим реагентом. Смотрите, например, публикации Liu S., et al., "One-step radiosynthesis of ^{18}F -AlF-NOTA-RGD₂ for tumor angiogenesis PET imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011, 38(9):1732-41; McBride W.J., et al., "A novel method of ^{18}F radiolabeling for PET. J Nucl Med. 2009;50:991-998; McBride W.J, D'Souza CA, Sharkey RM, Sharkey RM, Karacay H, Rossi EA, Chang C-H, Goldenberg DM. Improved ^{18}F labeling of peptides with a fluoride-aluminum-chelate complex. Bioconjug Chem. 2010;21:1331-1340.

В других вариантах осуществления раскрытых в настоящем изобретении визуализирующих средств, репортерный фрагмент представляет собой флуоресцентный краситель, и флуоресцентный краситель выбирают из группы, состоящей из карбоцианина, индокарбоцианина, оксакарбоцианина, тиокарбоцианина, мероцианина, полиметина, кумарина, родамина, ксантена, флуоресцеина, бор-дипиррометанового (BODIPY) красителя или их производных, включающих, но этим не ограничивая, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TR, BODIPY TMR, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, and BODIPY 650/665, Cy5, Cy5.5, Cy7, VivoTag-680, VivoTag-S680, VivoTag-S750, AlexaFluor660, AlexaFluor680, AlexaFluor700, AlexaFluor750, AlexaFluor790, Dy677, Dy676, Dy682, Dy752, Dy780, DyLight547, Dylight647, HiLyte Fluor 647, HiLyte Fluor 680, HiLyte Fluor 750, IR800 (диметил{4-[1,5,5-трис(4-диметиламинофенил)-2,4-пентадиенилиден]-2,5-цикло-гексадиен-1-илиден}аммония перхлорат), IRDye 800CW, IRDye 800RS, IRDye 700DX, ADS780WS, ADS830WS и ADS832WS.

В других вариантах осуществления раскрытых в настоящем изобретении визуализирующих средств, репортерный фрагмент представляет собой фотоакустическую репотерную молекулу, и фотоакустическую репотерную молекулу выбирают из группы, состоящей из красителя или наночастицы. В конкретных вариантах осуществления, краситель включает флуоресцентный краситель. В еще одних конкретных вариантах осуществления, флуоресцентный краситель выбирают из группы, состоящей из индоцианина зеленого (ICG), Alexa Fluor 750, эванса голубого, BHQ3, QXL680,

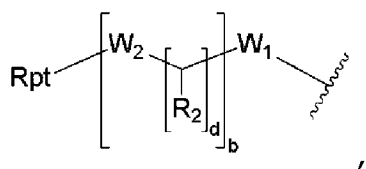
IRDye880CW, MMPsense 680, метиленового голубого, PPSu-C8 и Cyprate-C18. Смотрите публикацию Wu et al., Int. J. Mol. Sci., 15, 23616-23639 (2014).

В других вариантах осуществления, наночастицу выбирают из группы, состоящей из плазмонной наночастицы, включающей, но этим не ограничивая, золотую наносферу, золотую наноболочку, золотой наностержень, золотую наноклетку, золотую нанозвездочку и золотой нанокластер, квантовую точку, наноразмерный алмаз, полипирроловую наночастицу, наночастицу сульфида меди, графеновый нанолит, наночастицу с сердцевинкой из оксида железа с оболочкой из золота, наночастицу Gd_2O_3 , одностеночную углеродную нанотрубку, перфторуглеродную наночастицу с нанесенным красителем и наночастицу суперпарамагнитного оксида железа.

В других вариантах осуществления раскрытых в настоящем изобретении визуализирующих средств, репортерный фрагмент представляет собой активную в рамановском спектре репортерную молекулу, и активную в рамановском спектре репортерную молекулу выбирают из группы, состоящей из одностеночной углеродной нанотрубки (SWNT) и средства для усиленного поверхностью комбинационного рассеяния (SERS). В конкретных вариантах осуществления, средство SERS включает наночастицу металла (например, золота или серебра), меченную с помощью активной в рамановском спектре репортерной молекулы. В еще одних конкретных вариантах осуществления, активная в рамановском спектре репортерная молекула включает флуоресцентный краситель. В конкретных вариантах осуществления, флуоресцентный краситель выбирают из группы, состоящей из Cy3, Cy5, родамина и халькогенпирилиевого красителя.

В других вариантах осуществления раскрытых в настоящем изобретении визуализирующих средств, линкер выбирают из группы, состоящей из:

(a)



где Rpt представляет собой репортерный фрагмент; W_1 выбирают из группы, состоящей из C_1-C_6 алкилена, C_3-C_6 циклоалкилена и арилена; W_2 выбирают из группы, состоящей из $-\text{NR}^1-(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{NR}^1-(\text{C}=\text{S})-$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^1-$, $-(\text{C}=\text{S})-\text{NR}^1-$ и $-\text{S}-$, где каждый R^1 представляет собой независимо H или C_1-C_4 алкил; каждый R_2 представляет собой независимо H или $-\text{COOR}_3$, где каждый R_3 представляет собой независимо H, C_1-C_6 алкил, C_2-C_{12} арил или C_4-C_{16} алкиларил; b представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2 и 3; d представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8; и где волнистая линия указывает точку присоединения между линкером и пептидом;

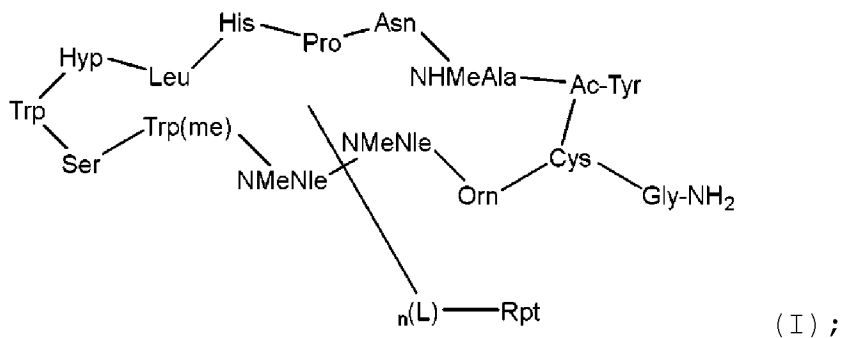
(b) $\text{Rpt}-\text{X}-\text{Y}-\text{Z}-\text{W}_3-$,

где Rpt представляет собой репортерный фрагмент; X и Z каждый представляет собой независимо C_1-C_8 алкил, C_2-C_8 алкенил, C_2-C_8 алкинил, C_1-C_8 гетероалкил, C_2-C_8 гетероалкенил, C_2-C_8 гетероалкинил, C_1-C_8 алкокси или химическую связь, каждый из которых может быть замещен с помощью 0-5 R_A ; Y и W_3 каждый представляет собой независимо $-\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})_p-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NR}_B-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CR}_B=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CR}_B-$, $-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{NH}-\text{CO}_2-$, $-\text{NR}_B-\text{CO}-$, $-\text{NR}_B-\text{CO}_2-$; $-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{CO}_2-\text{NH}-$, $-\text{CO}-\text{NR}_B-$, $-\text{CO}_2-\text{NR}_B-$ или химическую связь; p представляет собой 0, 1 или 2; R_A , в каждом случае присутствия, представляет собой галоген, гидроксигруппу, аминогруппу, цианогруппу, нитрогруппу, CO_2H , необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероцикло, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный моно- или диалкиламино, необязательно замещенный алкилтио, необязательно замещенный алкилсульфинил, необязательно замещенный алкилсульфонил, необязательно замещенный моно- или диалкилкарбоксамид, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и R_B , в каждом случае присутствия, представляет собой необязательно замещенный алкил,

необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный моно- или диалкиламино, необязательно замещенный алкилтио, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; или

(с) аминокислотный линкер.

В конкретных вариантах осуществления, визуализирующее средство представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из формулы (I), формулы (II) и формулы (III):



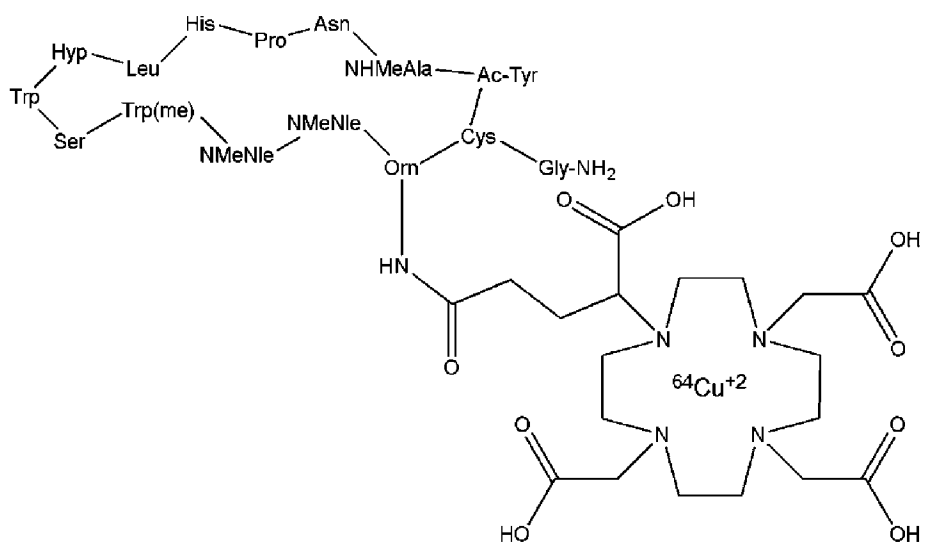
DK-A-221- (L)_n-Rpt (II); или

DK-A-222- (L)_n-Rpt (III);

где n представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0 и 1; L представляет собой линкер; и Rpt представляет собой репортерный фрагмент; и где репортерный фрагмент или линкер, в случае его присутствия, присоединен к первичной аминогруппе пептида, включающего визуализирующее средство формулы (I), формулы (II) или формулы (III).

В конкретных вариантах осуществления, линкер, в случае его присутствия, присоединен к первичной аминогруппе ¹³орнитина (Orn) соединения формулы (I). В конкретных вариантах осуществления, репортерный фрагмент включает хелатообразующее средство DOTAG. В еще одних конкретных вариантах осуществления, хелатообразующее средство DOTAG дополнительно включает ⁶⁴Cu радиоактивный изотоп металла.

В еще одних конкретных вариантах осуществления, соединение формулы (I) представляет собой:



После ознакомления с описанием раскрытого объекта настоящего изобретения, для любого специалиста в этой области становится очевидным, что для использования с раскрытыми в настоящем изобретении визуализирующими средствами подходят самые разнообразные комбинации хелатообразующих средств/ионов радиоактивных изотопов металлов. Типичные хелатообразующие средства являются хорошо известными. В качестве неограничивающих примеров, могут быть приведены конкретные хелатообразующие средства и линкеры, которые раскрыты в патентных документах U.S. patent application publication numbers 2015/0246144 and 2015/0104387, содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение путем ссылки на них.

В некоторых вариантах осуществления, визуализирующее средство способно обеспечивать детекцию PD-L1 *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления, визуализирующее средство способно обеспечивать детекцию PD-L1 *in vivo*. PD-L1 экспрессируется различными опухолями, и его сверхэкспрессия индуцируется в опухолевых клетках в качестве адаптивного механизма в ответ на цитотоксические Т-клетки, инфильтрирующие опухоль (Topalian et al., 2016). Для любого специалиста в этой области является очевидным, что PD-L1 может включать модификации и/или мутации, но и в этих случаях к нему применимы раскрытые в настоящем изобретении способы, при условии, что и в этих случаях может быть осуществлена его детекция с помощью раскрытого в настоящем изобретении

визуализирующего средства.

В некоторых вариантах осуществления, величина IC_{50} раскрытого в настоящем изобретении визуализирующего средства при ингибировании взаимодействия белка 1 программируемой смерти клеток (PD-1) с его лигандом PD-L1 находится в диапазоне от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 пМ. В некоторых вариантах осуществления, величина IC_{50} составляет менее, чем 100 нМ, в других вариантах осуществления, менее, чем 10 нМ, в других вариантах осуществления, менее, чем 8 нМ, в других вариантах осуществления, менее, чем 5 нМ, в других вариантах осуществления, менее, чем 4 нМ, и в других вариантах осуществления, менее, чем 3 нМ.

Термин "аффинность связывания" обозначает свойство, которое описывает, насколько сильно два или более соединений связаны друг с другом с помощью нековалентной связи. Аффинность связывания может быть охарактеризована качественно (например, "сильная", "слабая", "высокая" или "низкая") или количественно (например, путем определения величины K_d).

II. СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИЗУАЛИЗИРУЮЩИХ СРЕДСТВ

В некоторых вариантах осуществления, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагаются способы детекции белка иммунной контрольной точки, такого как PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагаются способы детекции заболеваний, расстройств или состояний, которые вызывают сверхэкспрессию PD-L1, таких как рак, воспаление, инфекция и другие подобные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагается способ визуализации для детекции лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), включающий: (а) обеспечение эффективного количества визуализирующего средства, включающего конъюгат пептида, обладающего специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), и репортерный фрагмент, и, необязательно, линкер, где линкер, в случае его присутствия,

соединяет пептид и репортерный фрагмент, и, в случае отсутствия линкера, репортерный фрагмент присоединен непосредственно к пептиду через первичный амин аминокислоты пептида, как это описано выше (b) контактирование одной или более клеток или тканей с визуализирующим средством; и (c) создание изображения для детекции PD-L1.

Используемый в изобретении термин "визуализация" или "создание изображения" относится к использованию любой технологии формирования изображения для визуализации поддающегося детекции соединения путем измерения энергии, испускаемой соединением. В некоторых вариантах осуществления, термин "визуализация" относится к использованию любой технологии формирования изображения для визуализации поддающегося детекции соединения после его введения субъекту путем измерения энергии, испускаемой соединением, после локализации соединения после его введения. В некоторых вариантах осуществления, способы визуализации включают введение соединения субъекту, детекция которого может быть осуществлена у субъекта внешним образом. В некоторых вариантах осуществления, изображения генерируют за счет различий в пространственном распределении визуализирующих средств, которые накапливаются в различных местах локализации у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, введение визуализирующего средства осуществляют путем инъекции.

Предполагается, что термин "визуализирующее средство" включает соединение, которое можно визуализировать, например, методом позитронно-эмиссионной томографии (PET). Используемый в изобретении термин "визуализация методом позитронно-эмиссионной томографии" или "PET" включает в себя все системы визуализация методом позитронно-эмиссионной томографии или их эквиваленты и все устройства, позволяющие осуществлять визуализацию методом позитронно-эмиссионной томографии. Способы в соответствии с раскрытым объектом настоящего изобретения могут быть реализованы путем использования любого такого устройства или варианта PET устройства или его эквивалента, или в сочетании с любой известной методикой PET. Смотрите, например, патентные документы U.S. Pat. Nos. 6151377; 6072177; 5900636; 5608221; 5532489;

5272343; 5103098, содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение путем ссылки на них. Могут также применяться системы для визуализации на животных, например, микро-PET (Corcorde Microsystems, Inc.).

В зависимости от репортерного фрагмента, раскрытые в настоящем изобретении визуализирующие средства могут быть использованы при PET, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT), при визуализации в ближней инфракрасной области (флуоресценция), при фотоакустической и рамановской визуализации.

В некоторых вариантах осуществления, визуализация включает полное сканирование субъекта или пациента, или сканирование конкретной области у субъекта или пациента, используя системы детекции, и детектирование сигнала. Детектированный сигнал затем превращают в изображение. Полученные изображения должны анализироваться опытным специалистом, таким как, например, врач. Обычно, визуализацию проводят в период времени от приблизительно 1 минуты до приблизительно 48 часов после введения визуализирующего средства. Для специалистов в этой области является очевидным, что точное определение момента времени для проведения визуализации будет зависеть от таких факторов, как скорость выведения введенного соединения. Временные рамки проведения визуализации могут изменяться в зависимости от используемого радионуклеотида. В конкретных вариантах осуществления, визуализацию проводят в период времени от приблизительно 1 минуты и до приблизительно 4 часов после введения, например, от 15 минут до 30 минут, от 30 минут до 45 минут, от 45 минут до 60 минут, от 60 минут до 90 минут, и от 60 минут до 120 минут. В некоторых вариантах осуществления, детекцию PD-L1 проводят не позже 60 минут после введения визуализирующего средства субъекту. В некоторых вариантах осуществления, визуализацию могут проводить через 24 часа после инъекции пептида, меченого с помощью Zr-89. В некоторых вариантах осуществления, визуализацию могут проводить через 24 часа после инъекции пептида, меченого с помощью I-124.

После получения изображения, специалист в этой области

может определить локализацию соединения. Используя эту информацию, специалист может определить, например, наличие такого состояния, как инфекция, воспаление или рак, степень тяжести этого состояния или эффективность лечения, которому подвергается субъект.

В некоторых вариантах осуществления, контактирование клеток или тканей с визуализирующим средством проводят *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. "Контактирование" означает любое действие, которое в результате приводит к физическому контакту, по меньшей мере, одного визуализирующего средства по раскрытому объекту настоящего изобретения, по меньшей мере, с одной клеткой или тканью. Следовательно, контактирование может включать воздействие визуализирующего средства на клетку (клетки) или ткань (ткани) в количестве, достаточном для достижения контакта, по меньшей мере, одного визуализирующего средства, по меньшей мере, с одной клеткой или тканью. В некоторых вариантах осуществления, способ может быть осуществлен *in vitro* или *ex vivo* путем введения, и, предпочтительно, смешения, визуализирующего средства и клеток или тканей в контролируемой среде, такой как чашка или пробирка для культивирования. В некоторых вариантах осуществления, способ может быть осуществлен *in vivo*, и в этом случае контактирование означает воздействие, по меньшей мере, одного визуализирующего средства по раскрытому объекту настоящего изобретения, по меньшей мере, на одну клетку или ткань у субъекта, например, введение визуализирующего средства субъекту любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления, контактирование клеток или тканей с визуализирующим средством проводят у субъекта.

Термин "эффективное количество" визуализирующего средства обозначает количество, необходимое или достаточное для получения четкого сигнала при визуализации с использованием описанных выше методов, например, позитронно-эмиссионной томографии (PET). Эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как размер и масса субъекта, тип заболевания или тип конкретного соединения. Например, выбор соединения может изменять величину, составляющую "эффективное количество". Любой

специалист в этой области способен оценить эти факторы и определить эффективное количество соединения без проведения лишних экспериментов.

Желательно, чтобы субъектом, которого диагностируют или подвергают лечению с помощью раскрытых в настоящем изобретении способов в их многих вариантах осуществления, являлся человек, но следует иметь в виду, что описанные в изобретении способы могут применяться и в отношении всех видов позвоночных животных, которые, как предполагается, также подпадают под понятие "субъект". Соответственно, термин "субъект" может включать человека, подвергаемого таким медицинским процедурам, как диагностирование или лечение существующего заболевания, расстройства, состояния, или животного, подвергаемого медицинским, ветеринарным процедурам или связанным с развитием процедур. Подходящие животные включают млекопитающих, в том числе, но этим не ограничивая, приматов, *например*, людей, нечеловекообразных обезьян, человекообразных обезьян, гиббонов, шимпанзе, орангутанов, макак и других подобных приматов; жвачных животных, *например*, крупный рогатый скот, быков и других подобных жвачных животных; семейство овечьих, *например*, овцы и другие подобные животные; семейство козьих, *например*, козы и другие подобные животные; семейство свиноподобных, *например*, свиньи, домашние свиньи и другие подобные животные; семейство лошадиных, *например*, лошади, ослы, зебры и другие подобные животные; семейство кошачьих, включающее диких и домашних кошек; семейство псовых, включающее собак; семейство зайцеобразных, включающее кроликов, зайцев и других подобных животных; и семейство грызунов, включающее мышей, крыс, морских свинок и других подобных животных. Животное может быть трансгенным животным. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек, в том числе, но этим не ограничивая, человеческий эмбрион, новорожденный, младенец, подросток и взрослый человек. Кроме того, термин "субъект" может включать пациента, страдающего от заболевания, расстройства или состояния, или пациента с подозрениями на наличие у него заболевания, расстройства или состояния. Поэтому, термины

"субъект" и "пациент" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. Субъекты также включают животных, используемых в экспериментальных моделях заболеваний (*например*, используемых в экспериментах крыс или мышей и других подобных животных). В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек, крыса, мышь, собака, лошадь, овца, корова, обезьяна, птица или земноводное животное.

Обычно, раскрытые в настоящем изобретении визуализирующие средства могут быть введены субъекту для детекции заболевания, расстройства или состояния любым подходящим способом введения, в том числе перорально, назально, трансмукозально, окулярно, ректально, интравагинально или парентерально, в том числе внутривенно, внутримышечно, подкожно, интрамедуллярной инъекцией, а также интратекально, непосредственно интравентрикулярно, внутривенно, интраартикулярно, интрастернально, интрасиновиально, внутripеченочно, внутриочагово, интракраниально, интраперитонеально, интраназально или интраокулярно, интракостернально, местно, в форме порошков, мазей или капель (включая глазные капли), в том числе буккально и сублингвально, трансдермально, путем ингаляционного распыления, или другими известными способами доставки.

Используемые в изобретении фразы "системное введение", "вводимое системно", "периферическое введение" и "вводимое периферически" обозначают введение композиций таким образом, что они попадают в систему субъекта или пациента и, в результате, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам, например, путем подкожного или внутривенного введения.

Используемые в изобретении фразы "парентеральное введение" и "вводимое парентерально" обозначают способы введения, отличающиеся от энтерального и местного введения, которые осуществляются, обычно, путем инъекции, и они включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интраокулярную, интракардиальную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную,

интраартикулярную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

В некоторых вариантах осуществления, визуализирующее средство характеризуется отношением действия, направленного на мишень, к действию, направленному не на мишень, равным, по меньшей мере, 3:1. В некоторых вариантах осуществления, термин "мишень" относится к клеткам или тканям, которые демонстрируют сверхэкспрессию белка PD-L1, и термин "не мишень" относится к клеткам или тканям, которые не демонстрируют сверхэкспрессию белка PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления, способ визуализации применяют для детекции рака. "Рак" у субъекта или пациента означает присутствие клеток, обладающих характеристиками, типичными для вызывающих рак клеток, например, неконтролируемой пролиферацией, потерей специализированных функций, бессмертием, значительным метастатическим потенциалом, значительным повышением антиапоптотической активности, быстрым ростом и высокой скоростью пролиферации, и определенной характерной морфологией и клеточными маркерами. При некоторых обстоятельствах, раковые клетки будут находиться в форме опухоли; такие клетки могут существовать локально внутри животного или циркулировать в кровотоке в форме независимых клеток, например, лейкозных клеток. Используемый в изобретении термин "рак" включает впервые диагностированные или рецидивирующие типы рака, в том числе, без ограничения, бластомы, карциномы, глиомы, лейкозы, лимфомы, меланомы, миелому и саркомы. Используемый в изобретении термин "рак" включает, но этим не ограничивая, рак головы, рак шеи, рак головы и шеи, рак легкого, рак молочной железы, такой как трижды негативный рак молочной железы, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, лейкоз/лимфому, рак матки, рак кожи, рак желез внутренней секреции, рак мочевых путей, рак поджелудочной железы, рак желудочно-кишечного тракта, рак яичников, рак шейки матки, рак почки, рак мочевого пузыря, рак мозга и аденомы. В некоторых вариантах осуществления, рак включает рак 0-ой стадии. В некоторых вариантах осуществления, рак включает рак I стадии. В некоторых вариантах осуществления,

рак включает рак II стадии. В некоторых вариантах осуществления, рак включает рак III стадии. В некоторых вариантах осуществления, рак включает рак IV стадии. В некоторых вариантах осуществления, рак является рефракторным и/или метастатическим.

Используемый в изобретении термин "опухоль" относится к росту и пролиферации всех опухолевых клеток, независимо от того, являются ли они злокачественными или доброкачественными, и всех предраковых и раковых клеток и тканей. Используемый в изобретении термин "солидная опухоль" обозначает нетипичное образование ткани, которое обычно не содержит кист или жидких областей. Солидная опухоль может находиться в головном мозге, ободочной кишке, молочных железах, предстательной железе, печени, почках, легких, пищеводе, голове и шеи, яичниках, шейке матки, желудке, толстой кишке, прямой кишке, мочевом пузыре, матке, яичках и поджелудочной железе, в качестве неограничивающих примеров. В некоторых вариантах осуществления, способ визуализации применяют для детекции солидной опухоли.

В еще одних вариантах осуществления, способ визуализации применяют для детекции метастатического рака.

В некоторых вариантах осуществления, способ визуализации применяют для детекции инфекции. Предполагается, что для детекции инфекционного заболевания, такого как грибковая или бактериальная инфекция, используется раскрытый объект настоящего изобретения. Используемый в изобретении термин "инфекция" относится к инвазии болезнетворных микроорганизмов в ткани организма-хозяина, их размножению, и реакции тканей организма-хозяина на эти микроорганизмы и продуцируемые ими токсины. Инфекции включают, но этим не ограничивая, нозокомиальные инфекции, послеоперационные инфекции и тяжелые формы абдоминальных инфекций, такие как перитонит, панкреатит, эмпиема желчного пузыря и эмпиема плевры, и костные инфекции, такие как остеомиелит. Также предполагается осуществление детекции септицемии, сепсиса и септического шока, инфекций вследствие или возникающих после использования иммуносупрессивных средств, противораковой химиотерапии, радиоактивного излучения, инфицированных жидкостей для внутривенного введения,

геморрагического шока, ишемии, травмы, рака, иммунодефицита, вирусных инфекций и диабета. Примеры микробной инфекции, такой как бактериальная и/или грибковая инфекция, включают, но этим не ограничивая, инфекции, обусловленные *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., including *S. aureus* and coag.-negative *Staphylococcus*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides* spp., *Acinetobacter* spp., *Helicobacter* spp., *Candida* sp., и так далее. К примерам инфекций относятся инфекции, обусловленные резистентными микробами, например метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) и ванкомицин-резистентный *Enterococcus faecalis* (VRE). В некоторых вариантах осуществления, инфекция представляет собой бактериальную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, инфекция представляет собой хроническую бактериальную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, бактериальная инфекция представляет собой туберкулез. В некоторых вариантах осуществления, инфекция представляет собой диссеминированный туберкулез. В некоторых вариантах осуществления, инфекция может представлять собой гепатит А, гепатит В, гепатит С и/или вирус иммунодефицита человека.

В некоторых вариантах осуществления, способ визуализации применяют для детекции воспаления. Примеры расстройств, связанных с воспалением, включают, но этим не ограничивая, астму, аутоиммунные заболевания, аутовоспалительные заболевания, целиакию, дивертикулит, гломерулонефрит, гнойный гидраденит, гиперчувствительность, воспалительные заболевания кишечника, интерстициальный цистит, отит, воспалительное заболевание тазовых органов, реперфузионное повреждение, острую ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, отторжение трансплантата, волчанку, в том числе системную красную волчанку, и васкулит. В некоторых вариантах осуществления, воспаление вызвано ревматоидным артритом или системной красной волчанкой.

PD-L1 связывается с его рецептором, PD-1, обнаруживаемым на

активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках, для модулирования активации или ингибирования. Соответственно, раскрытые в настоящем изобретении визуализирующие средства, которые выявляют экспрессию PD-L1, могут применяться для детекции иммунных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки и миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления, раскрытые в настоящем изобретении визуализирующие средства выявляют иммунные клетки в опухоли. В некоторых вариантах осуществления, раскрытые в настоящем изобретении визуализирующие средства выявляют системное распределение иммунных клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способ визуализации применяют для детекции ответных реакций иммунных клеток в инфицированных клетках. В некоторых вариантах осуществления, способ визуализации применяют для детекции ответных реакций иммунных клеток в воспалительных клетках.

В некоторых вариантах осуществления, раскрытый в настоящем изобретении способ визуализации позволяет осуществлять детекцию и/или измерять изменение экспрессии PD-L1, такое как изменение экспрессии PD-L1 в результате проведения лечения. Такие способы могут применяться для определения эффективности конкретного способа лечения и/или для определения диапазонов эффективных терапевтических доз.

III. НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ВИЗУАЛИЗИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

В некоторых вариантах осуществления, в качестве раскрываемого объекта изобретения предлагается набор реагентов для детекции лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), где набор реагентов включает визуализирующее средство, включающее конъюгат пептида, обладающего специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), и репортерный фрагмент, и, необязательно, линкер, где линкер, в случае его присутствия, соединяет пептид и репортерный фрагмент, и, в случае отсутствия линкера, репортерный фрагмент присоединен непосредственно к пептиду через первичный амин аминокислоты пептида, как это описано выше.

Обычно, наборы реагентов раскрытого объекта настоящего изобретения включают раскрытое в настоящем изобретении

визуализирующее средство и инструкции по поводу того, как осуществить, по меньшей мере, один раскрытый в настоящем изобретении способ. Визуализирующее средство обычно поставляют в наборах в количестве, достаточном для детекции PD-L1, по меньшей мере, у одного субъекта или пациента, по меньшей мере, один раз. Наборы реагентов могут также включать некоторые или все другие реагенты и расходные материалы, необходимые для осуществления, по меньшей мере, одного варианта раскрытого в настоящем изобретении способа.

В самой простой своей форме, набор реагентов в соответствии с раскрытым объектом настоящего изобретения включает контейнер, содержащий, по меньшей мере, один тип визуализирующего средства в соответствии с раскрытым объектом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, набор реагентов включает несколько контейнеров, каждый из которых может содержать, по меньшей мере, одно визуализирующее средство или другие вещества, которые могут применяться для осуществления одного или более вариантов раскрытых в настоящем изобретении способов.

Контейнер может быть изготовлен из любого материала, пригодного для упаковки раскрытой в настоящем изобретении композиции или другого вещества, применяемых при осуществлении раскрытого в настоящем изобретении способа. Так, например, контейнер может представлять собой флакон или ампулу. Он может быть изготовлен из любого подходящего материала, такого как стекло, пластмасса, металл или бумага, или продукт переработки бумаги. В вариантах осуществления, он может представлять собой стеклянную или пластмассовую ампулу или флакон, которые могут быть герметизированы, например, с помощью пробки, пробки и обжимного укупорочного средства, или с помощью пластмассовой или металлической крышки. Количество визуализирующего средства, содержащегося в контейнере, может быть подобрано любым специалистом в этой области без проведения излишних экспериментов, исходя из многочисленных параметров, которые являются существенными с точки зрения раскрытого объекта настоящего изобретения.

В вариантах осуществления, контейнер предлагается в

качестве компонента более крупного комплекта, который обычно включает упаковочные материалы (называемого ниже просто набором). Раскрытый в настоящем изобретении набор реагентов может включать подходящую упаковку и инструкции и/или другую информацию относительно применения композиций. Обычно, набор изготавливают из прочного материала, такого как картон и пластмасса, и он может содержать инструкции или другую информацию, напечатанную непосредственно на нем. Набор может включать несколько контейнеров, содержащих композицию по изобретению. В таких наборах, каждый контейнер может иметь один и тот же размер, и содержать одно и то же количество композиции в каждом из контейнеров, или разные контейнеры могут иметь разные размеры и/или содержать разные количества композиций или композиции, имеющие разные составляющие компоненты. Для любого специалиста в этой области является очевидным, что в этом изобретении подразумевается возможность использования множества различных конфигураций размеров контейнера и его содержимого, и, поэтому, нет необходимости в перечислении в изобретении всех конкретных комбинаций.

Несмотря на то, что в изобретении используются конкретные термины, тем не менее, они используются только в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения. Если не указано иначе, то все технические и научные термины, используемые в изобретении, имеют то же значение, которое является общепринятым для специалиста в области техники, к которой относится описанный объект настоящего изобретения.

В соответствии с уже давно существующей конвенцией о патентном праве, форма единственного числа при использовании в этом изобретении и формуле изобретения относится к "одному или более" указанному существительному. Так, например, ссылка на "предмет" включает в себя множество предметов, если это в явном виде не противоречит контексту (например, множество предметов) и так далее.

В настоящем изобретении и формуле изобретения, термины "содержать", "содержит" и "содержащий" используются в не исчерпывающем смысле, если из контекста не следует иное.

Аналогично, термин "включать" и его грамматические варианты не носят ограничительный характер, так что перечисление элементов в списке не исключает наличие других подобных элементов, которые могут использоваться для замены или могут быть добавлены к перечисленным элементам.

Применительно к целям настоящего изобретения и прилагаемым пунктам формулы изобретения, и если не указано иначе, то все числа, выражающие количества, размеры, геометрические параметры, пропорции, формы, составы, параметры, проценты, доли, характеристики и другие числовые значения, используемые в описании и формуле изобретения, следует воспринимать во всех случаях как преобразованные числовые значения с помощью термина "приблизительно", даже если термин "приблизительно" может не присутствовать в явной форме вместе с величиной, количеством или диапазоном. Соответственно, если не указано иначе, то числовые параметры, приведенные в нижеследующем описании и прилагаемой формуле изобретения, не являются и не должны быть точными, но могут быть приближительными и/или большими или меньшими, по желанию, отражая допустимые отклонения, коэффициенты пересчета, округления, погрешность измерения и так далее, а также другие факторы, известные специалистам в данной области, зависящие от требуемых свойств, которые стремятся получить в результате раскрытия объекта настоящего изобретения. Например, термин "приблизительно", когда он относится к величине, может означать, что он охватывает отклонения от указанной величины, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 100\%$, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 50\%$, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 20\%$, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 10\%$, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 5\%$, в некоторых вариантах осуществления, $\pm 0,5\%$, и, в некоторых случаях, $\pm 0,1\%$, так как такие отклонения являются приемлемыми с точки зрения осуществления раскрытых способов или применения раскрытых композиций.

Кроме того, следует иметь в виду, что термин "приблизительно", при его использовании в отношении одного или более чисел или диапазона числовых значений, относится ко всем

этим числам, включая все числа в диапазоне, и изменяет этот диапазон путем расширения границ выше и ниже приведенных числовых значений. Перечисление числовых диапазонов по конечным значениям включает все числа, например целые числа, включая их доли, относящиеся к этому диапазону (например, перечисление от 1 до 5 включает 1, 2, 3, 4 и 5, а также их доли, например, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 и так далее), и любой диапазон внутри этого диапазона.

ПРИМЕРЫ

Далее приведены примеры с целью разъяснения любому специалисту в данной области техники, как применять на практике типичные варианты осуществления раскрытого объекта настоящего изобретения. В свете настоящего изобретения и с учетом общего уровня знаний в данной области техники, для специалистов в данной области техники является очевидным, что приведенные далее примеры выполняют только иллюстративные функции, и что возможно применение многочисленных изменений, модификаций и адаптаций в пределах объема раскрытого объекта настоящего изобретения. Приведенные далее описания синтезов и конкретные примеры являются только иллюстрациями, и их никоим образом не следует рассматривать в качестве ограничений для получения соединений по изобретению другими способами.

ПРИМЕР 1

Быстрая детекция PD-L1 в опухоли методом позитронно-эмиссионной томографии (PET) с использованием высокоспецифического пептида

1.1 Уровень техники. Повышение уровня PD-L1 в микроокружении опухоли (TME) вызывает подавление иммунитета в результате деактивации иммунных инфильтратов путем связывания с рецептором белка 1 белка программируемой смерти клеток (PD-1), экспрессируемого активными иммунными инфильтратами (Okazaki et al., 2007, и Topalian et al. al., 2015). Экспрессию PD-L1 на опухолевых клетках и в микроокружении опухоли (TME) считают перспективным биомаркером для стратификации пациентов и терапевтического мониторинга лекарственных средств (Herbst et al., 2014). Дополнительное диагностическое обследование,

основанное на иммуногистохимическом исследовании (IHC) PD-L1, было недавно одобрено Управлением по контролю качества продовольствия и медикаментов США, что указывает на то, что PD-L1 может быть подходящей мишенью для визуализации *in vivo* (Roach et al., 2016).

В настоящее время, иммуногистохимическая (IHC) детекция является наиболее хорошо изученным прогностическим биомаркером для терапевтического мониторинга таргетной терапии PD-L1/PD-1, но этот подход и его доступные иммуногистохимические диагностические тесты для PD-L1, одобренные Управлением по контролю качества продовольствия и медикаментов США, имеют существенные недостатки, Roach et al., 2016; Mansfield and Dong, 2016; and Phillips et al., 2015, связанные с несогласующимися результатами определений позитивности по антигену, противоречивыми результатами по детекции антител, недостаточным совпадением между результатами анализов и внутриопухолевой и межопухолевой гетерогенностью, что негативно сказывается на точности и надежности анализов, и, в результате, на принятие решения по выбору метода лечения. Кроме того, образцы ткани, полученные биопсией для тестирования, как правило, очень малочисленны, а они могут быть необходимы для определения молекулярного профиля с целью идентификации самонаводящихся онкогенных мутаций в других путях (например, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), киназа анапластической лимфомы, гены репарации ДНК), которые обуславливают восприимчивость или резистентность к существующим методам лечения. Такие уникальные образцы часто делают практически невозможным проведение множественных оценок PD-L1 для надежного отображения экспрессии PD-L1. Ожидается, что новые визуализирующие средства для позитронно-эмиссионной томографии (PET), которые позволяют проводить неинвазивную оценку уровней, динамики и распределения PD-L1, и делают это в рамках стандартного клинического процесса визуализации в течение 60 минут после их введения, позволят преодолеть недостатки имеющихся (на основе иммуногистохимического исследования) методов для оценки состояния экспрессии PD-L1.

Динамическая природа иммунного микроокружения опухоли является основанием для разработки меченых соединений для позитронно-эмиссионной томографии (PET), которые позволяют быстро оценить микроокружение опухоли. В этой связи, низкомолекулярные меченые соединения на основе пептидов представляют большой интерес для клинического применения вследствие их быстрого выведения и несложного метода синтеза (Reubi et al., 2008; Sun et al., 2016). Меченые соединения на основе пептидов для позитронно-эмиссионной томографии (PET), нацеленные на соматостатиновые рецепторы и хемокиновый рецептор 4 (CXCR4), позволяют получать у пациентов высокие величины отношения "мишени к не мишени" (Herrmann et al., 2016; Gourni et al., 2011).

Недавно, сообщалось о пептидах, которые специфично связывают PD-L1 (смотрите патентный документ International PCT patent application publication no. WO2016039749 to Miller, et al., for Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 and CD80 (B7-1)/PD-L1 Protein/Protein Interactions, published March 17, 2016; патентный документ International PCT patent application publication no. WO 2016/100285 to Mapelli, et al., for Immunomodulators, published June 23, 2016; патентный документ International PCT patent application publication no. WO 2016/100608 to Sun, et al. for Immunomodulators, published June 23, 2016; патентный документ International PCT patent application publication no. WO 2016/126646 to Miller et al., for Immunomodulators, published August 11, 2016, содержание каждого из которых включено в настоящее изобретение путем ссылок на них); однако, из возможности применения для детекции экспрессии PD-L1 *in vivo* не была установлена. Было сделано предположение, что эти пептиды, связывающие PD-L1, могут применяться для быстрой и высокоспецифической детекции экспрессии PD-L1 в опухолях. Для подтверждения этого предположения, из опубликованной библиотеки пептидов был выбран пептид WL12, который в наибольшей степени подходит по конфигурации и обладает отдельно расположенным первичным амином, и проводили оценку режим его связывания с PD-L1. Хелатообразующее средство DOTAGA

конъюгировали с WL12 с целью введение радиоактивной метки ^{64}Cu с получением $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$ (Eisenwiener et al., 2000), проводили оценку аффинности связывания производных пептида с PD-L1, и определяли *in vitro* поглощение $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$ в клеточных линиях с различной экспрессией PD-L1. Для проверки обоснованности концепции, проводили оценку возможности применения $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$ для детекции экспрессии PD-L1 *in vivo* методом визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) на NSG мышах, несущих опухоли яичника китайского хомячка (CHO) с экспрессией конститутивного человеческого PD-L1 (hPD-L1) и изогенные опухоли (CHO) для негативного контроля. Распределение в тканях и специфичность в отношении мишени $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$ подтверждали путем проведения исследований *ex vivo* биораспределению и блокированию.

1.2 Результаты и обсуждение

1.2.1 WL12 связывает PD-L1 таким же образом как и PD-1. Для оценки режима связывания WL12 с PD-L1, использовали сокристаллическую структуру человеческого PD-L1, связанного с PD-1 (PDB ID: 4ZQK) (Zak et al., 2015), для докинга WL12 вместо PD-1. Принимая во внимание сложность структуры макромолекулы WL12, сначала проводили конформационный поиск, и осуществляли докинг конформеров в сайте связывания PD-1 на PD-L1, используя программное обеспечение Glide (Friesner et al., 2004; Halgren et al., 2004). WL12 образует подобную бета-складчатому слою структуру с двумя водородными связями, образованными между остовым двух макроциклических стяжей (фигура 1B). Это конформация подтверждается экспериментами по круговому дихроизму (фигура 2). Наложение структуры PD-1 на структуру связанного WL12 обнаруживает сходства режима связывания для этих двух структур. Две бета-тяжи PD-1, которые формируют границу поверхности связывания с PD-L1, перекрываются с псевдо-тяжами WL12 (фигура 1C). L-лейцин, присутствующий в WL12, вставляется в такой же небольшой гидрофобный карман, как Ile134, присутствующий в PD-1, и один из двух норлейциновых остатков

совпадает с Ile126, присутствующим в PD-1. В дополнении к этим гидрофобным взаимодействиям, между WL12 и PD-L1a присутствует ряд водородных связей. Карбоксамид аспарагина на WL12 образует водородную связь с Tyr123, глицинамид образует водородные связи с остовом Gly120, и серингидроксил взаимодействует с Gln66. Орнитиновый остаток является открытым и не участвует в связывании PD-L1. Не приводя в качестве доказательства какую-либо конкретную теорию, тем не менее, можно предположить, что конъюгация подходящей радиоактивной метки методами проведения реакции сочетания амина не должна разрушать связывание WL12 с PD-L1.

1.2.2 [^{64}Cu]WL12 характеризуется PD-L1-специфическим клеточным поглощением *in vitro*. Для конъюгирования DOTAGA использовали первичный амин ^{13}Orn (Orn), который затем использовали для приготовления нерадиоактивного Cu^{2+} аналога (WL12-Cu) и для нанесения радиоактивной метки с помощью ^{64}Cu . Полученные WL12D и соответствующий WL12-Cu очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с масс-спектрометрическим определением (фигура 2, фигура 3, фигура 4, фигура 5, фигура 6 и фигура 7), и проводили *in vitro* оценку. Для определения величины концентрации WL12 и его производных, при которой достигается 50% ингибирование, (IC_{50}), при ингибировании взаимодействия PD-L1 с PD-1, оптимизировали ранее описанное *in vitro* исследование, которое основано на резонансном переносе энергии флуоресценции (Woodard et al., 2014). Регистрировали для WL12, WL12D и WL12-Cu величины IC_{50} 22, 23 и 2,9 нМ, соответственно (фигура 8А, фигура 9, фигура 10 и таблица 1 ниже). Эти данные указывают на то, что WL12 сохраняет высокую аффинность связывания с PD-L1 после модификации ^{13}Orn боковой цепи с помощью DOTAGA и образования хелата с Cu^{2+} .

Таблица 1. WL12-немодифицированный пептид; WL12D – пептид, конъюгированный с DOTAGA, WL-Cu $^{2+}$ – комплекс меди с WL12D. 95% CI – 95% доверительные интервалы.

Соединение	IC ₅₀ [нМ]	95% CI [нМ]	K _i [нМ]	95% CI [нМ]
WL12	20,3	11,4-46,1	1,1	5,3-21,5
WL12D	22,2	14,7-33,7	10,4	6,8-15,7
WL-Cu ²⁺	2,97	2,17-4,5	1,38	1,01-1,89

Для демонстрации PD-L1 специфичности и клеточного поглощения, приготавливали [⁶⁴Cu]WL12 с высокой удельной радиоактивностью ($1,9 \pm 0,1$ мКи/мкг) и радиохимической чистотой (> 95%) (фигура 11 и фигура 12). Клетки hPD-L1, инкубированные с [⁶⁴Cu]WL12 в течение 1 часа, характеризовались > 50% поглощением инкубированной дозы и 43-кратным увеличением связанной радиоактивности по сравнению с клетками CHO, использовавшихся в качестве негативного контроля (фигура 8C). Затем исследовали специфичность связывания путем инкубирования hPD-L1 клеток только с одним [⁶⁴Cu]WL12 или в присутствии с 1 мкМ блокирующей дозы WL12. Обнаруживали > 95% уменьшение связывания [⁶⁴Cu]WL12 в присутствии пептида, что указывало на то, что [⁶⁴Cu]WL12 связывание с PD-L1 является специфичным (фигура 8C). Затем исследовали способность [⁶⁴Cu]WL12 к детекции эндогенной экспрессии PD-L1 в двух линиях клеток трижды негативного рака молочной железы (TNBC), MDAMB231 и SUM149, которые демонстрировали высокую и низкую экспрессию PD-L1, соответственно (фигура 8B). В два раза более высокое поглощение радиоактивности в клетках MDAMB231 по сравнению с клетками SUM149 дополнительно подтверждало специфичность [⁶⁴Cu]WL12 в отношении PD-L1 (фигура 8C). Исследование методом проточной цитометрии экспрессии PD-L1 позволило определить средние величины интенсивности флуоресценции, которые располагались в следующем порядке: hPD-L1 > MDAMB231 > SUM149 > CHO, что коррелировало с поглощением радиоактивности ($r=0,9977$, фигура 13 и фигура 14). В совокупности, эти результаты показывают, что [⁶⁴Cu]WL12 связывает раковые клетки *in vitro* зависимым от экспрессии PD-L1 образом.

1.2.3 [^{64}Cu]WL12 специфически накапливается в опухолях с высокой экспрессией PD-L1. Для того чтобы получить сведения о *in vivo* специфичности и распределении [^{64}Cu]WL12, проводили исследования по визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии-компьютерной томографии (PET-КТ) на мышах, несущих hPD-L1 и CHO опухоли (n=4). Исследования с помощью PET визуализации показали устойчивое поглощение [^{64}Cu]WL12 в hPD-L1 опухолях. Повышенное поглощение в hPD-L1 опухолях можно было наблюдать уже через 10 минут, и оно сохранялось на протяжении 24 часов после инъекции (фигура 15А и фигура 16), с экспрессией PD-L1, подтвержденной иммуногистохимическим (IHC) исследованием (фигура 15В). Помимо опухолей, высокое поглощение также наблюдалось в почках и печени. Для подтверждения наблюдений с помощью визуализации методом PET, проводили исследования биораспределения через 1 и 2 часа после инъекции [^{64}Cu]WL12 (n=3 и n=5, соответственно). Принимая во внимание быстрое поглощение, наблюдаемое в PD-L1-положительных опухолях, было сделано предположение, что биораспределение через 1 и 2 часа могло быть более информативным в случае разработки ^{18}F -меченого аналога. В соответствии с исследованиями по визуализации, hPD-L1 опухоли демонстрировали величины поглощения радиоактивности в процентах от инъецированной дозы/г (%ИД/г) $14,9 \pm 0,8$ через 1 час. В отличие от этого, поглощение контрольной CHO опухоли составляло $4,0 \pm 0,6\%$ ИД/г (фигура 17). Поглощение в почках и в печени также было относительно высоким, при этом величина поглощения составляла $34,4 \pm 3,1$ и $24,2 \pm 2,5\%$ ИД/г, соответственно. Соотношения опухоли к мышцам и опухоли к крови для hPD-L1 опухолей составляли $25,6 \pm 1,9$ и $4,7 \pm 1,2$, соответственно, что согласуется со способностью [^{64}Cu]WL12 обеспечивать специфичные изображения PD-L1 с высокими значениями отношения сигнала к шуму (фигура 15А и фигура 15В).

Исследования биораспределения, проведенные через 2 часа, показали аналогичный профиль с тенденцией к снижению

радиоактивности в почках, печени и опухоли (фигура 17). Для демонстрации *in vivo* специфичности, [^{64}Cu]WL12 инъецировали совместно с избытком WL12 (50 мкг, 2 мг/кг) и проводили исследования биораспределения через 2 часа. Наблюдали уменьшение на > 75% величин %ИД/г в hPD-L1 опухолях ($P < 0,0001$), но не обнаруживали значимого различия в контрольных CHO опухолях. Почки также демонстрировали пониженное поглощение. Не обнаруживали значимых различий в поглощении радиоактивности в других тканях. Повышенное поглощение в печени, тенденция, часто наблюдаемая для визуализирующих средств на основе ^{64}Cu (Anderson et al., 2009), может быть обусловлено диссоциацией Cu^{2+} из хелатообразующего средства и последующей трансформации хелата с белками плазмы, такими как альбумин и церулоплазмин (Smith-Jones et al., 1991; Wadas et al., 2007; и Boswell et al., 2004). Повышенное поглощение почками также позволяет предположить о преимущественном выведении пептида через почки. Низкое поглощение, наблюдаемое в селезенке, тимусе и гибернационной железе, тканях, которые, как известно, экспрессируют PD-L1, и, как сообщается, демонстрируют повышенное поглощение меченого радиоактивным изотопом антитела (Chatterjee et al., 2016; Hettich et al., 2016; и Josefsson et al., 2016), позволяет предположить, что [^{64}Cu]WL12 проявляет очень низкую аффинность или не проявляет аффинности к мышинному PD-L1. Дополнительным подтверждением специфичности [^{64}Cu]WL12 в отношении человеческого PD-L1 является то, что не было обнаружено значимых различий в поглощении в этих тканях для контрольных групп и групп с блокированием дозы, за исключением почек. Исследования визуализации и биораспределения в совокупности демонстрируют, что [^{64}Cu]WL12 связывает быстро и специфично человеческий PD-L1.

1.2.4 Результаты спектроскопии кругового дихроизма (CD). Для оценки вторичной структуры WL12 в водных и имитирующих мембраны растворах, применяли CD спектроскопию в комбинациях воды, додецилфосфохолина (DPC) и додецилсульфата натрия (SDS). Как представлено на фигуре 2, Trp остатки значительно влияют на

CD спектр WL12 пептида в диапазоне 220–240 нм. В растворе, не содержащем поверхностно-активного вещества, наблюдается минимум приблизительно при 220 нм и положительное плечо приблизительно при 230 нм. После добавления поверхностно-активных веществ, обе полосы слегка смещаются в красную область, и отмечается увеличение интенсивности последней полосы. Эти полосы относят к Trp-Trp связи. Оба Trp хромофора находятся в непосредственной близости, и они ведут себя как один абсорбирующий элемент. Вследствие этого, их возбужденные состояния взаимодействуют, и возбужденные состояния димерной системы делокализуются над обоими мономерами. Это явление, называемое экситонным эффектом, вызывает расщепление возбужденного состояния на две компоненты, одна из которых возникает в результате синфазной комбинации двух мономерных возбуждений, а другая возникает в результате несинфазной комбинации. (Grishina 1994, and Kelly 2000).

CD спектры неупорядоченных пептидов обычно характеризуются одной полосой ниже 200 нм, в то время как α -спираль дает две негативных полосы при 208 и 222 нм с одной положительной полосой при 192 нм, и структуры β -листа обычно характеризуются негативной полосой при 217 нм с положительной полосой при 195 нм. Поэтому, сильная негативная полоса при ~205 нм и сильная положительная полоса при ~190 нм на CD спектре WL12 пептида может наводить на мысль о смеси конформации случайной спирали и более упорядоченной структуры. Деконволюционный анализ CD спектра указывает на высокое содержание структуры β -листа (~40%) при всех условиях измерений. Тем не менее, сильный вклад Trp хромофоров в спектр кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области WL12 влияет на точность количественного анализа содержания вторичной структуры, и полученные результаты следует интерпретировать с осторожностью.

1.3 Краткие выводы. Подводя итог вышесказанному, были продемонстрированы быстрая детекция PD-L1 в опухоли и селективность в отношении PD-L1 *in vitro* и *in vivo* при проведении позитронно-эмиссионной томографии (PET) с использованием высокоспецифичного PD-L1 связывающего пептида

[^{64}Cu]WL12. Фармакокинетика и биораспределение [^{64}Cu]WL12 указывают на то, что детекция PD-L1 подходит для применения при проведении стандартного клинического процесса визуализация пациентов в течение 60 минут после введения радиоизотопного индикатора. Быстрая и неинвазивная детекция экспрессии PD-L1 во всех злокачественных очагах поражения в полном объеме обеспечивает беспрецедентные возможности для стратификации пациентов для иммуномодуляционной терапии.

1.4 Материалы и методы

1.4.1 Материалы. PD-L1 связывающий пептид, WL12, был синтезирован по особому фирмой CPC Scientific (Sunnyvale, CA) с чистотой >95%. Все другие химические реагенты приобретались у фирмы Sigma-Aldrich или Fisher Scientific, если не указано иное. 2,2',2''-(10-(2,6-диоксотетрагидро-2H-пиран-3-ил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триил)триуксусная кислота (DOTAGA ангидрид) и [^{64}Cu]Cl₂ приобретались у фирмы CheMatech Macrocycle Design Technologies (номер по каталогу C109; Dijon, France) и у Висконсинского университета (University of Wisconsin), соответственно. Все реагенты, относящиеся к культивированию клеток, приобретались у фирмы Invitrogen, если не указано иное. Поликлональный античеловеческий IgG-Eu³⁺ криптит (номер по каталогу 61HFCKLA) и XL665-конъюгированное мышинное моноклональное антитело против бх-гистидина (номер по каталогу 61HISXLA) приобретали у фирмы Cisbio Assays (Bedford, MA). Рекомбинантный человеческий PD-1 Fc химерный белок (номер по каталогу 1086-PD-050) и рекомбинантный человеческий PD-L1 (B7-H1)-His-tag белок (номер по каталогу 9049-B7) получали от фирмы R&D systems (Minneapolis, MN).

1.4.2 Исследования докинга. Для проведения докинга WL12 с PD-L1, в качестве темплата использовали кристаллическую структуру человеческого PD-1, связанного с PD-L1 (PDB ID: 4ZQK). Сначала приготавливали модель, используя панель экспертной системы Protein Preparation Wizard в программном обеспечении Maestro (Schrödinger Release 2016-2: Maestro, version 10.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016) (Sastry et al., 2013). Она

включает присваивание порядков связей и формальных зарядов, добавление атомов водорода и добавление недостающих боковых цепей. Сетку водородных связей внутри белка оптимизируют (в том числе переориентацию тиольных и гидроксильных групп, выбор Asn, Gln и His боковых цепей, и предсказание протонированных состояний His, Asp и Glu), и затем проводят быструю минимизацию. Структуру PD-1 удаляли. Конформационный поиск проводили по структуре WL12, используя программу Prime Conformational Search (Schrödinger Release 2016-2: Prime, version 4.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). Для экспериментов по докингу выбирали 100 конформеров с самыми низкими энергиями. Докинг проводили с помощью программы Glide (Schrödinger Release 2016-2: Glide, version 7.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), используя установки по умолчанию и ввод кольцевых конформаций (Friesner et al., 2004, Halgren et al., 2004). Куратором программного обеспечения, используемого для этих вычислений, была компания SBGrid (Morin et al., 2013).

1.4.3 Измерения кругового дихроизма (CD). Спектры CD пептида в водных не содержащих поверхностно-активных веществ растворах и в водных мицеллярных растворах додецилфосфатидилхолина (DPC), додецилсульфата натрия (SDS) и смесей DPC:SDS мицелл при мольном отношении 5:1 регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-815 (Jasco, Easton, MD). Все измерения выполняли с использованием 0,15 мг/мл растворов пептида при 25°C. Эксперименты проводили в диапазоне 185–260 нм и в трех параллельных опытах для увеличения отношений сигнала к шуму. Полученные спектры корректировали путем вычитания фона и анализировали в форме средней величины остаточной молярной эллиптичности, MRME, ($\text{градус} \times \text{см}^2 \times \text{децимоль}^{-1}$) от длины волны λ (нм). Содержание вторичной структуры рассчитывали из спектров с использованием метода CONTIN (Sreerama et al., 2000).

1.4.4 Синтез WL12-DOTAGA (WL12D). Три мг пептида (1,5 мкмоль) растворяли в 0,5 мл DMF и смешивали с 3,7 мг ангидрида DOTAGA (7,51 мкмоль в 0,5 мл DMF) и 20 мкл диизопропилэтиламина (DIPEA). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при

комнатной температуре, и продукт очищали на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенными фазами (RP-HPLC) (Varian ProStar) с детектором с фотодиодной матрицей Agilent Technology 1260 Infinity (Agilent Technologies, Wilmington, DE), используя полупрепаративную колонку C-18 Luna (5 мм, 10×250 мм Phenomenex, Torrance, CA) и градиентное элюирование, начиная с 98% H₂O (0,1% TFA) и 2% MeOH (0,1% TFA) и достигая 100% MeOH через 60 мин при расходе 4 мл/мин. Требуемый WL12D собирали на 44,5 мин, испаряли, растворяли в деионизированной воде и лиофилизировали с получением 3,1 мг (1,3 мкмоль) продукта в виде белого порошка (выход: 82,9%, фигура 2). Полученный конъюгат, солюбилизированный в H₂O-MeOH 50% (по объему) с 0,1% муравьиной кислоты, подвергали анализу методом масс-спектропии с ионизацией электрораспылением (ESI MS, Esquire 3000 плюс спектрометр Bruker Daltonics, Billerica, MA) (фигура 4). Теоретическая химическая формула: C₉₁H₁₂₈N₂₂O₂₀S₂. Наблюдаемая величина ESI-MS m/z: 2340,9 – (M+1)⁺¹, 1171,1 – (M+2)⁺²/2 и 781,1 – (M+2)⁺³/3. (Ожидаемая: 2340,65)

1.4.5 Получение комплекса WL12-Cu²⁺. Растворяли 1,5 мг WL12D (0,64 мкмоль) в 200 мкл ацетата натрия (0,1М, pH=4,5 доведенный с помощью ледяной уксусной кислоты) и добавляли 55 мкл 0,02М водный раствор CuCl₂ (1,1 мкмоль). Полученную реакционную смесь инкубировали при 65°C в течение 30 минут и очищали методом RP-HPLC, как описано для WL12D (фигура 5), лиофилизировали, и полученный светло-голубой порошок анализировали методом ESI MS (фигура 6). Комплекс WL12-Cu²⁺ затем использовали для оптимизации условий проведения RP-HPLC, и в качестве стандарта для введения радиоактивной метки, и для исследования конкурентного связывания PD-L1 и PD-1 (фигура 7). Теоретическая химическая формула: C₁₁₀H₁₅₆N₂₆O₂₉S. Наблюдаемая величина ESI-MS m/z: 2402,6 – (M+1)⁺¹, 1201,9 – (M+2)⁺²/2 (Ожидаемая: 2402,18)

1.4.6 Исследование ингибирования связывания PD-L1 и PD-1. Исследование конкурентного ингибирования в отношении связывания

PD-L1 с PD-1 оптимизировали из ранее описанного исследования на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при консультациях с фирмой Cisbio (Woodard et al., 2014). Все исследования связывания/ингибирования проводили в 21 мкл буфера для исследования FRET (dPBS, альбумин бычьей сыворотки (0,1%, масса на единицу объема), Tween-20 (0,05% по объему) и фторид натрия (400 мМ)). Условия исследования сначала оптимизировали для концентраций PD-1 и PD-L1. PD-1-Ig при конечной концентрации 10 нМ, 20 нМ и 40 нМ инкубировали в течение 15 минут с PD-L1-His-tag при конечных концентрациях в диапазоне от 0,65 до 320 нМ (для каждой концентрации проводили три параллельных эксперимента), затем добавляли 10 мкл FRET буфера, содержащего человеческий анти-IgG-Eu³⁺ криптат (IgG-Eu, конечная концентрация 2 нМ) и анти-6HIS-XL665 моноклональное антитело (анти-6HIS-XL665, конечная концентрация 40 нМ). После инкубации при комнатной температуре в течение одного часа, добавляли 1 мкл раствора буфера для исследования NaF (конечная концентрация, 400 мМ), и считывали планшет, используя счетчик с мультиизотопным режимом Perkin Elmer Victor3 1420 (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Для исследования конкурентного ингибирования, ингибиторы (WL12, WL12D и WL12-Cu²⁺, диапазон: от 1 пМ до 1 мМ) предварительно инкубировали с PD-L1-His-tag (80 нМ конечная концентрация) в 10 мкл буфера для исследования в течение 15 минут, затем добавляли 5 мкл буфера для исследования, содержащего PD-1-Ig (конечная концентрация 20 нМ), и инкубировали в течение 15 минут. Затем добавляли 5 мкл буфера для исследования с IgG-Eu (конечная концентрация 2 нМ) и анти-6HIS-XL665 (конечная концентрация 40 нМ). После 1 часа инкубации при комнатной температуре, добавляли 1 мкл NaF (конечная концентрация 400 мМ), и считывали планшет, используя счетчик с мультиизотопным режимом Perkin Elmer Victor3 1420. Величины IC₅₀ и K_i рассчитывали путем аппроксимации данных с помощью сигмоидальной кривой доза-эффект и уравнения Ченга-Прусоффа с полученной величиной K_D=70 нМ для PD-L1 при концентрации 80 нМ. Все эксперименты проводили в трех параллельных опытах и

повторяли три раза.

1.4.7. Синтез [^{64}Cu]WL12. Поставленный из Висконсинского университета (University of Wisconsin) $^{64}\text{CuCl}_2$ испаряли до небольшого объема и превращали в $^{64}\text{Cu}(\text{OAc})_2$ путем титрования 0,1 М раствором ацетата натрия. Для введения радиоактивной метки, приблизительно 10 мкг конъюгата пептида WL12D (4,27 нмоль) в 100 мкл ацетата натрия смешивали с ~185 МБк (~5 мКе) $^{64}\text{Cu}(\text{OAc})_2$ и инкубировали при 65°C в течение 30 минут. Полученный радиоизотопный индикатор очищали на полупрепаративной колонке C-18 (Luna, 5 мкм, 10×250 мм; Phenomenex) с использованием системы Varian ProStar, оборудованной радиоактивным одноканальным детектором излучения (model 105S; Bioscan, Poway, California) и детектором поглощения УФ-излучения Varian ProStar, установленного на длину волны 280 нм. Применяли градиентное элюирование, начиная с 98% H_2O (0,1% TFA) и 2% MeOH (0,1% TFA) и достигая 90% MeOH в течение 70 минут при расходе 5 мл/мин. [^{64}Cu]WL12 собирали на ~56,2 минуте (время удерживания для немеченого пептида: 53,6 минуты), испаряли, разбавляли физиологическим раствором, содержащим 5% DMSO и две капли Tween 20, и использовали для *in vitro* и *in vivo* оценки. [^{64}Cu]WL12 получали с выходом $52,09 \pm 6,3\%$ и с удельной активностью $1,9 \pm 0,11$ мКе/мкг.

1.4.7. Клеточные линии. Линия клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 (далее называемая как CHO) и линия клеток MDAMB231 трижды негативного рака молочной железы (TNBC) приобретали у Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA) и пересеивали в течение не позднее 3 месяцев, после чего получали новые культуры из флаконов с замороженными клетками. Клетки линии SUM149 были любезно предоставлены доктором Stephen P. Ethier из Медицинского университета Южной Каролины (Medical University of South Carolina), и их аутентифицировали методом анализа STR-профиля (профиля короткого tandemного повтора) в Центре генетических ресурсов Университета Джонса Хопкинса. Клетки SUM149 хранили в среде Хэма F-12 с 5%

FBS, 1% P/S и 5 мкг/мл инсулина и 0,5 мкг/мл гидрокортизона. Все другие клеточные линии культивировали в рекомендованных ATCC средах в инкубаторе при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клеточную линию CHO, стабильно экспрессирующую человеческий PD-L1 (далее называемый как hPD-L1), генерировали в нашей лаборатории (Chatterjee et al., 2016) и хранили в среде F-12K с 10% FBS, 1% P/S и 2 мг/мл G418.

1.4.8. Проточная цитометрия. Клетки в суспензии собирали центрифугированием, и прилипшие клетки отделяли с использованием не содержащего фермент буфера для диссоциации клеток на основе PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Собранные клетки промывали два раза буфером для проточной цитометрии (1x PBS с 2 mM EDTA и 0,5% FBS). Клетки окрашивали с помощью антитела против человеческого PD-L1, конъюгированного с фикоэритрином (обозначаемого как BD-MIH-PE, клон # MIH1, номер по каталогу 557924, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), в соответствии с протоколом фирмы-производителя, и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson). Регистрировали, по меньшей мере, 20000 событий.

1.4.9. In vitro связывание. In vitro связывание [⁶⁴Cu]WL12 с hPD-L1, с клетками CHO, MDAMB231 и SUM149 определяли путем инкубации 1 мкМ радиоизотопного индикатора с 1×10⁶ клеток в течение 1 часа при 37°C. После инкубации, клетки промывали три раза холодным PBS перед подсчетом на автоматическом счетчике гамма-излучения (1282 Compugamma CS, Pharmacia/LKB Nuclear, Inc., Gaithersburg, MD). Для демонстрации PD-L1 специфического связывания [⁶⁴Cu]WL12, проводили блокирование PD-L1 с помощью 1 мкМ или пептида WL12, или гуманизированного антитела против PD-L1 атезолизумаба. Средние величины интенсивности флуоресценции коррелировали с % поглощения инъецированной дозы (%ИД). Все исследования по клеточному поглощению проводили в трех параллельных опытах для каждой клеточной линии и повторяли три раза.

1.4.10. Экспериментальные модели на животных. Исследования

на животных проводили в соответствии с протоколами, одобренными Комитетом по уходу за животными и их использованию в научных целях (ACUC) Университет Джонса Хопкинса. Самок мышей в возрасте от шести до восьми недель, не страдающих диабетическим ожирением, с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью гамма (NSG), получали из Центра по исследованию и оценке животных с подавленным иммунитетом Университета Джонса Хопкинса. Мышам имплантировали подкожно в противоположные стороны верхних частей боковых поверхностей 10×10^6 клеток CHO-PDL1 и CHO. Мышей использовали для экспериментов по визуализации или биораспределению, когда опухоли достигали объема 200–300 мм³.

1.4.11. Визуализация методом позитронно-эмиссионной томография-компьютерной томографии (PET-CT) ксенотрансплантатов у мышей. Мышам инъецировали внутривенно 150 мкКе [⁶⁴Cu]WL12 в 200 мкл физиологического раствора (n=3), подвергали анестезии 3% изофлураном перед помещением на сканер. Во время визуализации, у мышей поддерживали концентрацию 1% изофлурана. PET изображения получали в двух положениях лежа при длительности 10 мин/ложе в PET/CT сканере для мелких животных ARGUS (Sedecal, Madrid, Spain). CT сканирование (512 проекций) проводили в конце каждого PET сканирования для анатомической сорегистрации. Данные PET реконструировали, используя алгоритм максимизации двумерно-упорядоченных подмножеств-ожиданий (2D-OSEM), и вводили поправку на время нечувствительности и радиоактивный распад. Рассчитывали значения %ИД на кубический сантиметр на основе градуировочного коэффициента, полученного из известного количества радиоактивности. Визуализацию конечных данных и формирование изображения проводили с использованием Amira® (FEI, Hillsboro, OR).

1.4.12. *Ex vivo* биораспределение. Мышам, несущим hPD-L1 и CHO опухоли с высокой и низкой экспрессией PD-L1 (n=5), соответственно, инъецировали внутривенно 40 мкКе [⁶⁴Cu]WL12. Собирали кровь, опухоли и выбранные ткани, взвешивали их и определяли радиоактивность в автоматическом счетчике гамма-

излучения (Perkin Elmer - 2480 Automatic Gamma counter - Wizard2 3" Wallac) через 1 час и 2 часа после инъекции [^{64}Cu]WL12. Для исследования блокирования, мышам совместно инъецировали 2 мг/кг (50 мкг) немодифицированного пептида с радиоизотопным индикатором. Рассчитывали величины процента инъецированной дозы на грамм ткани (%ИД/г) на основе коррекции сигнала разложения и нормализации к внешним [^{64}Cu] стандартам, которые измеряли в трех параллельных опытах. Приведенные данные по биораспределению представляют собой среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения (SEM).

1.4.13. Анализ данных. Статистический анализ проводили с использованием непарного двустороннего критерия, применяя программное обеспечение Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Считали, что P -величины $< 0,05$ являются значимыми, и образцом для сравнения являлась клеточная линия или опухоль с низкой экспрессией PD-L1. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Ashland, OR.). Величины IC_{50} и K_i определяли с использованием программного обеспечения Prism 6 (GraphPad).

ПРИМЕР 2

Применение целенаправленной позитронно-эмиссионной томографии PD-L1 при разработке PD-L1 таргетного лекарственного средства

2.1 Обзор. Иммуноterapia рака (CIT) повышает выживаемость пациентов в результате продуцирования долговременных ответных реакций в целом ряде злокачественных новообразований. Однако, почти 70% пациентов, которых подвергают таргетным терапиям иммунной контрольной точки, не восприимчивы к монотерапии (Lipson, et al., 2015; Topalian, et al., 2015). Существует неудовлетворенная потребность в идентификации детерминант ответа для точно направленной терапии. Комбинированные терапии контрольной точки приводили к пролонгированию выживания, но часто ценой увеличения связанных с иммунитетом негативных проявлений (irAE), что подтверждает необходимость в более глубоком понимании комбинированных стратегий для ослабления

токсических эффектов (Marrone, et al., 2016). Крайне необходимо фокусировать исследования на выявлении новых биомаркеров для терапий иммунной контрольной точки и их комбинаций для расширения области их применения и увеличения продолжительности их действия, и для ослабления токсических эффектов. Соответственно, одним аспектом раскрытого объекта настоящего изобретения является разработка стратегий применения визуализации PD-L1 методом позитронно-эмиссионной томографии (PET) и разработка и оценка PD-L1 таргетных терапевтических средств. В отличие от применяющихся в настоящее время стратегий, основывающихся на биомаркерах в плазме или тканях (биоптатах), которые являются инвазивными и труднореализуемыми в случае пациентов на поздних стадиях болезни, предполагаемое изобретение позволяет определять соотношения дозы и занятости при PD-L1 таргетных терапиях (антитела, пептиды, низкомолекулярные соединения) в опухоли в релевантных *in vivo* моделях, используя визуализацию PD-L1 методом позитронно-эмиссионной томографии (PET).

2.1.1. *Преимущества, достигаемые в результате количественной оценки динамики PD-L1 на основе позитронно-эмиссионной томографии.* Недавно было обнаружено, что накопление PD-L1-таргетного терапевтического препарата AtzMab и его мышинового химерного организма (PRO) в опухолях NSCLC, TNBC и толстой кишки является не полностью зависимым от экспрессии PD-L1, так как H2444 NSCLC ксенотрансплантаты, которые имеют более высокую экспрессию PD-L1, накапливали существенно меньшие количества меченого радиоактивным изотопом AtzMab по сравнению с количествами, наблюдаемыми в ксенотрансплантатах рака молочной железы с низкой экспрессией PD-L1, определяемыми иммуногистохимическим исследованием и проточной цитометрией (Chatterjee, et al., 2016). Аналогично, в случае моделей опухолей на изогенных мышах, системно инъецируемый меченный радиоактивным изотопом PRO первично ассоциировался с сосудистой сетью опухоли, и характеризовался небольшой диффузией или отсутствием диффузии в паренхиме опухолей (Deng, et al., 2016). Такие результаты могут быть объяснены патофизиологическими

характеристиками, в том числе повышенным тканевым давлением внутри опухолей (Baxter, et al., 1989; Baxter, et al., 1990), которые препятствуют накоплению терапевтических средств внутри опухолей, что является важным благоприятствующим фактором для возникновения резистентности к терапии (Goel, et al., 2011). Кроме того, такие эффекты могут потенциально затруднять доступ в опухолевые клетки PD-L1-таргетным терапевтическим средствам, которые в первую очередь оказывают действие на опухолевые клетки и опухолевые иммунные инфильтраты. Поэтому, пептиды, такие как WL12/ ^{18}F WL12 или аналогичные меченные радиоактивным изотопом пептиды, могут проникать в опухолевую ткань с достижением клеток-мишеней более рационально и эффективно, чем антитела, вследствие значительно меньшего размера их молекул. Путем использования соответствующих методов анализа и коррекций, ^{18}F WL12 измерения или измерения, сделанные с использованием аналогичных меченных радиоактивным изотопом пептидов, могут, поэтому, способствовать установлению/оптимизации терапевтических доз mAb, необходимых для достижения требуемой занятости внутри опухолевой ткани в опухолевых клетках-мишенях.

Поэтому, была применена целенаправленная позитронно-эмиссионная томография PD-L1 для разработки D-L1-таргетного лекарственного средства. Для оценки его потенциальной ценности, в инновационной стратегии использовали ^{64}Cu WL12 для оценки и сравнения характеристик захвата PD-L1 опухоли в отношении дозы терапевтического антитела против PD-L1 атезолизумаб (AtzMab) в зависимости от локализации mAb в опухолях, наблюдаемой методом PET. Предклинические наблюдения, описанные в изобретении, характеризуются практически важными с клинической точки зрения результатами. У пациентов, аналогичные измерения PD-L1 на основе визуализации методом PET могут потенциально использоваться для выбора интенсивности терапевтического дозирования с целью усиления терапевтических эффектов (Yang, et al., 2013; Oude Munnink, et al., 2016). Кроме того, такие измерения PD-L1 методом позитронно-эмиссионной томографии (PET) могут потенциально использоваться в качестве руководства для разработки в будущем новых PD-L1-таргетных терапевтических

средств, в силу того, что эти измерения позволяют количественно оценивать потенциальное таргетное взаимодействие в месте опухоли.

2.1.2. Инновации при использовании позитронно-эмиссионной томографии PD-L1 при разработке и оценке лекарственного препарата. Раскрытые в настоящем изобретении инновационные стратегии визуализации PD-L1 методом позитронно-эмиссионной томографии с использованием пептида позволяют оценивать активность таргетного взаимодействия используемых в настоящее время и разрабатываемых терапевтических средств против PD-L1 (то есть, занятость и время удерживания) в опухоли в тех случаях, когда это наиболее целесообразно. Динамика плотности/оборачиваемости PD-L1, а также величина массы опухоли, экспрессирующей PD-L1, которая влияет на концентрации mAb в сыворотке, а также полнота перфузии mAb в опухоли и достигаемые внутриопухолевые накопления mAb, значительно влияют на терапевтическую эффективность. Для определения требуемых уровней доз mAb и расчета занятости поверхности молекулы-мишени ранее использовали меченные радиоактивным изотопом антитела (Deng, et al., 2016), но ключевым недостатком такого подхода является то, что PD-L1 занятость в месте приложения действия в опухоли может быть только прогнозируемой. Раскрытый в настоящем изобретении подход позволяет эффективно устранять этот недостаток, осуществляя количественную оценку PD-L1 занятости в месте опухоли. В дополнение к объяснениям влияния ключевых физиологических параметров опухоли на достижение эффективных доз и накопления mAb, предполагается, что измерения методом PET на основе нового радиоизотопного индикатора могут улучшить текущие представления по поводу причины того, почему некоторые пациенты с PD-L1-положительными опухолями не отвечают на противораковую иммунотерапию (CIT), и могут помочь выбрать стратегии интенсификации дозы для достижения требуемых уровней занятости в опухолях.

2.1.3. Оценка использования позитронно-эмиссионной томографии PD-L1 при разработке и исследовании PD-L1-таргетных терапевтических препаратов.

2.1.3.1 Обоснование

Терапевтические антитела, нацеленные на PD-L1 и PD-1, продемонстрировали исключительную эффективность на небольшой части пациентов с PD-L1-положительными опухолями. При используемых в настоящее время дозах, группы пациентов, у которых достигается лечебный эффект, и группы пациентов, у которые не достигается клинического ответа, демонстрируют приблизительно 65% PD-L1 занятости в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), но взаимосвязь PD-L1 занятости в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) и занятости в опухолях, которая является динамической, плохо изучена (Brahmer, et al., 2012). Кроме того, исследования на моделях опухолей показали, что, в случае некоторых опухолей, антитела против PD-L1 присутствуют исключительно в сосудистой сети опухоли (Deng, et al., 2016). Предварительные результаты с меченым радиоактивным изотопом AtzMab совпали с этими результатами в NSCLC ксенотрансплантатах (Chatterjee, et al., 2016). Взяты вместе, эти результаты позволяют предположить, что для более высокой информативности методов лечения, направленных на PD-L1, необходимо иметь более четкое представление о занятости PD-L1 в опухоли и ее зависимости от дозы, а также от времени удерживания антител против PD-L1 в опухоли. Не приводя в качестве доказательств какую-либо конкретную теорию, тем не менее, можно полагать, что позитронно-эмиссионная томография PD-L1 может представлять собой ценный инструмент для оценки таких фармакокинетических показателей антител против PD-L1 (или пептидов и низкомолекулярных соединений) в отношении таргетного взаимодействия и времени удерживания. Кроме того, полагают, что дозирование, основанное на информации, получаемой методом позитронно-эмиссионной томографии, позволит изменять иммунный профиль в опухоли, который может быть количественно определен путем визуализации PD-L1 методом позитронно-эмиссионной томографии и скоррелирован с вызванными терапией изменениями экспрессии PD-L1 в опухоли и инфильтратов иммунных клеток.

2.1.3.2 Репрезентативные данные. Меченные радиоактивным изотопом версии доступных антител против PD-L1 и производные PD-

1 были использованы для неинвазивной детекции экспрессии PD-L1 (Chatterjee, et al., 2016; Deng, et al., 2016; Hettich, et al., 2016; Josefsson, et al., 2016; Lesniak, et al., 2016; Heskamp, et al., 2015; Maute, et al., 2015). Для этого, выбирали терапевтическое антитело AtzMab с точки зрения его человеческой и мышинной перекрестной реактивности, и демонстрировали его специфичность при детекции PD-L1 методами позитронно-эмиссионной томографии (PET), однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT) и оптической визуализации в ксенотрансплантатах TNBC и NSCLC человека у иммунокомпрометированных мышей и в модели 4T1 изогенной опухоли молочной железы (Chatterjee, et al., 2016; Lesniak, et al., 2016) (фигура 20A, фигура 20B, фигура 20C и фигура 20D). AtzMab связывает как человеческий, так и мышинный PD-L1, с высокой аффинностью с константами диссоциации (K_d) 0,43 нМ и 0,13 нМ, соответственно. (Irving, et al., 2012; Powles, et al., 2014). AtzMab находится на стадии клинической оценки для лечения прогрессирующего или метастатического рака мочевого пузыря (Powles, et al., 2014), меланомы (Hamid, et al., 2013), немелкоклеточного рака легких (Spigel, et al., 2013), почечно-клеточной карциномы (Cho, et al., 2013), трижды негативного рака молочной железы и некоторых других типов рака.

Было обнаружено, что накопление меченного радиоактивным изотопом AtzMab в опухолях является PD-L1-специфичным при обоих типах рака (немелкоклеточном раке легких (NSCLC) и трижды негативном раке молочной железы (TNBC)) (Chatterjee, et al., 2016; Lesniak, et al., 2016). Было также обнаружено, что накопление [^{111}In]AtzMab не является полностью зависимым от экспрессии PD-L1, что указывает на то, что давление интерстициальной жидкости, конвекция в опухоли и пространственные изменения экстравазации могут быть некоторыми из влияющих факторов, проблемой, которая часто обсуждается при использовании антител (Baxter, et al., 1989). Ксенотрансплантаты MDAMB231 TNBC характеризовались более высокими накоплениями в опухолях (процентом инъецируемой дозы на грамм; %ИД/г), чем

подкожные и ортотопические опухоли H2444 NSCLC, которые характеризовались более высокой экспрессией PD-L1, определяемой как проточной цитометрией, так и иммуногистохимическим анализом (Chatterjee, et al., 2016). Используя специфичность и универсальность нового радиоизотопного индикатора на основе пептида для визуализации PD-L1 методом PET, была изучена кинетика накопления AtzMab в PD-L1-экспрессирующих опухолях *in vivo* с применением совершенно другого подхода, который учитывает большое число факторов, влияющих на распределение антитела в опухолях и который может применяться к целому ряду PD-L1 таргетных антител.

2.1.3.3 Накопление терапевтического антитела против PD-L1 в опухолях, обнаруживаемое позитронно-эмиссионной томографией PD-L1. При оценке специфичности WL12 в отношении PD-L1, было обнаружено, что WL12 конкурирует с AtzMab за одно и то же место связывания на PD-L1. Это дает новые и ранее непредвидимые возможности для оценки AtzMab терапии в местах опухолей, когда это необходимо, с использованием PD-L1-направленной позитронно-эмиссионной томографии. Более ясное понимание распределения антител против PD-L1 в опухолях может влиять на дозирование антител в клинике и применяемый в процессе лечения мониторинг. Поэтому, проводилось исследование способности [⁶⁴Cu]WL12-PET оценивать связывание AtzMab с PD-L1 внутри опухолей. Накопление радиоактивности в hPD-L1 опухолях снижалось на 80% у мышей, которым и инъецировали AtzMab (20 мг/кг), что количественно оценивалось с помощью [⁶⁴Cu]WL12-PET и исследований по биораспределению (фигура 21A, фигура 21B и фигура 21C). Наблюдала пониженные, но не значительные, различия в поглощениях радиоактивности в других тканях, за исключением почек, что указывало на то, что [⁶⁴Cu]WL12 связывание является специфичным в отношении человеческого PD-L1 (Lesniak, et al., 2016). В результате *in vitro* исследований связывания было обнаружено, что немеченый WL12 ингибировал, зависящим от концентрации образом, связывание Cy5-конъюгированного AtzMab с PD-L1 с величиной IC₅₀ 37,8 нМ, подтверждая, что оба лиганда конкурируют за связывание PD-L1 (фигура 21D), хотя AtzMab обладал более высокой

активностью, чем WL12, при ингибировании [^{64}Cu]WL12 связывания, что позволяет осуществлять детекцию незанятых уровней PD-L1 в опухолях после дозирования AtzMab. В совокупности, эти результаты показывают, что сайты связывания WL12 и AtzMab перекрывают друг друга, указывая на потенциальную возможность использования [^{64}Cu]WL12-PET для оценки таргетного взаимодействия AtzMab и времени удержания (активность таргетного взаимодействия) в PD-L1-экспрессирующих опухолях. Применимость этого подхода была распространена на линии раковых клеток с нативным повышением экспрессии PD-L1. В ксенотрансплантатах трижды негативного рака молочной железы, наблюдали способность [^{64}Cu]WL12 осуществлять детекцию накопления AtzMab в высоко экспрессирующих PD-L1 ксенотрансплантатах MDAMB231 (фигура 22). Также обнаруживали значительное уменьшение поглощения визуализирующего средства для позитронно-эмиссионной томографии PD-L1 у мышей, получающих дозу 20 мг/кг AtzMab.

Есть основания полагать, что возможно аналогичное применение с другими терапевтическими антителами направленного действия в отношении PD-L1, такими как авелумаб (AvMab). AvMab представляет собой человеческое IgG1 антитело, которое в настоящий момент проходит фазу III клинических испытаний в отношении нескольких типов рака, включающих немелкоклеточный рак легких (NCT02395172), прогрессирующую почечно-клеточную карцинома и рак желудка. Исследовали кристаллическую структуру комплекса PD-L1 с AvMab, и было обнаружено, что AvMab взаимодействует с некоторыми из тех же самых аминокислот на PD-L1 (R113, D61 и E58), что и WL12 (Liu, et al., 2016), что указывает на возможное эффективное применение радиоизотопных индикаторов на основе WL12 для оценки *in vivo* таргетного взаимодействия с участием AvMab и, возможно, с участием других терапевтических mAbs, направленных на PD-L1. Эти исследования позволяют обосновать возможность применения позитронно-эмиссионной томографии PD-L1 для оценки существующей mAb терапии в отношении PD-L1 с точки зрения активности ее направленного воздействия.

Неинвазивная количественная оценка взаимодействия PD-L1 с лечебно-диагностическими антителами

3.1 Обзор. На терапевтическое применение антител, нацеленных на лиганд 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), приходится почти четверть клинических испытаний ингибиторов иммунной контрольной точки. Общие уровни PD-L1, их занятость терапевтическими средствами для PD-L1 и соответствие дозирования степени и продолжительности таргетного взаимодействия в опухолях для достижения оптимального иммунного ответа остаются неизвестными. На занятость PD-L1 в опухолях могут влиять динамические изменения экспрессии PD-L1, а также внутренние и внешние параметры опухоли, которые изменяют концентрацию антител в плазме и в опухоли. Однако, такие ключевые изменения не учитываются при проведении оценок периферической фармакокинетики и фармакодинамики. Для устранения этого пробела в понимании взаимосвязи между дозой и медикаментозным воздействием терапевтических средств для PD-L1, был исследован меченный радиоактивным изотопом связывающий PD-L1 пептид, который позволял количественно определять динамические изменения экспрессии PD-L1. Структурный анализ показал совпадение взаимодействий пептида и терапевтического моноклонального антитела (mAb) с PD-L1, что позволяет измерять занятость терапевтического mAb в опухолях с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET). Исследования на многих ксенотрансплантатных моделях методом визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) и биораспределения показали, что изменяющаяся экспрессия PD-L1 и занятость PD-L1 терапевтическими антителами могут быть определены количественно. Кроме того, измеряли занятость PD-L1 в опухоли тремя различными антителами и количественно определяли влияние дозы и времени на занятость PD-L1 в опухоли. Позитронно-эмиссионная томографии PD-L1 на основе пептида является перспективным инструментом для оптимизации дозы и схем лечения с целью снижения связанных с иммунитетом побочных эффектов.

Более конкретно, в раскрытом объекте настоящего изобретения предлагается использовать количественную визуализацию методом

позитронно-эмиссионной томографии (PET) для решения проблем, связанных с характеристикой уровней экспрессии PD-L1 и направленного взаимодействия PD-L1 и mAb в опухоли *in vivo*. Этот подход является эффективным для повторных измерений таргетной экспрессии в опухолях (Willman,etal.,2008) и для разработки и оценки лекарственных средств, но он используется только в редких случаях для исследования занятости рецепторов в онкологии (Rathkopf,etal.,2013), и не применяется конкретно для фармакокинетической и фармакодинамической оценки PD-L1 или PD-1 mAbs (Peterson,etal.,2008;Linden,etal.,2006).

Недавно был разработан низкомолекулярный пептид, меченный радиоактивным изотопом ^{64}Cu , [^{64}Cu]WL12, который связывает с высокой аффинностью и специфичностью человеческий PD-L1 и позволяет получать высококонтрастные изображения в течение 120 мин после введения радиоизотопного индикатора (Chatterjee,etal.,2017). В этом примере описывается [^{64}Cu]WL12-PET для детекции PD-L1 и количественной оценки динамических изменений экспрессии PD-L1 в экспериментальных моделях рака легкого и рака молочной железы. Оценивали возможность использования [^{64}Cu]WL12 PET для оценки взаимодействия PD-L1 с тремя различными mAbs, одобренными Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами, атезолизумабом, авелумабом и дурвалумабом (DurMab). Кроме того, неинвазивно оценивали соответствие PD-L1 mAb дозы степени и продолжительности взаимодействия PD-L1 в опухоли.

3.2 *Уровень техники.* Противораковая иммунотерапия (CIT) позволяет достигать долговременных улучшений в случае различных злокачественных новообразований. Одной из предпочтительных мишеней для противораковой иммунотерапии является лиганд 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1) иммунной контрольной точки. PD-L1 экспрессируется многими опухолями в качестве средства уклонения от действия противоопухолевых цитотоксических Т-клеток (Topalian,etal.,2016), который вызывает подавление иммунитета через непосредственное связывания рецептора PD-1 (Okazaki,etal.,2007;Topalian,etal.,2015). На стадии клинических исследований находятся многочисленные PD-L1 таргетные

моноклональные антитела (mAbs), которые ингибируют взаимодействие PD-L1:PD-1, и почти 30% пациентов, подвергающихся этим формам терапии, демонстрируют долговременные улучшения (Topalian,etal.,2015;Lipson,etal.,2015). Однако, несмотря на достигнутые успехи, отсутствует полное понимание биологических механизмов, которые способствуют нетипичным видам ответных реакций, таким как замедленный или комплексный регресс опухоли, что ставит клинические проблемы и ограничивает возможность клиницистов в усовершенствовании методов терапии контрольной точки.

Преимущественно считают, что терапевтическое действие моноклональных тел (mAbs) против PD-L1 происходит внутри микроокружения опухоли (Topalian,etal.,2015). Однако, наличие фармакодинамических (PD) данных является ограниченным; они не отражают таргетное взаимодействие в месте воздействия (в опухоли), они приводятся в ограниченном числе исследований, и их получают с использованием мононуклеаров периферической крови (PBMCs). Для антитела BMS-936559 против PD-L1, сообщалось о равномерной таргетной занятости 64-70% для доз в диапазоне от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг (Brahmer,etal.,2012). Многое остается невыясненным по поводу расположения PD-L1 mAbs в наиболее подходящем месте, то есть, в опухоли, и соответствия дозирования степени и продолжительности таргетного взаимодействия для обеспечения оптимального иммунного ответа.

Наиболее хорошо изученным прогнозирующим биомаркером для терапевтического мониторинга PD-L1/PD-1 таргетных терапий является иммуногистохимическое (ИHC) исследование PD-L1 (Gibney,etal.,2016). Однако, этот метод имеет существенные недостатки, так как он требует использование биоптатов ограниченной доступности, и он может некорректно отражать изменения во времени иммунного микроокружения опухоли (TME) и внутриопухолевую и межопухолевую гетерогенность экспрессии PD-L1 (Mansfield,etal.,2016;McLaughlin,etal.,2016). Существует неудовлетворенная потребность в неинвазивной оценке уровней экспрессии PD-L1, динамики и расположения терапевтических средств для PD-L1 в первичных и метастатических опухолях, и

проведения этой оценки стандартным клиническим методом визуализации.

3.3 Результаты

3.3.1 Структурный анализ и *in vitro* подтверждение PD-L1 взаимодействия с WL12 и PD-L1 mAbs. WL12 представляет собой пептид из 14 аминокислот, который ингибирует PD-L1:PD-1 взаимодействие с высокой аффинностью (IC_{50} 20 нМ) (Chatterjee,etal.,2017). В результате ранее проведенного анализа на основе моделирования на молекулярном уровне было сделано предположение о перекрытии на поверхности взаимодействия PD-L1:WL12 и PD-L1:PD-1 с четырьмя аминокислотами PD-L1 (Y56, E58, D61 и A113), которое способствует протеканию значительных молекулярных взаимодействий (Chatterjee,etal.,2017). Погребенная поверхность PD-L1 в комплексе с терапевтическим телом атезолизумаб (AtzMab) ($2,106 \text{ \AA}^2$) значительна больше, чем погребенная поверхность PD-1 ($1,970 \text{ \AA}^2$) (Lee,etal.,2017). Не приводя в качестве доказательства какую-либо конкретную теорию, тем не менее, можно предположить, что поверхность взаимодействия WL12 на PD-L1 также перекрывается с поверхностью взаимодействия клинически доступных терапевтических mAbs, так как они также предназначены для ингибирования PD-L1:PD-1 взаимодействия. Для проверки этого предположения, предсказанные конформационные формы связывания WL12 сравнивали с конформационными формами связывания PD-L1 mAbs. Перекрытие контактов АА между всеми mAbs, а также PD-1 и WL12, выявило общий домен связывания, состоящий из PD-L1 остатков Y56, E58, A113, M115 и Y123. Как было выявлено при визуализации поверхностей молекул PD-L1 (фигура 33А, фигура 34А), область перекрывания (бирюзовый цвет) образует глубокий карман и действует в качестве опорной точки для всех точек взаимодействия. Относительно площади поверхности, AtzMab (красный цвет) взаимодействует с большей частью поверхности PD-L1 с петлевыми фрагментами из антитела, генерируя молекулярные контакты с остатками на все сторонах общего ядра связывания с перекрыванием с поверхностями взаимодействия от PD-1 (пурпурный цвет), WL12 (зеленый цвет), авелумаба (AveMab, оранжевый цвет) и дурвалумаба (DurMab, голубой цвет).

Для подтверждения данных описанного выше структурного анализа, приготавливали Cy5-меченые AtzMab, AveMab и DurMab путем конъюгации антитела на выпускаемом промышленностью Cy5 флуоресцентном N-гидроксисукцинимидном эфира, затем проводили исследования по конкурирующему ингибированию с WL12 в клетках CHO, конститутивно экспрессирующих PD-L1 (Cho-hPD-L1), и в клетках рака молочной железы MDAMB231, которые по своей природе экспрессируют PD-L1 (Chatterjee,etal.,2016). Наблюдали зависящее от дозы WL12 ингибирование связывание Cy5-PD-L1 mAb с PD-L1 в диапазоне ингибирующих концентраций 2-5 нМ (фигура 33B). Проводили также испытания на клетках HCC827 и H226 немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). Каждые из клеток, которые по своей природе экспрессируют PD-L1, инкубировали с флуоресцентными версиями AtzMab, AveMab и DurMab в присутствии 5 нМ WL12. Метод проточной цитометрии показывал значимое уменьшение ($P < 0,001$) флуоресценции связывания, что дополнительно демонстрировало способность WL12 нарушать взаимодействия антитело-PD-L1 (фигура 34C и фигура 34D). Дополнительное подтверждение специфичности взаимодействия WL12:PD-L1 было получено в результате того, что не отмечалось изменения флуоресценции связывания при использовании MDX1338, CXCR4-специфического антитела. PD-L1-положительные (HCC827, H226, MDAMB231 и hPD-L1) и PD-L1-негативные (Sum149 и CHO) клетки инкубировали с аналогом WL12, меченный радиоактивным изотопом ^{64}Cu ($[^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$). Ранее было показано, что аналоги WL12 связывают PD-L1 с высокой аффинностью ($\text{IC}_{50} < 20$ нМ) и селективностью *in vitro* и *in vivo* в клетках hPD-L1/CHO, но это не было подтверждено на линиях раковых клеток человека с изменяющейся экспрессией (Chatterjee,etal.,2017). Наблюдали высокое зависимое от экспрессии поглощение $[^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$ в PD-L1 положительных клетках по сравнению с PD-L1 негативными клетками ($P < 0,0001$). Кроме того, обнаруживали значимое блокирование поглощения $[^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$ во всех PD-L1 положительных клетках ($P < 0,0001$) в случае обработки с помощью 60 нМ mAbs по сравнению с контрольной обработкой с помощью PBS, в качестве дополнительной проверки специфичности связывания PD-L1 (фигура 33C). Эти

результаты указывают на то, что [^{64}Cu]WL12 может использоваться для детекции уровней свободного PD-L1 в опухолях и для мониторинга взаимодействия PD-L1 с антителом с образованием PD-L1 mAbs.

3.3.2 Количественная оценка взаимодействия PD-L1 и AtzMab в опухоли. Для неинвазивной *in vivo* оценки взаимодействия PD-L1 с терапевтическими mAbs в опухоли, проводили исследования на ксенотрансплантатных моделях немелкоклеточного рака легких (NSCLC). Эти модели были выбраны в связи с тем, что почти 50% случаев немелкоклеточного рака легких (NSCLC) являются PD-L1-положительными, и иммуногистохимическое исследование PD-L1 используют в качестве прогнозирующего биомаркера у пациентов с NSCLC, подвергающихся терапии иммунной контрольной точки (Mansfield, et al., 2016). Мышей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью, несущих ксенотрансплантаты из H226 и HCC827 клеток, которые характеризуются низкой и умеренной экспрессией PD-L1, соответственно (фигура 36A), внутривенно вводили разовую дозу AtzMab (20 мг/кг в течение 24 часов). Изображения, полученные методом позитронно-эмиссионной томографии через 2 часа после инъекции [^{64}Cu]WL12, показали более высокое накопление [^{64}Cu]WL12 в HCC827 опухолях по сравнению с H226. Наблюдается четкое уменьшение накопления радиоактивности в опухолях мышей, которым вводили AtzMab, что указывает на более низкие уровни доступных PD-L1 сайтов по сравнению с контрольными мышами (фигура 35A и фигура 35B). Результаты, полученные визуализацией методом позитронно-эмиссионной томографии, дополнительно подтверждали *ex vivo* измерениями биораспределения (фигура 35D и фигура 35E, фигура 36B и фигура 36C), которые показали значимые снижения величин [^{64}Cu]WL12 процента инъецируемой дозы на грамм (%ИД/г) у мышей, обработанных с помощью AtzMab, по сравнению с контрольными мышами, обработанными с помощью физиологического раствора: 34% ($P < 0,0001$) у мышей с ксенотрансплантами H226 и 47% ($P < 0,001$) у мышей с ксенотрансплантами HCC827. Уровни экспрессии PD-L1 подтверждали иммуногистохимическим исследованием PD-L1 в ксенотрансплантатах (фигура 35C и фигура 35F). Эти результаты показывают, что [^{64}Cu]WL12 может быть

использован для количественной оценки *in vivo* таргетирования PD-L1 в опухоли с помощью AtzMab.

Для оценки воздействия разовой дозы AtzMab на различные целевые уровни PD-L1 в опухолях, проводили исследования методом позитронно-эмиссионной томографии (PET) и исследования биораспределения в опухолях, полученных из клеточной линии CHO-hPDL1, которая характеризовалась от четырех до десяти раз более высокой экспрессией PD-L1, чем клетки немелкоклеточного рака легких (NSCLC) (фигура 36). Мыши, несущие опухоль CHO-hPDL1/CHO, которым вводили AtzMab (20 мг/кг в течение 24 часов), демонстрировали значимое снижение поглощения [^{64}Cu]WL12 в опухолях CHO-hPDL1 по сравнению с контрольными мышами (фигура 35G). Исследования биораспределения показали 77% уменьшение [^{64}Cu]WL12 связывание в опухолях CHO-hPDL1 по сравнению с опухолями, подвергавшимися воздействию AtzMab (фигура 35H, фигура 36D) ($P < 0,0001$), что демонстрирует возможность измерения таргетного воздействия AtzMab на PD-L1 в опухоли. Низкий уровень поглощения [^{64}Cu]WL12 обнаруживали в PD-L1-негативных CHO опухолях, который был аналогичен уровню поглощения в hPD-L1 опухолях, подвергнутых воздействию AtzMab. Эти наблюдения подтверждались сильной и слабой иммунологической реактивностью, обнаруживаемой в hPD-L1 и CHO опухолях, соответственно (фигура 35I). Эти результаты демонстрируют, что [^{64}Cu]WL12-PET позволяет осуществлять детекцию градуированных уровней экспрессии PD-L1 в опухолях, и что разовая доза AtzMab 20 мг/кг может взаимодействовать с широким диапазоном уровней PD-L1 в опухолях.

3.3.3. Количественная оценка динамических изменений экспрессии PD-L1. Известно, что в ответ на воздействие различных цитокинов PD-L1 подвержен важной повышающей регуляции интерфероном гамма (IFN γ), которая способствует динамической и пространственно-временной гетерогенности экспрессии PD-L1 (Taube, et al., 2015; Taube, et al., 2012). Оценивали надежность [^{64}Cu]WL12 для количественного определения индуцибельной экспрессии PD-L1 в опухолях *in vivo* с целью определения, может

ли быть подвергнуто мониторингу методом [^{64}Cu]WL12-PET блокирование такого повышено регулируемого PD-L1 путем воздействия AtzMab (фигура 37A, фигура 37B, фигура 37C, фигура 37D, фигура 37E и фигура 37F).

Для этого, генерировали линию клеток A549 NSCLC с доксициклин-индуцибельной экспрессии PD-L1 (A549-iPD-L1). A549 представляет собой клеточную линию Kras G12S аденокарциномы легкого, которая экспрессирует в низких количествах PD-L1 на исходном уровне. Эти клетки трансфектировали с PD-L1 в комплексный лентивирусный pINDUCER20 вектор (Meerbrey,etal.,2011), отбирали с помощью G418, подтверждали его пригодность для индукции PD-L1 методом проточной цитометрии (фигура 37A) и *in vitro* и *in vivo* исследований. Cy5-PD-L1-mAbs связывание с доксициклин-обработанными A549-iPDL1 клетками блокировали с помощью WL12, что подтверждало специфичность WL12 (фигура 37B). Кроме того, инкубация клеток с [^{64}Cu]WL12 показало увеличение в 5,5 раз поглощение радиоактивности в обработанных доксициклином клетках по сравнению с необработанными и содержащими низкие количества PD-L1 клетками A549 ($P < 0,0001$). [^{64}Cu]WL12 связывание с доксициклин-обработанными клетками A549-iPDL1 значительно снижалось (65%, $P > 0,0001$) в присутствии 60 нМ AtzMab, AveMab и DurMab (фигура 37C). Эти *in vitro* исследования были подтверждены *in vivo* исследованиями, показавшими, что накопление [^{64}Cu]WL12 в A549-iPDL1 NSCLC опухолях через 72 часа после обработки доксициклином было на 65% выше, чем в контрольных A549 опухолях ($P > 0,0001$). Это увеличение поглощения [^{64}Cu]WL12 в опухолях снижалось на > 75% в группе, которую подвергали обработке 20 мг/кг AtzMab, по сравнению с контрольными A549 опухолями, что было количественно оценено методом [^{64}Cu]WL12-PET и исследованиями по биораспределению (фигура 37D и фигура 37E). Иммуногистохимический анализ опухолей обнаруживал интенсивный PD-L1 сигнал в A549-iPDL1 опухолях, но не в A549 опухолях, подтверждая тем самым результаты по визуализации и биораспределению (фигура 37F). Взятые в совокупности, эти результаты демонстрируют потенциальную возможность использования [^{64}Cu]WL12 для детекции динамических

изменений уровней экспрессии PD-L1 и ее блокирования с помощью AtzMab. Соответственно, ожидается, что метод позитронно-эмиссионной томографии (PET) будет играть ключевую роль в количественной оценке динамических изменений экспрессии PD-L1 в процессе стандартной клинической деятельности, предлагая новый подход в информационном обеспечении при принятии терапевтических решений.

3.3.4. Количественная оценка взаимодействия PD-L1 опухоли с различными антителами. Были разработаны меченные радиоактивным изотопом антитела против PD-L1, и была продемонстрирована потенциальная возможность их использования для неинвазивной оценки экспрессии PD-L1 в ксенотрансплантатах опухоли человека и моделях изогенных опухолей на мышах (Chatterjee, et al., 2016; Heskamp, et al., 2015; Maute, et al., 2015; Deng, et al., 2016; Hettich, et al., 2016; Josefsson, et al., 2016). Несмотря на то, что конъюгаты таких меченных радиоактивным изотопом антител в настоящее время используются в клинике для детекции PD-L1 (NCT02453984) и визуализации других опухолеспецифичных белков (Gebhart, et al., 2016) и для определения кинетики антител, тем не менее, их повседневное применение в медицинской практике ограничено. Для усиления контраста и детекции очага поражения (Pandit-Taskar, et al., 2015; Oosting, et al., 2016), необходимы радиоизотопные индикаторы с более короткими временами выведения (несколько часов против нескольких суток) (Wu, 2014). Дополнительным ограничением является то, что результаты наблюдений, проведенных с использованием меченных радиоактивным изотопом антител, являются высокоспецифичными для исследуемого антитела и зависят от таких свойств антитела, как валентность, форма, размер, изоэлектрическая точка и доза, каждое из которых оказывает влияние на его фармакокинетику. Такие присущие моноклональным антителам (mAbs) биофизические характеристики также влияют на период полувыведения из плазмы, на воздействие на ткани и, безусловно, на их эффективность. Необходим новый подход, который: (i) обеспечивает таргетное взаимодействие PD-L1 с антителами, и вместе с тем (ii) принимает во внимание свойства моноклональных антител (mAbs), и (iii) и применим ко всем

антителам.

Оценивали возможности метода [^{64}Cu]WL12-PET неинвазивно количественно оценивать PD-L1 взаимодействие в опухоли с каждым из трех одобренных Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами антител, AtzMab, AveMab и DurMab. Иммунодефицитных мышей, несущих опухоль MDAMB231, подвергали воздействию AtzMab или AveMab, или DurMab, и через 24 часа получали их изображение методом [^{64}Cu]WL12-PET (фигура 39А, фигура 39В, фигура 39С и фигура 39D). У всех мышей, подвергнутых воздействию антител, сигнал в опухолях был низким по сравнению с контрольными мышами, подвергнутыми воздействию физиологического раствора, что подтверждало низкие уровни свободного PD-L1 из опухоли, в которой происходило взаимодействие PD-L1 с mAbs и блокирование ими радиоизотопного индикатора. Ex vivo количественные оценки опухолей подтверждали эти наблюдения и демонстрировали приблизительно на 60% меньшее поглощение [^{64}Cu]WL12 в опухолях мышей, подвергнутых воздействию mAb ($P < 0,0001$), по сравнению с контрольными мышами, подвергнутыми воздействию физиологического раствора (фигура 39Е), через 120 минут после инъекции. Иммуногистохимический анализ контрольных мышей, подвергнутых воздействию физиологического раствора, показывал от умеренной до высокой PD-L1 интенсивность в опухолях (фигура 39F). Эти результаты являются демонстрацией того, что взаимодействие в опухоли PD-L1 с терапевтическими mAbs может быть количественно оценено методом [^{64}Cu]WL12-PET, вне зависимости от различающихся биофизических свойств, кинетики в плазме и тканях каждого антитела.

3.3.5. *Влияние дозы на занятость PD-L1 в опухоли.* Кинетика антитела в опухолях определяется как внутренними, так и внешними параметрами опухоли (Agoram, 2009). Недавно было обнаружено, что факторы, помимо самой по себе экспрессии PD-L1, могут снижать накопление PD-L1-таргетного терапевтического AtzMab и его мышино-химерного антитела (PR0304397) в опухолях немелкоклеточного рака легких (NSCLC), трижды негативного рака молочной железы (TNBC) и в опухолях толстой кишки (Chatterjee, et al., 2016). Кроме того, при дозах менее 1 мг/кг,

системно инъецируемое меченное радиоактивным изотопом антитело PRO304397 против PD-L1 в основном ассоциировалось с сосудистой сетью опухоли, и характеризовалось минимальной диффузией в паренхиму опухоли в моделях PD-L1-экспрессирующей опухоли на изогенных мышцах (Deng,etal.,2016). Эти результаты могут быть объяснены такими факторами, как повышенное внутриопухолевое тканевое давление (Baxter,etal.,1989;Baxter,etal.,1990), которое препятствует накоплению mAbs в опухолях, что способствует возникновению резистентности (Goel,etal.,2011). Такие эффекты могут также препятствовать доступу крупных по размеру молекул PD-L1-направленных средств к опухолевым клеткам-мишеням и иммунным инфильтратам. В научных публикациях отсутствуют сведения об измерении занятости PD-L1 и PD-1 терапевтическими средствами в опухоли, и эти измерения ограничивались оценками, сделанными с использованием моноклеарных клеток периферической крови.

Для оценки влияния дозы на занятость PD-L1 в опухоли, мышам, несущим MDAMB231 опухоли, инъецировали возрастающие дозы AtzMab от 0,009 до 24 мг/кг массы тела. После истечения двадцати четырех часов, проводили исследования по визуализации и биораспределению через 2 часа после инъекции [^{64}Cu]WL12. Изображения мышей, полученные методом позитронно-эмиссионной томографии (PET), которым вводили 0,06 мг/кг, показывали отсутствие различий в поглощении [^{64}Cu]WL12 при сравнении с контрольными мышами, которым не вводили антитело, что указывало на низкую занятость PD-L1 антителом AtzMab в опухоли (фигура 41A). При дозе 0,6 и 3,2 мг/кг, наблюдалось пропорциональное уменьшение интенсивности сигнала в опухолях, что указывало, в случае дозы 3,2 мг/кг, на почти 100% таргетное взаимодействие антитела в опухоли.

Накопленную радиоактивность (%ИД/г) в опухолях затем использовали для аппроксимации сигмоидальной E_{max} модели ингибирования. Данные %ИД/г соответствующим образом аппроксимировали и описывали взаимосвязь между дозой антитела AtzMab, используемого в этом эксперименте, и снижением свободных PD-L1 лигандов в опухоли (фигура 41B и фигура 41C),

обнаруживаемых с использованием пептидного радиоизотопного индикатора [^{64}Cu]WL12. Дозу AtzMab, действие которой приводило к 50% максимального взаимодействия с PD-L1 в опухоли (ID_{50}) или максимальному частичному снижению свободных PD-L1 лигандов от исходного значения ($I_{\max}$), оценивали равной 0,43 мг/кг (таблица 2). Значения ID_{90} и ID_{96} , действие которых приводило к 90% и 96% $I_{\max}$, соответствовали 0,87 мг/кг и 1,19 мг/кг, соответственно. Эти уровни доз сравнимы с дозой 1 мг/кг, сообщенной для PRO304397 в публикации Deng,etal.,2016. Полагая, что аналогичная средняя величина V_{ss} равна 50 мл/кг для антитела против PD-L1 и химерного антитела против PD-L1 PRO304397(21), были приблизительно оценены, исходя из значений ID_{50} , ID_{90} и ED_{96} , ожидаемые средние значения концентраций в плазме, которые составляли 59 нМ (8,6 мкг/мл), 120 нМ (17,4 мкг/мл) и 164 нМ (23,8 мкг/мл), соответственно. Эти результаты указывают на возможность использования измерений, сделанных в опухоли, для выбора и оптимизации дозы.

Взаимодействие антител с их мишенью отличается от взаимодействия низкомолекулярных соединений, при котором связывание антитела может оказывать влияние на нормальную кинетику PD-L1, такую как стабилизация или интернализация PD-L1, и выработку анти терапевтических антител, которые могли бы оказывать значительное влияние на кинетику антитела в опухоли и сыворотке крови (Tabrizi,etal.,2006). В ранее проведенных фармакокинетических исследованиях AtzMab сообщалось о нелинейной зависимости PK ниже дозы 0,6-1 мг/кг и линейной зависимости PK выше дозы 1 мг/кг, и отмечалась тенденция к снижению концентраций антитела в сыворотке крови у пациентов, что приводило к выработке анти терапевтических антител (Stroh,etal.,2017). Однако, влияние таких свойственных и несвойственных для опухоли параметров на PK и занятость PD-L1 антителом в опухоли неизвестно.

Таблица 2. Влияние дозы на занятость PD-L1 в опухоли

Параметры фармакодинамической модели, единицы	Среднее значение параметра
--	-------------------------------

	(% относительно стандартной ошибки)
Исходный уровень в свободных PD-L1 лигандах, %ИД/г	5,91 (1%)
$I_{\max}$	0,57 (3%)
ID ₅₀ , мг/кг	0,43 (10%)
Коэффициент Хилла	3,12 (19%)
Остаточная ошибка, %ИД/г	0,44 (14%)

Для исследования возможности [⁶⁴Cu]WL12-PET по детекции изменения во времени кинетики антитела в опухоли, иммунодефицитным мышам, несущим опухоль MDAMB231, инъецировали 0,6 и 10 или 20 мг/кг дозу AtzMab, которая продуцировала нелинейную и линейную кинетику, соответственно, и проводили визуализацию методом позитронно-эмиссионной томографии (PET) и исследования биораспределения через 24 и 120 часов. Через 24 часа, наблюдалось значительное снижение поглощения [⁶⁴Cu]WL12, отражавшееся также на величинах поглощения в опухоли во всех трех группах дозирования, по сравнению с контрольными группами, в которых не вводили антитело (фигура 41D и фигура 41E). Через 120 часов, наблюдалось значительное увеличение поглощения [⁶⁴Cu]WL12 в группе с введением дозы 0,6 мг/кг по сравнению с испытанием через 24 часа. В отличие от этого, не наблюдалось значительного временного различия в поглощении [⁶⁴Cu]WL12 в группах с дозированием 10 или 20 мг/кг антитела. Через 120 часов, поглощение [⁶⁴Cu]WL12 в опухоли было таким же, как в случае дозирования 0,06 мг/кг и в контрольных группах, в которых вводили физиологический раствор, что позволяло сделать предположение об удалении лекарственного средства из опухоли и отражало нелинейность значений PK для AtzMab при более низких дозах. Эти результаты показывают, что в модели на мышах с помощью метода [⁶⁴Cu]WL12-PET могут быть оценены зависящие от дозы и зависящие от времени изменения во взаимодействии PD-L1.

3.3.6. Обсуждения

В настоящее время проводятся сотни клинических испытаний терапевтических препаратов для иммунной контрольной точки, и примерно 25% из них рассматривают PD-L1 в качестве мишени.

Поскольку только 30% пациентов, подвергающихся лечению терапевтическими препаратами, направленными на PD-L1, реагируют на лечение, в настоящее время проводятся исследования молекулярных и клеточных основ ответа и резистентности при применении этих терапевтических методов, используя транскрипционные, генетические и эпигенетические подходы. Соответствие дозы накоплению лекарственного средства и насыщению мишени в опухоли, которое обуславливает эффективность, является неизвестным. Кроме того, большой размер молекул терапевтических антител ограничивает их проникновение в опухоль и создает конкретные проблемы при фармакодинамической оценке на месте действия. К настоящему времени еще не разработан эффективный метод, который позволял бы учитывать как внутренние, так и внешние параметры опухоли, получать в режиме реального времени данные о насыщенности/занятости PD-L1 в опухоли, и который можно было бы широко применять на практике. Этот недостаток знаний затрудняет выбор дозы, оптимизацию дозы, разработку терапии и оптимизацию терапии для снижения токсичности. В настоящем исследовании показано, что меченный радиоактивным изотопом пептид, связывающийся с PD-L1, позволяет неинвазивно осуществлять детекцию изменений и динамики уровней экспрессии PD-L1, и может использоваться для измерения занятости в опухоли с учетом собственных параметров опухоли (экспрессии PD-L1, рециклинга, тканевого давления) и внешних параметров (изотипа антитела, кинетики, анти терапевтического антитела, катаболизма), что в результате позволяет получить универсальное средство для мониторинга терапевтической активности ингибирования PD-L1:PD-1 взаимодействия с помощью антител против PD-L1 в опухоли.

Несмотря на то, что для оценки экспрессии PD-L1 в опухолях ранее уже были разработаны клинические испытания на основе иммуногистохимического анализа (Herbst, et al., 2014; Roach, et al., 2016; Meng, et al., 2015), тем не менее, иммуногистохимическое исследование PD-L1 охватывает только малую часть (0,1%) единичного очага поражения. Такой подход имеет существенные недостатки, так как экспрессия PD-L1 в

микроокружении опухоли является пространственно и временно гетерогенной, а ответные реакции, возникающие при применении иммунотерапии, являются по своей природе отсроченными, сложными и заторможенными. Кроме того, получаемые биопсией образцы ткани для проведения испытаний, как правило, имеются в ограниченных количествах, и они могут потребоваться для определения молекулярного профиля с целью идентификации онкогенных мутаций, представляющих собой возможные мишени, в других сигнальных путях (например, BRCA1, BRCA2, PARP), которые обеспечивают восприимчивость или резистентность к существующим методам лечения (Nolan, et al. al., 2017). Такая высокая ценность образцов часто делают их практически непригодными для проведения множественных оценок PD-L1 для надежного отображения экспрессии PD-L1 (Gibney, et al., 2016). Эти проблемы усугубляются в случае пациентов с метастазирующей опухолью, для которых интенсивно изучают возможность применения терапии иммунной контрольной точки. Такие факторы не позволяют достичь существенных успехов в усовершенствовании иммунотерапевтических методов. Динамическая природа как экспрессии PD-L1, так и более широкого иммунного микроокружения опухоли, вызывает необходимость разработки радиоизотопных индикаторов для позитронно-эмиссионной томографии, которые позволяют быстро оценить микроокружение опухоли. Описанные в настоящем изобретении исследования с использованием $[^{64}\text{Cu}]\text{WL12}$ показывают, что в условиях стандартной клинической деятельности могут быть количественно определены переменные и динамические изменения экспрессии PD-L1, что является важным клиническим аспектом при отборе пациентов и для мониторинга применяемой терапии.

PD-L1 терапевтические антитела стали важными лекарственными средствами при проведении противораковой иммунотерапии. В случае соединений с небольшим размером молекул, для подбора дозы при заболеваниях центральной нервной системы и прогнозирования фармакологического ответа повседневно используют измерения *in vitro* аффинности связывания и исследование занятости (Lee, et al., 2006). Однако, в случае соединений с крупными молекулами, таких как антитела, возникает необходимость в

прогнозировании *in vivo* занятости рецептора на основе *in vitro* аффинности связывания (Agoram,2009). На концентрации антител в опухолях влияют различные присущие опухоли параметры, такие как антигенная плотность и функциональный цикл, опухолевая масса и перфузия в опухоли, которые ограничивают проникновение моноклональных антител (mAbs) в опухоль. На концентрации mAbs в опухоли и плазме дополнительно влияют внешние для опухоли факторы, такие как, доза, вариабельность пациента, кахексия и выработка анти терапевтических антител (Sheng,etal.,2017). Существующие фармакокинетические/фармакодинамические модели прогнозирования основаны на *in vitro* измерениях и измерениях на основе моноклеарных клеток периферической крови для определения оптимальной дозы (Deng,etal.,2016). Однако, в раскрытом объекте настоящего изобретения показано, что для измерения занятости PD-L1 терапевтическими антителами в опухоли в реальном режиме времени и неинвазивно может быть использован метод позитронно-эмиссионной томографии.

Меченные радиоактивным изотопом антитела, такие как атезолизумаб, при поддержке периферийных фармакодинамических оценок и фармакокинетического/фармакодинамического моделирования, повседневно используют для определения уровней дозирования mAb, необходимых для достижения требуемой степени занятости PD-L1 в опухоли (Deng,etal.,2016). Эти измерения и полученные на основе математического моделирования предсказания степени занятости часто являются присущими только для данного антитела, так как на концентрации антител в плазме и опухоли влияют изотип антитела и биофизические свойства, такие как заряд и валентность, что ограничивает применение результатов таких исследований к другим моноклональным антителам против PD-L1 (Kamath,2016). Требуется инструмент, который может быть использован для оценки кинетики антитела и возможности таргетного взаимодействия в опухоли для постоянно расширяющегося множества терапевтических моноклональных антител против PD-L1. Раскрытый объект настоящего изобретения решает эту задачу. Исследования на основе компьютерного моделирования эксперимента в сочетании с *in vitro* и *in vivo* данными, полученными методом

позитронно-эмиссионной томографии с использованием WL12, показывают возможность количественной оценки насыщения/занятости PD-L1 в опухоли, то есть методологии, которая применима ко всем терапевтическим антителам против PD-L1 при клинических испытаниях.

В совокупности, раскрытые в настоящем изобретении данные показывают, что динамические изменения экспрессия PD-L1 в опухолях и насыщение/занятость PD-L1 терапевтическими антителами могут быть неинвазивно количественно оценены с двумя отличительными особенностями, а именно, независимо от характеристик антител и с учетом присущих опухоли параметров и внешних для опухоли параметров. Предполагается, что раскрытые в настоящем изобретении результаты по влиянию дозы да занятость PD-L1 в опухоли для трех отличающихся терапевтических антител, AtzMab, AveMab, DurMab, представляют большую важность с точки зрения оценки терапевтического ответа и эффективности дозирования.

3.3.7. Краткие выводы.

Раскрытый объект настоящего изобретения показывает, что меченный радиоактивным изотопом пептид, связывающийся с PD-L1, позволяет неинвазивно осуществлять детекцию изменений и динамики уровней экспрессии PD-L1, и может использоваться для измерения занятости в опухоли с учетом собственных параметров опухоли (экспрессии PD-L1, рециклинга, тканевого давления) и внешних параметров (изотипа антитела, кинетики, анти терапевтического антитела, катаболизма), что в результате позволяет получить универсальное средство для мониторинга терапевтической активности ингибирования PD-L1:PD-1 взаимодействия с помощью антител против PD-L1 в опухоли.

Исследования с использованием [^{64}Cu]WL12 показывают, что в условиях стандартной клинической деятельности могут быть количественно определены переменные и динамические изменения экспрессии PD-L1, что является важным клиническим аспектом при отборе пациентов и для мониторинга применяемой терапии.

Существующие фармакокинетические/фармакодинамические модели прогнозирования основаны на *in vitro* измерениях и измерениях на

основе моноклеарных клеток периферической крови для определения оптимальной дозы (Deng,etal.,2016). Однако, в раскрытом объекте настоящего изобретения показано, что для измерения занятости PD-L1 терапевтическими антителами в опухоли в реальном режиме времени и неинвазивно может быть использован метод позитронно-эмиссионной томографии.

Требуется инструмент, который может быть использован для оценки кинетики антитела и возможности таргетного взаимодействия в опухоли для постоянно расширяющегося множества терапевтических моноклональных антител против PD-L1. Раскрытый объект настоящего изобретения решает эту задачу. Исследования на основе компьютерного моделирования эксперимента в сочетании с *in vitro* и *in vivo* данными, полученными методом позитронно-эмиссионной томографии с использованием WL12, показывают возможность количественной оценки насыщения/занятости PD-L1 в опухоли, то есть методологии, которая применима ко всем терапевтическим антителам против PD-L1 при клинических испытаниях.

СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в описании изобретения, указывают специалистам на уровень состояния техники в той области, к которой относится раскрытый объект настоящего изобретения. Содержания всех публикаций, заявок на патенты, патентов и других видов публикаций (например, веб-сайтов, баз данных и так далее), упомянутых в описании изобретения, включены полностью в настоящее изобретение путем ссылок на них, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что содержание каждой отдельной публикации, заявки на патент, патента и другого вида публикации полностью включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее. Следует иметь в виду, что в настоящем изобретении приводится ряд ссылок на патентные заявки, патенты и другие публикации, но эти ссылки не дают основания считать, что любой из этих документов является частью известного уровня техники в данной области. В случае противоречия между описанием изобретения и любой из включенных в изобретение ссылок, приоритет имеет описание изобретения (включая любые его

изменения, которые могут быть основаны на включенной в изобретение ссылке). В изобретении используются общепринятые в науке и технике стандартные значения терминов, если не указано иное. В изобретении используются стандартные сокращенные обозначения для различных терминов.

Agoram, B. M. (2009) Use of pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling for starting dose selection in first-in-human trials of high-risk biologics. *Br J Clin Pharmacol* 67, 153-160.

Anderson, C. J., and Ferdani, R. (2009) Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm* 24, 379-93.

Baxter, L. T., and Jain, R. K. (1989) Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc Res* 37, 77-104.

Baxter, L. T., and Jain, R. K. (1990) Transport of fluid and macromolecules in tumors. II. Role of heterogeneous perfusion and lymphatics. *Microvasc Res* 40, 246-263.

Boswell, C. A., Sun, X., Niu, W., Weisman, G. R., Wong, E. H., Rheingold, A. L., and Anderson, C. J. (2004) Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *J Med Chem* 47, 1465-74.

Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H. C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T. M., Alaparthi, S., Grosso, J. F., Korman, A. J., Parker, S. M., Agrawal, S., Goldberg, S. M., Pardoll, D. M., Gupta, A., and Wigginton, J. M. (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366, 2455-2465.

Chatterjee, S., Lesniak, W. G., Gabrielson, M., Lisok, A., Wharram, B., Sysa-Shah, P., Azad, B. B., Pomper, M. G., and Nimmagadda, S. (2016) A humanized antibody for imaging immune checkpoint ligand PD-L1 expression in tumors. *Oncotarget* 7,

10215-27.

Chatterjee, S., Lesniak, W. G., Miller, M. S., Lisok, A., Sikorska, E., Wharram, B., Kumar, D., Gabrielson, M., Pomper, M. G., Gabelli, S. B., and Nimmagadda, S. (2017) Rapid PD-L1 detection in tumors with PET using a highly specific peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 483, 258-263.

Cho, D. C., Sosman, J. A., Sznol, M., Gordon, M. S., Hollebecque, A., Hamid, O., McDermott, D. F., Delord, J. P., Rhee, I. P., Mokatrín, A., Kowanetz, M., Funke, R. P., Fine, G. D., and Powles, T. (2013) Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol* 31, 15_suppl, 4505-4505.

Deng, R., Bumbaca, D., Pastuskovas, C. V., Boswell, C. A., West, D., Cowan, K. J., Chiu, H., McBride, J., Johnson, C., Xin, Y., Koeppen, H., Leabman, M., and Iyer, S. (2016) Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor. *MAbs* 8, 593-603.

Eisenwiener, K. P., Powell, P., and Macke, H. R. (2000) A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling. *Bioorg Med Chem Lett* 10, 2133-5.

Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., and Shenkin, P. S. (2004) Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 47, 1739-49.

Gebhart, G., Lamberts, L. E., Wimana, Z., Garcia, C., Emonts, P., Ameye, L., Stroobants, S., Huizing, M., Aftimos, P., Tol, J., Oyen, W. J., Vugts, D. J., Hoekstra, O. S., Schroder, C. P., Menke-van der Houven van Oordt, C. W., Guiot, T., Brouwers, A. H., Awada, A., de Vries, E. G., and Flamen, P. (2016) Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient

outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial. *Ann Oncol* 27, 619-624.

Gibney, G. T., Weiner, L. M., and Atkins, M. B. (2016) Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 17, e542-e551.

Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., Munn, L. L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2011) Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev* 91, 1071-1121.

Gourni, E., Demmer, O., Schottelius, M., D'Alessandria, C., Schulz, S., Dijkgraaf, I., Schumacher, U., Schwaiger, M., Kessler, H., and Wester, H. J. (2011) PET of CXCR4 expression by a (68)Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *J Nucl Med* 52, 1803-10.

Grishina, I. B., and Woody, R. W. (1994) Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday discussions* 99, 245-262.

Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., and Banks, J. L. (2004) Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J Med Chem* 47, 1750-9.

Hamid, O., Sosman, J. A., Lawrence, D. P., Sullivan, R. J., Ibrahim, N., Kluger, H. M., Boasberg, P. D., Flaherty, K., Hwu, P., Ballinger, M., Mokatrini, A., Kowanetz, M., Chen, D. S., and Hodi, F. S. (2013) Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic melanoma (mM). *J Clin Oncol* 31, 15_suppl, 9010-9010.

Herbst, R. S., Soria, J. C., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., Sosman, J. A., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Gettinger, S. N., Kohrt, H. E., Horn, L., Lawrence, D. P., Rost, S., Leabman, M., Xiao, Y., Mokatrini, A., Koeppen, H., Hegde, P. S., Mellman, I., Chen, D. S., and Hodi, F. S. (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515, 563-7.

Herrmann, K., Schottelius, M., Lapa, C., Osl, T., Poschenrieder, A., Hanscheid, H., Luckerath, K., Schreder, M., Bluemel, C., Knott, M., Keller, U., Schirbel, A., Samnick, S., Lassmann, M., Kropf, S., Buck, A. K., Einsele, H., Wester, H. J., and Knop, S. (2016) First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with ^{177}Lu - and ^{90}Y - Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease. *J Nucl Med* 57, 248-51.

Heskamp, S., Hobo, W., Molkenboer-Kuenen, J. D., Olive, D., Oyen, W. J., Dolstra, H., and Boerman, O. C. (2015) Noninvasive Imaging of Tumor PD-L1 Expression Using Radiolabeled Anti-PD-L1 Antibodies. *Cancer Res* 75, 2928-36.

Hettich, M., Braun, F., Bartholoma, M. D., Schirmbeck, R., and Niedermann, G. (2016) High-Resolution PET Imaging with Therapeutic Antibody-based PD-1/PD-L1 Checkpoint Tracers *Theranostics* 6, 1629-1640.

International PCT patent application publication no. WO2016039749 to Miller, et al., for Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 and CD80 (B7-1)/PD-L1 Protein/Protein Interactions, published March 17, 2016.

International PCT patent application publication no. WO 2016/100285 to Mapelli, et al., for Immunomodulators, published June 23, 2016.

International PCT patent application publication no. WO 2016/100608 to Sun, et al. for Immunomodulators, published June 23, 2016.

International PCT patent application publication no. WO 2016/126646 to Miller et al., for Immunomodulators, published August 11, 2016.

Irving, B., Chiu, H., Maecker, H., Mariathasan, S., Lehar, S. M., Wu, Y., and Cheung, J. (2012) (Office, U. S. P., Ed.), Genentech, Inc., USA.

Irving, B., Chiu, H., Maecker, H., Mariathasan, S., Lehar, S. M., Wu, Y., and Cheung, J. (2012) Anti-PD-L1 Antibodies, compositions and articles of manufacture. (Office, U. S. P., ed), Genentech, Inc., USA.

Josefsson, A., Nedrow, J. R., Park, S., Banerjee, S. R., Rittenbach, A., Jammes, F., Tsui, B., and Sgouros, G. (2016) Imaging, Biodistribution, and Dosimetry of Radionuclide- Labeled PD-L1 Antibody in an Immunocompetent Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Res* 76, 472-9.

Kamath, A. V. (2016) Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies. *Drug Discov Today Technol* 21-22, 75-83.

Kelly, S. M., and Price, N. C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current protein and peptide science* 1, 349-384.

Lee, C. M., and Farde, L. (2006) Using positron emission tomography to facilitate CNS drug development. *Trends Pharmacol Sci* 27, 310-316.

Lee, H. T., Lee, J. Y., Lim, H., Lee, S. H., Moon, Y. J., Pyo, H. J., Ryu, S. E., Shin, W., and Heo, Y. S. (2017) Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti-PD-L1 antibodies atezolizumab and durvalumab. *Sci Rep* 7, 5532.

Lesniak, W. G., Chatterjee, S., Gabrielson, M., Lisok, A., Wharram, B., Pomper, M. G., and Nimmagadda, S. (2016) PD-L1 Detection in Tumors Using [(64)Cu]Atezolizumab with PET. *Bioconjug Chem* 27, 2103-2110,

Linden, H. M., Stekhova, S. A., Link, J. M., Gralow, J. R., Livingston, R. B., Ellis, G. K., Petra, P. H., Peterson, L. M., Schubert, E. K., Dunnwald, L. K., Krohn, K. A., and Mankoff, D. A. (2006) Quantitative fluoroestradiol positron emission tomography imaging predicts response to endocrine treatment in breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 2793-9.

Lipson, E. J., Forde, P. M., Hammers, H. J., Emens, L. A., Taube, J. M., and Topalian, S. L. (2015) Antagonists of PD-1 and PD-L1 in Cancer Treatment. *Semin Oncol* 42, 587-600.

Liu, K., Tan, S., Chai, Y., Chen, D., Song, H., Zhang, C. W., Shi, Y., Liu, J., Tan, W., Lyu, J., Gao, S., Yan, J., Qi, J., and Gao, G. F. (2016) Structural basis of anti-PD-L1

monoclonal antibody avelumab for tumor therapy. *Cell Res* 10.1038/cr.2016.102.

Mansfield, A. S., and Dong, H. (2016) Implications of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 Heterogeneity in the Selection of Patients With Non-Small Cell Lung Cancer to Receive Immunotherapy. *Clin Pharmacol Ther* 100, 220-2.

Marrone, K. A., Ying, W., and Naidoo, J. (2016) Immune-Related Adverse Events From Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Pharmacol Ther* 100, 242-251.

Maute, R. L., Gordon, S. R., Mayer, A. T., McCracken, M. N., Natarajan, A., Ring, N. G., Kimura, R., Tsai, J. M., Manglik, A., Kruse, A. C., Gambhir, S. S., Weissman, I. L., and Ring, A. M. (2015) Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E6506-14.

McLaughlin, J., Han, G., Schalper, K. A., Carvajal-Hausdorf, D., Pelekanou, V., Rehman, J., Velcheti, V., Herbst, R., LoRusso, P., and Rimm, D. L. (2016) Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2, 46-54.

Meerbrey, K. L., Hu, G., Kessler, J. D., Roarty, K., Li, M. Z., Fang, J. E., Herschkowitz, J. I., Burrows, A. E., Ciccia, A., Sun, T., Schmitt, E. M., Bernardi, R. J., Fu, X., Bland, C. S., Cooper, T. A., Schiff, R., Rosen, J. M., Westbrook, T. F., and Elledge, S. J. (2011) The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3665-3670.

Meng, X., Huang, Z., Teng, F., Xing, L., and Yu, J. (2015) Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 41, 868-876.

Morin, A., Eisenbraun, B., Key, J., Sanschagrin, P. C., Timony, M. A., Ottaviano, M., and Sliz, P. (2013) Collaboration gets the most out of software. *Elife* 2, e01456.

Nolan, E., Savas, P., Policheni, A. N., Darcy, P. K., Vaillant, F., Mintoff, C. P., Dushyanthen, S., Mansour, M., Pang, J. B., Fox, S. B., Kathleen Cuninghame Foundation

Consortium for Research into Familial Breast, C., Perou, C. M., Visvader, J. E., Gray, D. H. D., Loi, S., and Lindeman, G. J. (2017) Combined immune checkpoint blockade as a therapeutic strategy for BRCA1-mutated breast cancer. *Sci Transl Med* 9, 393, eaal4922.

Okazaki, T., and Honjo, T. (2007) PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 19, 813-24.

Oosting, S. F., van Asselt, S. J., Brouwers, A. H., Bongaerts, A. H., Steinberg, J. D., de Jong, J. R., Lub-de Hooge, M. N., van der Horst-Schrivers, A. N., Walenkamp, A. M., Hoving, E. W., Sluiter, W. J., Zonnenberg, B. A., de Vries, E. G., and Links, T. P. (2016) ⁸⁹Zr-Bevacizumab PET Visualizes Disease Manifestations in Patients with von Hippel- Lindau Disease. *J Nucl Med* 57, 1244-50.

Oude Munnink, T. H., Henstra, M. J., Segerink, L. I., Movig, K. L., and Brummelhuis-Visser, P. (2016) Therapeutic drug monitoring of monoclonal antibodies in inflammatory and malignant disease: Translating TNF-alpha experience to oncology. *Clin Pharmacol Ther* 99, 419-431.

Oosting, S. F., van Asselt, S. J., Brouwers, A. H., Bongaerts, A. H., Steinberg, J. D., de Jong, J. R., Lub-de Hooge, M. N., van der Horst-Schrivers, A. N., Walenkamp, A. M., Hoving, E. W., Sluiter, W. J., Zonnenberg, B. A., de Vries, E. G., and Links, T. P. (2016) ⁸⁹Zr-Bevacizumab PET Visualizes Disease Manifestations in Patients with von Hippel-Lindau Disease. *J Nucl Med* 57, 1244-1250.

Pandit-Taskar, N., O'Donoghue, J. A., Durack, J. C., Lyashchenko, S. K., Cheal, S. M., Beylertgil, V., Lefkowitz, R. A., Carrasquillo, J. A., Martinez, D. F., Fung, A. M., Solomon, S. B., Gonen, M., Heller, G., Loda, M., Nanus, D. M., Tagawa, S. T., Feldman, J. L., Osborne, J. R., Lewis, J. S., Reuter, V. E., Weber, W. A., Bander, N. H., Scher, H. I., Larson, S. M., and Morris, M. J. (2015) A Phase I/II Study for Analytic Validation of ⁸⁹Zr-J591 ImmunoPET as a Molecular Imaging Agent for Metastatic Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 21, 5277-85.

Peterson, L. M., Mankoff, D. A., Lawton, T., Yagle, K.,

Schubert, E. K., Stekhova, S., Gown, A., Link, J. M., Tewson, T., and Krohn, K. A. (2008) Quantitative imaging of estrogen receptor expression in breast cancer with PET and 18F-fluoroestradiol. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 49, 367-74.

Phillips T., Simmons P., Inzunza H. D., Cogswell J., Novotny J. Jr, Taylor C., and Zhang X. (2015) Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 23(8):541-9.

Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braiteh, F. S., Loriot, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, H. A., Petrylak, D. P., Teng, S. L., Shen, X. D., Boyd, Z., Hegde, P. S., Chen, D. S., and Vogelzang, N. J. (2014) MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515, 558-562.

Rathkopf, D. E., Morris, M. J., Fox, J. J., Danila, D. C., Slovin, S. F., Hager, J. H., Rix, P. J., Chow Maneval, E., Chen, I., Gonen, M., Fleisher, M., Larson, S. M., Sawyers, C. L., and Scher, H. I. (2013) Phase I study of ARN-509, a novel antiandrogen, in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 31, 3525-3530.

Reubi, J. C., and Maecke, H. R. (2008) Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med* 49, 1735-8.

Roach, C., Zhang, N., Corigliano, E., Jansson, M., Toland, G., Ponto, G., Dolled-Filhart, M., Emancipator, K., Stanforth, D., and Kulangara, K. (2016) Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 24, 392-7.

Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., and Sherman, W. (2013) Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des* 27, 221-34.

Sheng, J., Srivastava, S., Sanghavi, K., Lu, Z., Schmidt, B. J., Bello, A., and Gupta, M. (2017) Clinical Pharmacology Considerations for the Development of Immune Checkpoint

Inhibitors. *J Clin Pharmacol* 57 Suppl 10, S26-S42.

Smith-Jones, P. M., Fridrich, R., Kaden, T. A., Novak-Hofer, I., Siebold, K., Tschudin, D., and Maecke, H. R. (1991) Antibody labeling with copper-67 using the bifunctional macrocycle 4-[(1,4,8,11-tetraazacyclotetradec-1-yl)methyl]benzoic acid. *Bioconjug Chem* 2, 415-21.

Spigel, D. R., Gettinger, S. N., Horn, L., Herbst, R. S., Gandhi, L., Gordon, M. S., Cruz, C., Conkling, P., Cassier, P. A., Antonia, S. J., Burris, H. A., Fine, G. D., Mokatrín, A., Kowanetz, M., Shen, X. D., Chen, D. S., and Soria, J. C. (2013) Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 31, 15_suppl, 8008-8008.

Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287, 252-60.

Stroh, M., Winter, H., Marchand, M., Claret, L., Eppler, S., Ruppel, J., Abidoye, O., Teng, S. L., Lin, W. T., Dayog, S., Bruno, R., Jin, J., and Girish, S. (2017) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Atezolizumab in Metastatic Urothelial Carcinoma. *Clin Pharmacol Ther* 102, 305-312.

Sun, X., Li, Y., Liu, T., Li, Z., Zhang, X., and Chen, X. (2016) Peptide-based imaging agents for cancer detection. *Adv Drug Deliv Rev*.

Sunshine, J., and Taube, J. M. (2015) PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 23, 32-8.

Tabrizi, M. A., Tseng, C. M., and Roskos, L. K. (2006) Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov Today* 11, 81-88.

Taube, J. M., Anders, R. A., Young, G. D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T. L., Chen, S., Klein, A. P., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., and Chen, L. (2012) Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic

lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 4, 127ra137.

Taube, J. M., Young, G. D., McMiller, T. L., Chen, S., Salas, J. T., Pritchard, T. S., Xu, H., Meeker, A. K., Fan, J., Cheadle, C., Berger, A. E., Pardoll, D. M., and Topalian, S. L. (2015) Differential Expression of Immune-Regulatory Genes Associated with PD-L1 Display in Melanoma: Implications for PD-1 Pathway Blockade. *Clin Cancer Res* 21, 3969-3976.

Topalian, S. L., Drake, C. G., and Pardoll, D. M. (2015) Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27, 450-61.

Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A., and Pardoll, D. M. (2016) Mechanism- driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16, 275-87.

Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R., and Anderson, C. J. (2007) Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des* 13, 3-16.

Willmann, J. K., van Bruggen, N., Dinkelborg, L. M., and Gambhir, S. S. (2008) Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 7, 591-607.

Woodard, L. E., De Silva, R. A., Behnam Azad, B., Lisok, A., Pullambhatla, M., W, G. L., Mease, R. C., Pomper, M. G., and Nimmagadda, S. (2014) Bridged cyclams as imaging agents for chemokine receptor 4 (CXCR4). *Nucl Med Biol* 41, 552-61.

Wu, D., Huang, L., Jiang, M. S., and Jiang, H. (2014) Contrast agents for photoacoustic and thermoacoustic imaging: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 23616-23639.

Wu, A. M. (2014) Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Methods* 65, 139-147.

Yang, J., Zhao, H., Garnett, C., Rahman, A., Gobburu, J. V., Pierce, W., Schechter, G., Summers, J., Keegan, P., Booth, B., and Wang, Y. (2013) The combination of exposure-response and case-control analyses in regulatory decision making. *J Clin Pharmacol* 53, 160-166,

Zak, K. M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Domling, A., Dubin, G., and Holak, T. A. (2015)

Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* 23, 2341-8.

Несмотря на то, что для более четкого понимания изобретения вышеизложенный объект изобретения был описан довольно подробно с использованием конкретных иллюстраций и примеров, тем не менее, для специалистов в данной области является очевидным, что могут быть осуществлены на практике конкретные изменения и модификации в рамках объема прилагаемой формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ:

SEQ ID NO.: 1

WL12 аминокислотная последовательность=цикло-(-Ac-Tyr-NMeAla-Asn-Pro-His-Leu-Hyp-Trp-Ser-Trp(метил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂)

SEQ ID NO.: 2

DK-A-221 аминокислотная последовательность=цикло-(-Ac-Tyr-NMeAla-Asn-Pro-His-Glu-Hyp-Trp-Ser-Trp(карбоксиметил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Визуализирующее средство, включающее конъюгат пептида, обладающего специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), и репортерный фрагмент, и, необязательно, линкер, где линкер, в случае его присутствия, соединяет пептид и репортерный фрагмент, и, в случае отсутствия линкера, репортерный фрагмент присоединен непосредственно к пептиду через первичный амин аминокислоты пептида.

2. Визуализирующее средство по п. 1, где пептид, обладающий специфичностью связывания PD-L1, взаимодействует с аминокислотами Y56, E58, A113, M115 и Y123 лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1).

3. Визуализирующее средство по п. 1 или п. 2, где пептид, обладающий специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), имеет, по меньшей мере, 80% идентичность последовательности с пептидом WL12, DK-A-221 или DK-A-222.

4. Визуализирующее средство по п. 3, где пептид, обладающий специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), имеет, по меньшей мере, 85% идентичность последовательности с пептидом WL12, DK-A-221 или DK-A-222.

5. Визуализирующее средство по п. 4, где пептид визуализирующего средства, обладающий специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), имеет по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с пептидом WL12, DK-A-221 или DK-A-222.

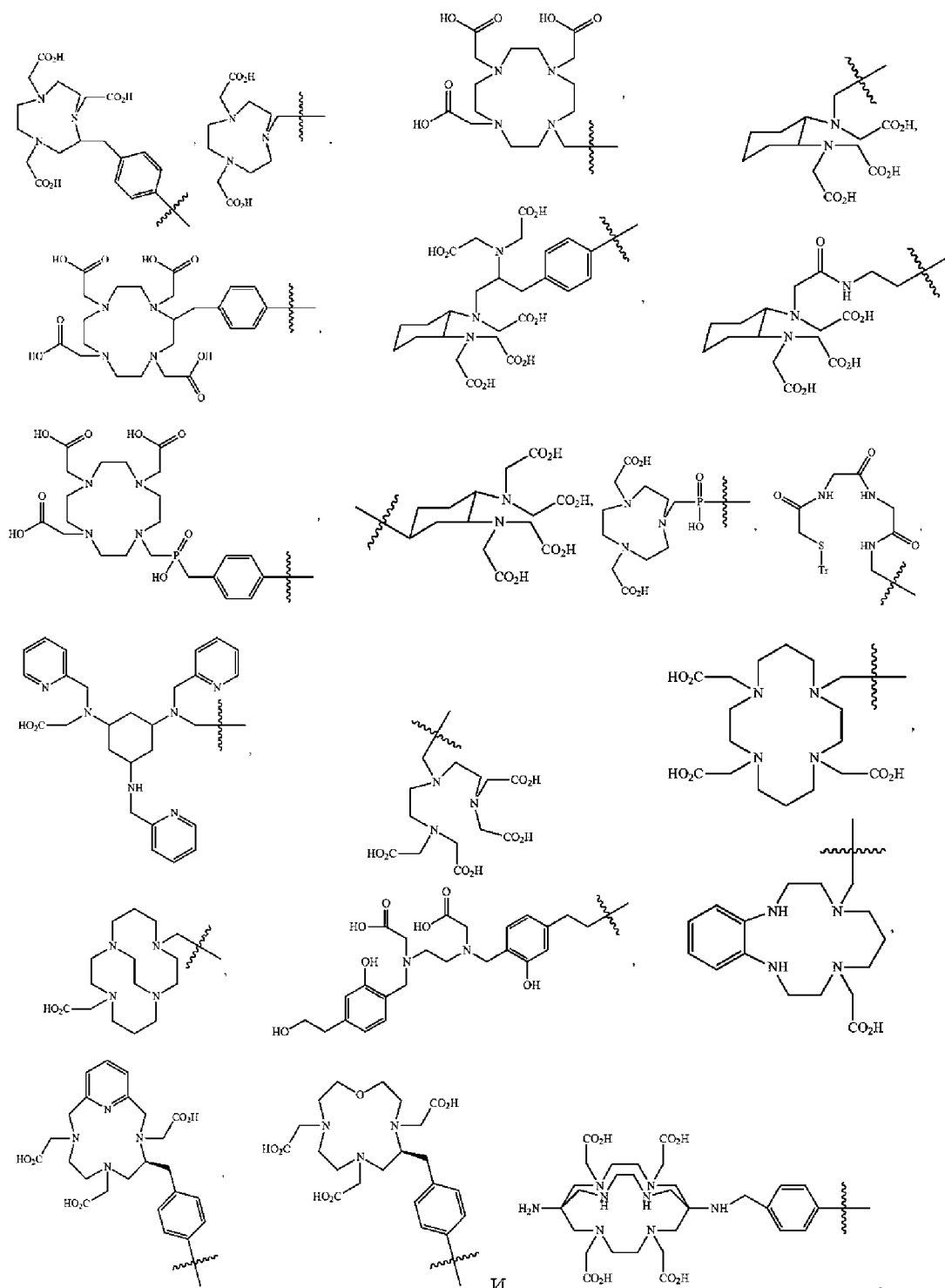
6. Визуализирующее средство по п. 5, где пептид, обладающий специфичностью связывания лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), имеет 100% идентичность последовательности с пептидом WL12, DK-A-221 или DK-A-222.

7. Визуализирующее средство по п. 1, где репортерный фрагмент выбирают из группы, состоящей из хелатообразующего средства, меченного радиоактивным изотопом субстрата, флуоресцентного красителя, фотоакустической репортерной молекулы и активной в рамановском спектре репортерной молекулы.

8. Визуализирующее средство по п. 7, где репортерный

фрагмент представляет собой хелатообразующее средство, и хелатообразующее средство выбирают из группы, состоящей из DOTAGA (1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1-(глутаровая кислота)-4,7,10-триуксусная кислота), DOTA (1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), DOTASA (1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1-(2-янтарная кислота)-4,7,10-триуксусная кислота), CB-DO2A (10-бис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаацикло[5.5.2]тетрадекан), DEPA (7-[2-(бис-карбоксиметиламино)этил]-4,10-бис-карбоксиметил-1,4,7,10-тетраазаациклододец-1-ил-уксусная кислота)), Зр-С-DEPA (2-[(карбоксиметил)][5-(4-нитрофенил-1-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1-ил]-пентан-2-ил)амино]уксусная кислота)), TCMC (2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7,10-тетрааза-1,4,7,10-тетра-(2-карбамонилметил)-ациклододекан), охо-DO3A (1-окса-4,7,10-триазаациклододекан-5-S-(4-изотиоцианатобензил)-4,7,10-триуксусная кислота), p-NH₂-Bn-Охо-DO3A (1-окса-4,7,10-тетраазаациклододекан-5-S-(4-аминобензил)-4,7,10-триуксусная кислота), TE2A ((1,8-N,N'-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазаациклотетрадекан), MM-TE2A, DM-TE2A, CB-TE2A (4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазаацикло[6.6.2]гексадекан), CB-TE1A1P (4,8,11-тетраазаациклотетрадекан-1-(метанфосфоновая кислота)-8-(метанкарбоновая кислота), CB-TE2P (1,4,8,11-тетраазаациклотетрадекан-1,8-бис(метанфосфоновая кислота), TETA (1,4,8,11-тетраазаациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота), NOTA (1,4,7-триазаациклононан-N,N',N''-триуксусная кислота), NODA (1,4,7-триазаациклононан-1,4-диацетат); NODAGA (1,4,7-триазаациклононан-1-глутаровая кислота-4,7-уксусная кислота), (NOTAGA) 1,4,7-триазонан-1,4-диил)диуксусная кислота, DFO (десфероксамин), NETA ([4-[2-(бис-карбоксиметиламино)этил]-7-карбоксиметил-[1,4,7]триазонан-1-ил]-уксусная кислота), TACN-TM (N,N',N''-трис(2-меркаптоэтил)-1,4,7-триазаациклононан), Diamсар (1,8-диамино-3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло(6,6,6)эйкозан, 3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло[6.6.6]эйкозан-1,8-диамин), Sarar (1-N-(4-аминобензил)-3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло[6.6.6]эйкозан-1,8-диамин), AmBaSar (4-((8-амино-3,6,10,13,16,19-гексаазабицикло[6.6.6]эйкозан-1-иламино)метил)бензойная кислота) и BaBaSar.

9. Визуализирующее средство по п. 7, где хелатообразующее средство выбирают из группы, состоящей из:



10. Визуализирующее средство по п. 7, где репортерный фрагмент представляет собой хелатообразующее средство, и хелатообразующее средство дополнительно включает радиоактивный изотоп металла, выбранный из группы, состоящей из ^{94m}Tc , ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{55}Co , ^{57}Co , ^{47}Sc , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{152}Gd ,

^{82}Rb , ^{89}Zr и ^{166}Dy .

11. Визуализирующее средство по п. 7, где репортерный фрагмент представляет собой меченный радиоактивным изотопом субстрат, и меченный радиоактивным изотопом включает радиоактивный изотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{126}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{80}Br , $^{80\text{m}}\text{Br}$, ^{82}Br , ^{83}Br , ^{18}F и ^{211}At .

12. Визуализирующее средство по п. 11, где меченный радиоактивным изотопом субстрат включает ^{18}F -меченый субстрат.

13. Визуализирующее средство по п. 12, где ^{18}F -меченый субстрат выбирают из группы, состоящей из 2-фтор-ПАВА, 3-фтор-ПАВА, 2-фтор-маннит и N-сукцинимидил-4-фторбензоат.

14. Визуализирующее средство по п. 1, где репортерный фрагмент непосредственно вводят в пептид.

15. Визуализирующее средство по п. 14, где репортерный фрагмент включает меченную радиоактивным изотопом аминокислоту пептида.

16. Визуализирующее средство по п. 15, где меченную радиоактивным изотопом аминокислоту выбирают из группы, состоящей из йодтирозина и фтортирозина.

17. Визуализирующее средство по п. 7, где репортерный фрагмент представляет собой флуоресцентный краситель, и флуоресцентный краситель выбирают из группы, состоящей из карбоцианина, индокарбоцианина, оксакарбоцианина, тиокарбоцианина, мероцианина, полиметина, кумарина, родамина, ксантена, флуоресцеина, бор-дипиррометанового (BODIPY) красителя, Cy5, Cy5.5, Cy7, VivoTag-680, VivoTag-S680, VivoTag-S750, AlexaFluor660, AlexaFluor680, AlexaFluor700, AlexaFluor750, AlexaFluor790, Dy677, Dy676, Dy682, Dy752, Dy780, DyLight547, DyLight647, HiLyte Fluor 647, HiLyte Fluor 680, HiLyte Fluor 750, IR Dye 800, IRDye 800CW, IRDye 800RS, IRDye 700DX, ADS780WS, ADS830WS и ADS832WS.

18. Визуализирующее средство по п. 7, где репортерный фрагмент представляет собой фотоакустическую репортерную молекулу, и фотоакустическую репортерную молекулу выбирают из группы, состоящей из красителя или наночастицы.

19. Визуализирующее средство по п. 18, где краситель включает флуоресцентный краситель.

20. Визуализирующее средство по п. 19, где флуоресцентный краситель выбирают из группы, состоящей из индоцианина зеленого (ICG), Alexa Fluor 750, эванса голубого, BNQ3, QXL680, IRDye880CW, MMPsense 680, метиленового голубого, PPCy-C8 и Cyprate-C18.

21. Визуализирующее средство по п. 18, где наночастицу выбирают из группы, состоящей из плазмонной наночастицы, квантовой точки, наноразмерного алмаза, полипирроловой наночастицы, наночастицы сульфида меди, графенового нанолита, наночастицы с сердцевинкой из оксида железа с оболочкой из золота, наночастицы Gd_2O_3 , одностеночной углеродной нанотрубки, перфторуглеродной наночастицы с нанесенным красителем и наночастицы суперпарамагнитного оксида железа.

22. Визуализирующее средство по п. 7, где репортерный фрагмент представляет собой активную в рамановском спектре репортерную молекулу, и активную в рамановском спектре репортерную молекулу выбирают из группы, состоящей из одностеночной углеродной нанотрубки (SWNT) и средства для усиленного поверхностью комбинационного рассеяния (SERS).

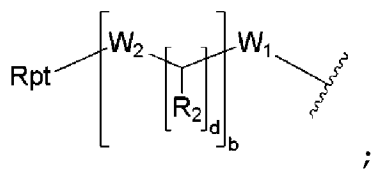
23. Визуализирующее средство по п. 22, где средство SERS включает наночастицу металла, меченую активной в рамановском спектре репортерной молекулой.

24. Визуализирующее средство по п. 23, где активная в рамановском спектре репортерная молекула включает флуоресцентный краситель.

25. Визуализирующее средство по п. 24, где флуоресцентный краситель выбирают из группы, состоящей из Cu_3 , Cu_5 , родамина и халькогенпирилиевого красителя.

26. Визуализирующее средство по п. 7, где линкер выбирают из группы, состоящей из:

(a)



где

Rpt представляет собой репортерный фрагмент;

W₁ выбирают из группы, состоящей из C₁-C₆ алкилена, C₃-C₆ циклоалкилена и арилена;

W₂ выбирают из группы, состоящей из -NR¹-(C=O)-, -NR¹-(C=S)-, -(C=O)-NR¹-, -(C=S)-NR¹- и -S-, где каждый R¹ представляет собой независимо H или C₁-C₄ алкил;

каждый R₂ представляет собой независимо H или -COOR₃, где каждый R₃ представляет собой независимо H, C₁-C₆ алкил, C₂-C₁₂ арил или C₄-C₁₆ алкиларил;

b представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2 и 3;

d представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8; и

где волнистая линия указывает точку присоединения между линкером и пептидом;

(b) Rpt-X-Y-Z-W₃-

где

Rpt представляет собой репортерный фрагмент;

X и Z каждый представляет собой независимо C₁-C₈ алкил, C₂-C₈ алкенил, C₂-C₈ алкинил, C₁-C₈ гетероалкил, C₂-C₈ гетероалкенил, C₂-C₈ гетероалкинил, C₁-C₈ алкокси или химическую связь, каждый из которых может быть замещен с помощью 0-5 R_A;

Y и W₃ каждый представляет собой независимо -O-, -S(O)_p-, -NH-, -NR_B-, -CH=CH-, -CR_B=CH-, -CH=CR_B-, -NH-CO-, -NH-CO₂-, -NR_B-CO-, -NR_B-CO₂-, -CO-NH-, -CO₂-NH-, -CO-NR_B-, -CO₂-NR_B- или химическую связь;

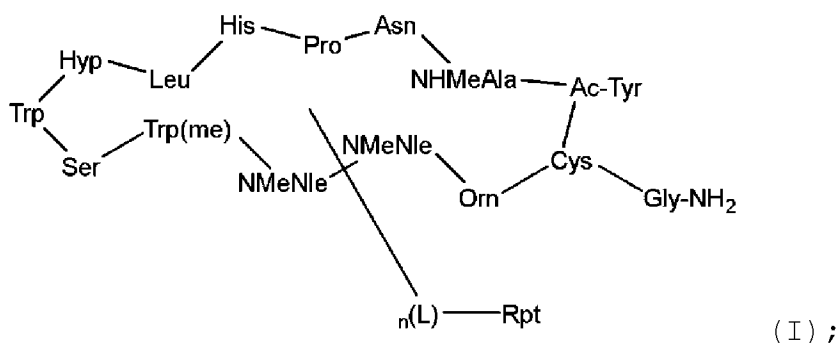
p представляет собой 0, 1 или 2;

R_A, в каждом случае присутствия, представляет собой галоген, гидроксигруппу, аминогруппу, цианогруппу, нитрогруппу, CO₂H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероцикло, необязательно замещенный алкенил,

необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный моно- или диалкиламино, необязательно замещенный алкилтио, необязательно замещенный алкилсульфинил, необязательно замещенный алкилсульфонил, необязательно замещенный моно- или диалкилкарбоксамид, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и R_B , в каждом случае присутствия, представляет собой необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный моно- или диалкиламино, необязательно замещенный алкилтио, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; или

(с) аминокислотный линкер.

27. Визуализирующее средство по п. 1, где визуализирующее средство выбирают из группы, состоящей из соединения формулы (I), формулы (II) или формулы (III):



DK-A-221- (L)_n-Rpt (II) или

DK-A-222- (L)_n-Rpt (III);

где

n представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0 и 1;

L представляет собой линкер; и

Rpt представляет собой репортерный фрагмент; и

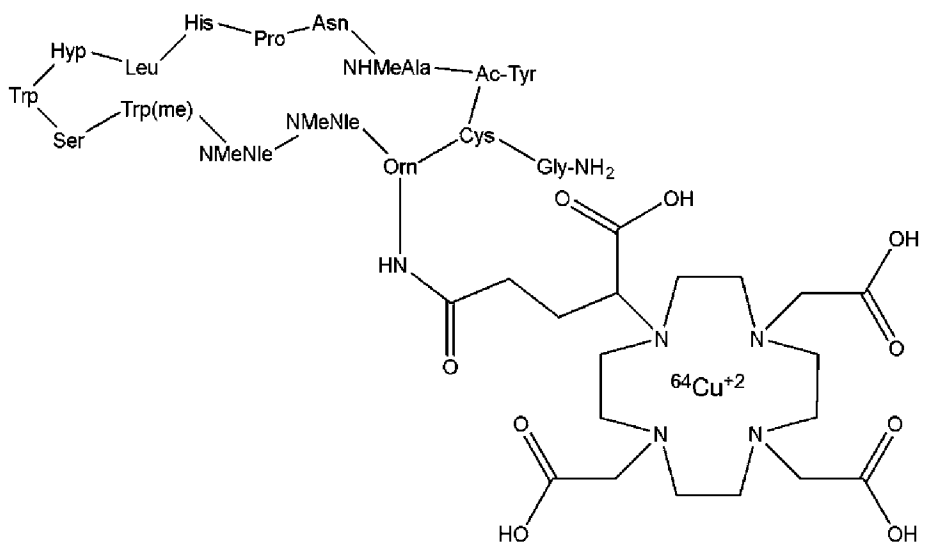
где репортерный фрагмент или линкер, в случае его присутствия, присоединены к первичной аминогруппе аминокислоты пептида, включающего визуализирующее средство формулы (I), формулы (II) или формулы (III).

27. Визуализирующее средство по п. 26, где линкер, в случае его присутствия, присоединен к первичной аминогруппе ¹³орнитина (Orn) соединения формулы (I).

28. Визуализирующее средство по п. 26, где репортерный фрагмент включает хелатообразующее средство DOTAG.

29. Визуализирующее средство по п. 28, где хелатообразующее средство DOTAG дополнительно включает радиоактивный изотоп металла ^{64}Cu .

30. Визуализирующее средство по п. 26, где соединение формулы (I) представляет собой



31. Способ визуализации для детекции лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), где способ включает:

(a) обеспечение эффективного количества визуализирующего средства по любому из пп. 1-27;

(b) контактирование одной или более клеток или тканей с визуализирующим средством; и

(c) создание изображения для детекции PD-L1.

32. Способ визуализации по п. 31, где контактирование одной или более клеток или тканей с визуализирующим средством проводят *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

33. Способ визуализации по п. 32, где контактирование одной или более клеток или тканей с визуализирующим средством проводят у субъекта.

34. Способ визуализации по п. 33, где субъектом является человек, крыса, мышь, собака, лошадь, овца, корова, обезьяна, птица или земноводное животное.

35. Способ визуализации по п. 31, где детекцию PD-L1 проводят приблизительно через 60-120 минут или менее после

введения визуализирующего средства субъекту.

36. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции рака.

37. Визуализирующее средство по п. 36, где рак выбирают из группы, состоящей из бластомы, карциномы, глиомы, лейкоза, лимфомы, меланомы, миеломы, саркомы, рака головы, рака шеи, рака головы и шеи, рака легкого, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, рака предстательной железы, колоректального рака, рака пищевода, рака желудка, лейкоза/лимфомы, рака матки, рака кожи, рака желез внутренней секреции, рака мочевых путей, рака поджелудочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, рака яичников, рака шейки матки, рака почки, рака мочевого пузыря, рака мозга, аденомы и метастатического рака.

38. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции солидной опухоли.

39. Способ визуализации по п. 38, где солидная опухоль находится в органе, выбранном из группы, состоящей из головного мозга, толстой кишки, молочной железы, предстательной железы, печени, почки, легкого, пищевода, головы и шеи, яичника, шейки матки, желудка, прямой кишки, мочевого пузыря, матки, яичек и поджелудочной железы.

40. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции инфекции.

41. Способ визуализации по п. 40, где инфекция представляет собой микробную инфекцию.

42. Способ визуализации по п. 41, где микробную инфекцию выбирают из группы, состоящей из инфекции, вызванной одним или более микроорганизмами, выбранными из группы, состоящей из *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., including *S. aureus* and coag.-negative *Staphylococcus*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides* spp., *Acinetobacter* spp., *Helicobacter* spp., *Candida* sp., метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) и ванкомицин-

резистентного *Enterococcus faecalis* (VRE).

43. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции воспаления.

44. Визуализирующее средство по п. 43, где воспаление связано с расстройством, выбранным из группы, состоящей из астмы, аутоиммунного заболевания, аутовоспалительного заболевания, целиакии, дивертикулита, гломерулонефрита, гнойного гидраденита, гиперчувствительности, воспалительного заболевания кишечника, интерстициального цистита, отита, воспалительного заболевания тазовых органов, реперфузионного повреждения, острой ревматической лихорадки, ревматоидного артрита, саркоидоза, отторжения трансплантата, волчанки, системной красной волчанки и васкулита.

45. Способ визуализации по п. 44, где воспаление вызвано ревматоидным артритом или системной красной волчанкой.

46. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции одной или более иммунных клеток в опухоли.

47. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции системного распределения иммунных клеток в опухоли у субъекта.

48. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции ответа иммунной клетки на инфекционное заболевание.

49. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации применяют для детекции ответа иммунной клетки в опухоли или ответа в здоровой ткани на воспалительное заболевание.

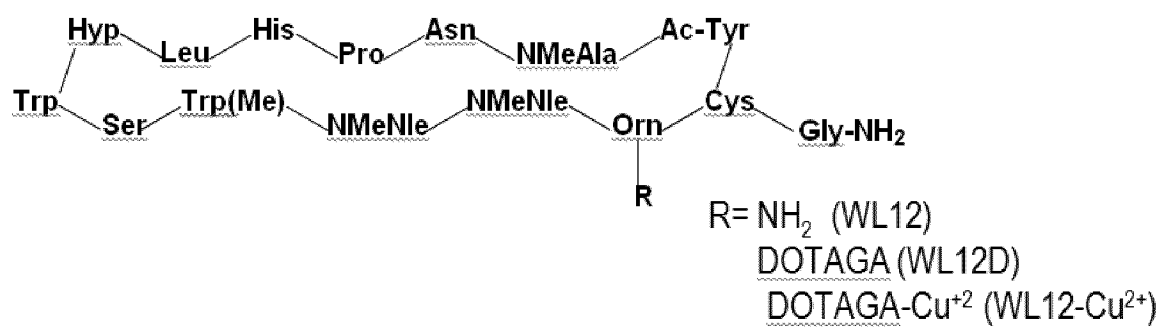
50. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации позволяет осуществлять детекцию уровней экспрессии PD-L1 у субъекта.

51. Способ визуализации по п. 31, где способ визуализации позволяет измерять занятость или таргетное связывание PD-L1 антителами или пептидами или низкомолекулярными средствами в месте опухоли или в нормальной ткани субъекта.

52. Набор реагентов для детекции лиганда 1 белка программируемой смерти клеток (PD-L1), где набор включает

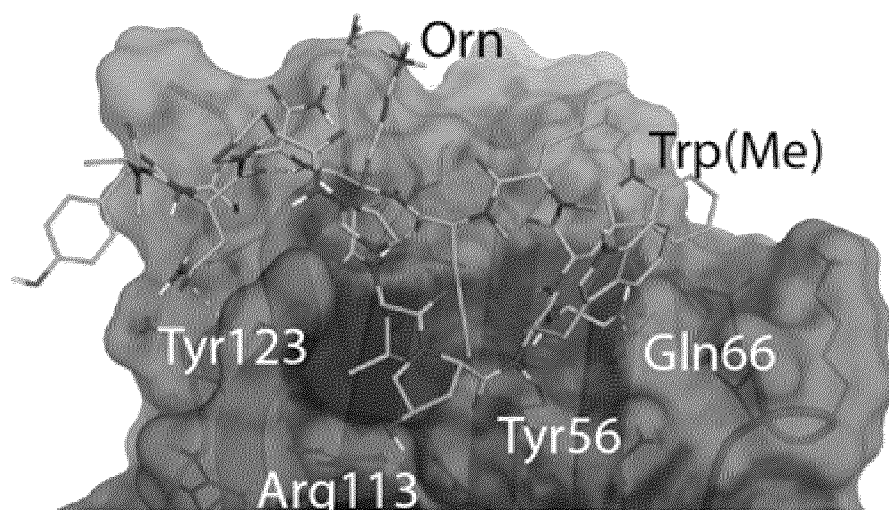
визуализирующее средство по любому из пп. 1-27.

По доверенности

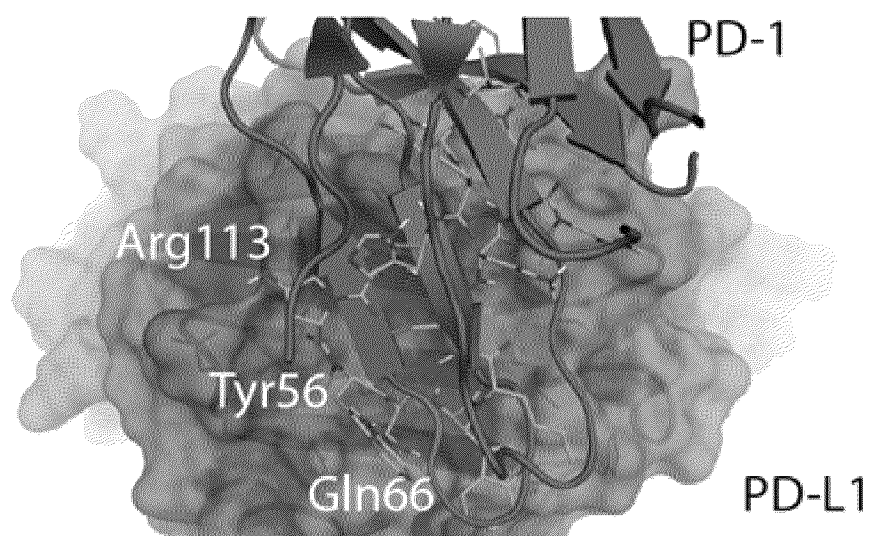


WL12=Цикло-(-Ac-Tyr-NMeAla-Asn-Pro-His-Leu-Hyp-Trp-Ser-Trp(метил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂

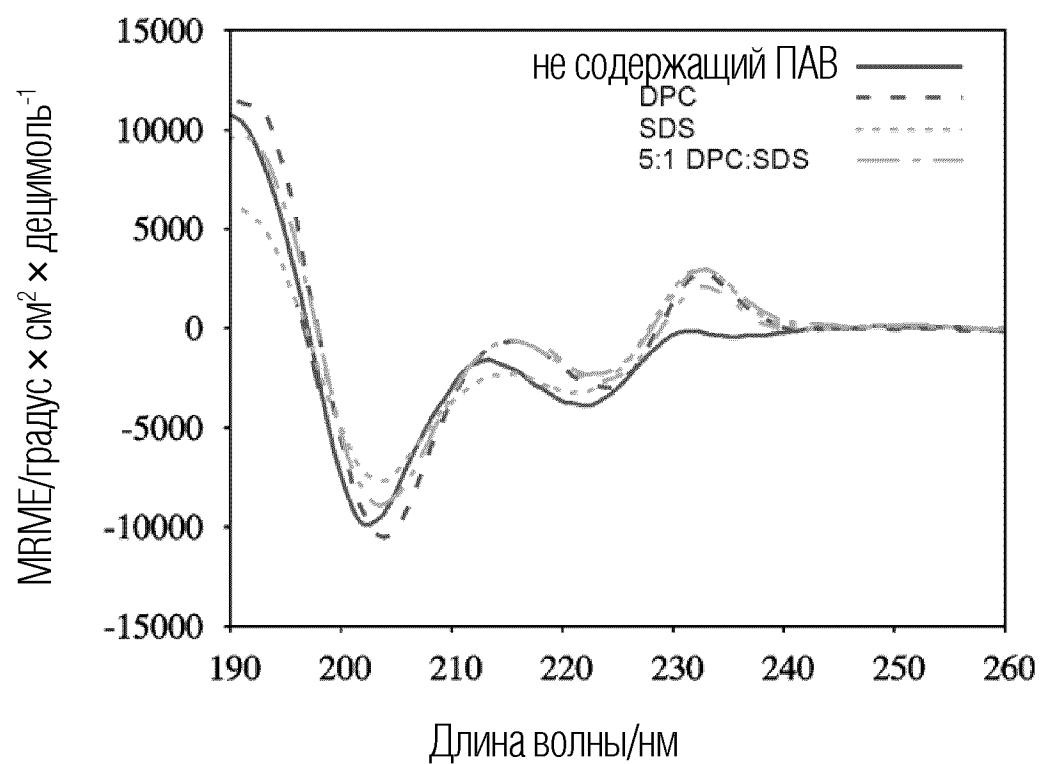
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

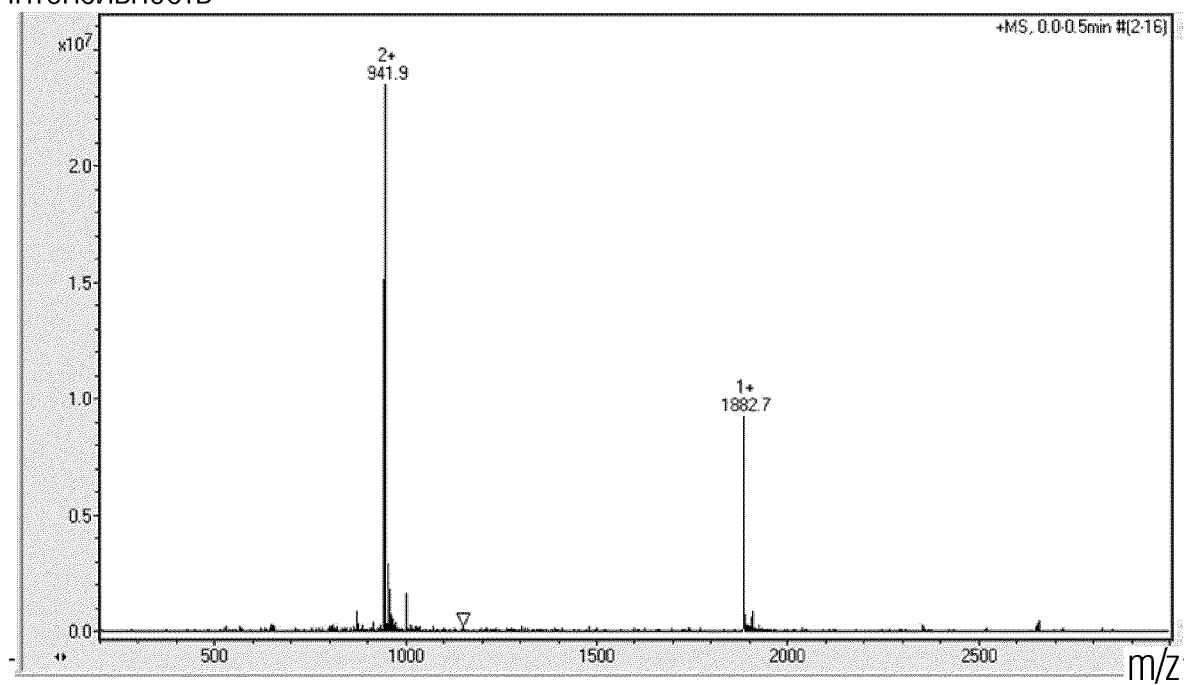


ФИГ. 1С

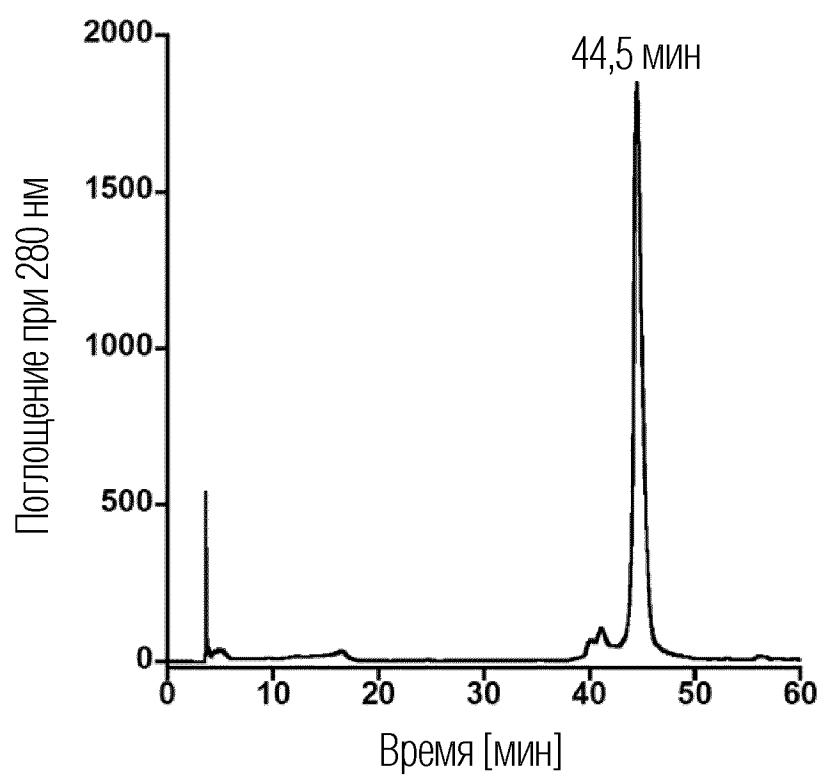


ФИГ. 2

Интенсивность

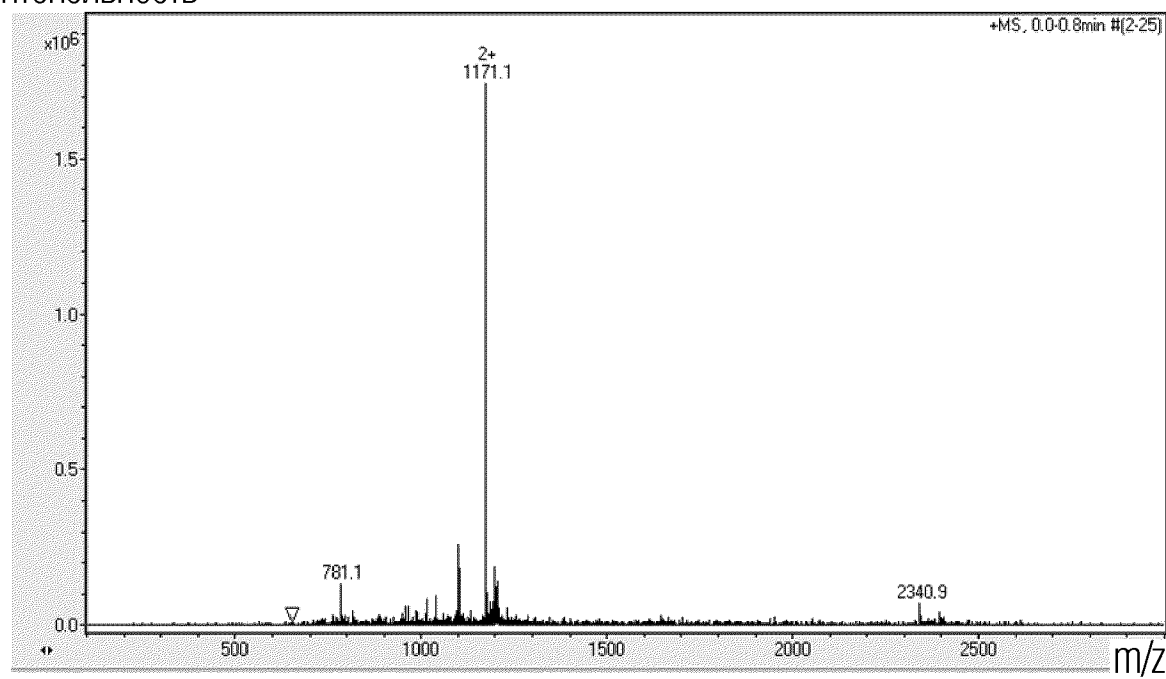


ФИГ. 3



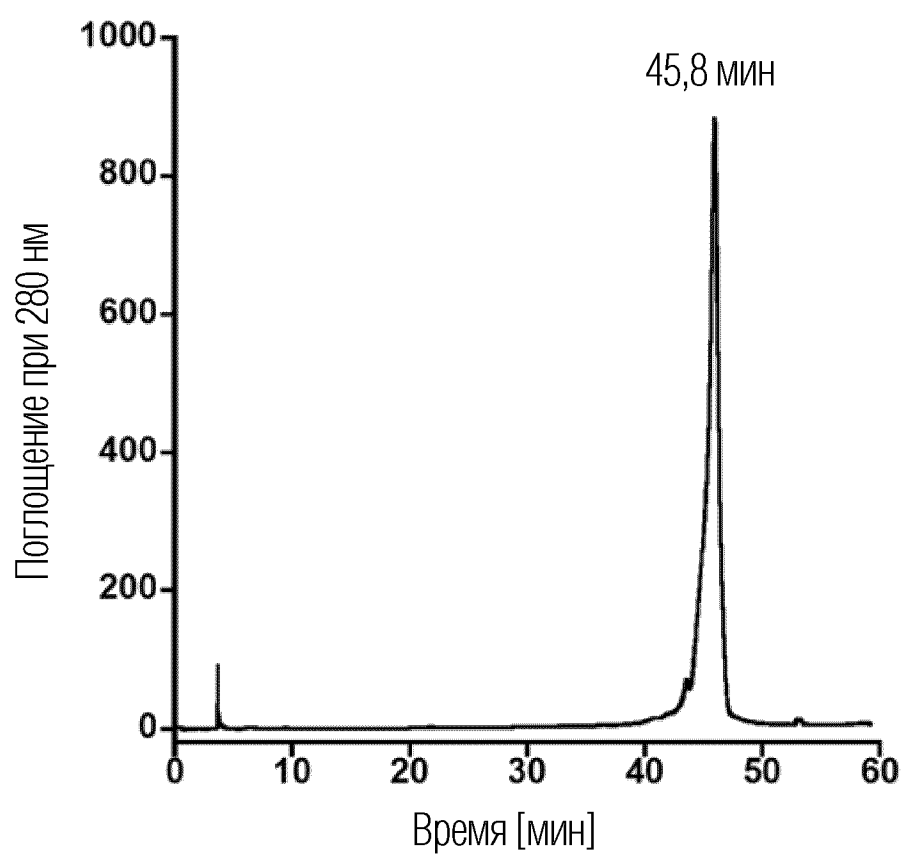
ФИГ. 4

Интенсивность



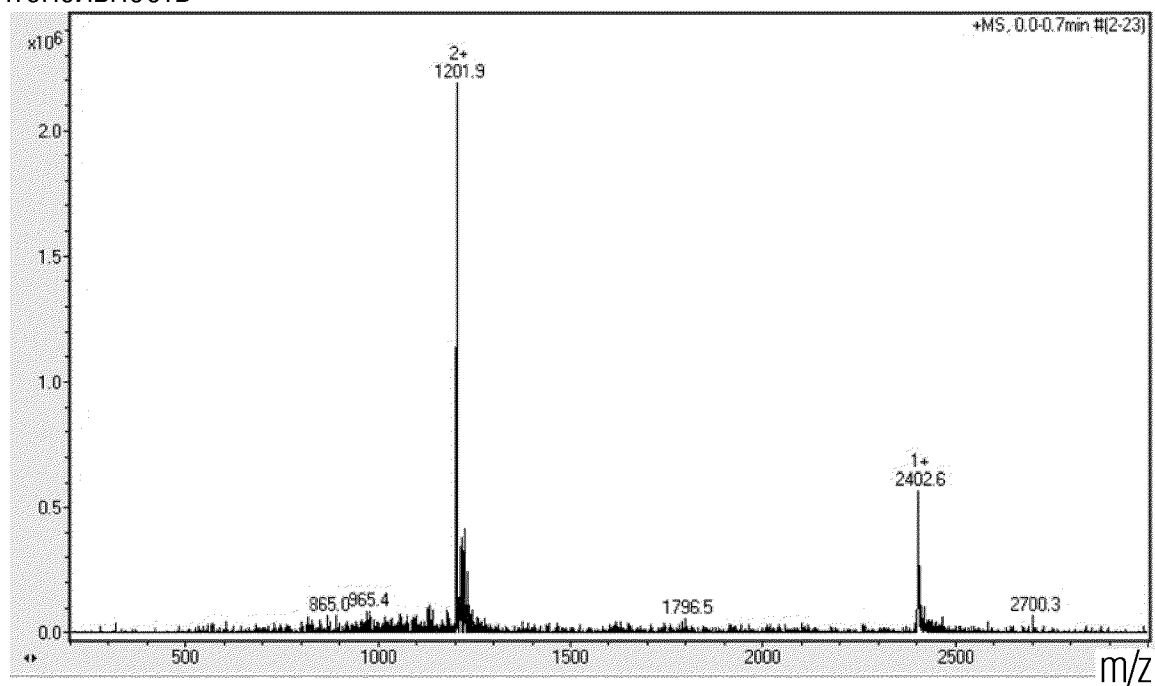
ФИГ. 5

7/60

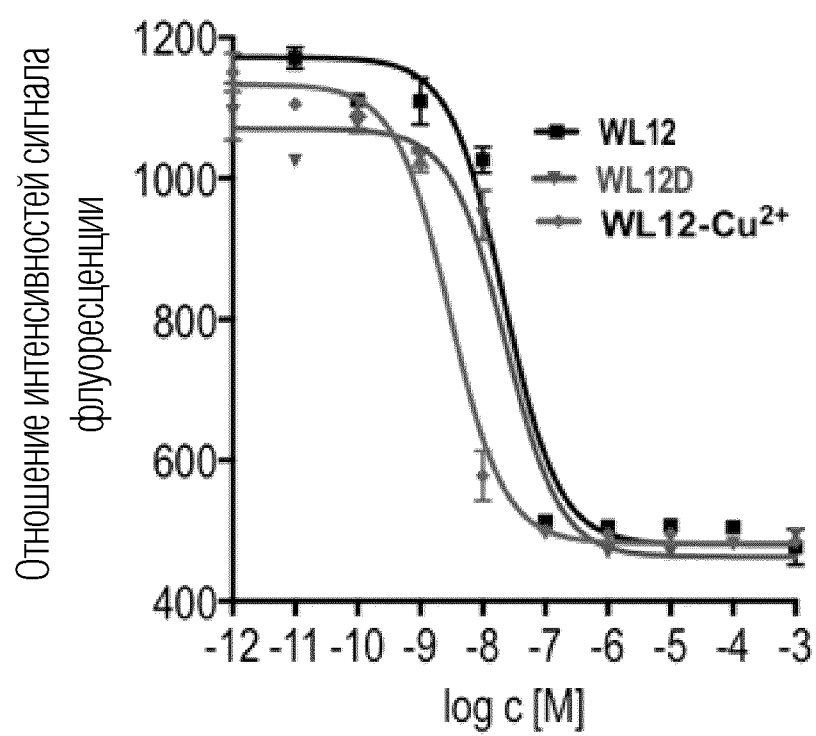


ФИГ. 6

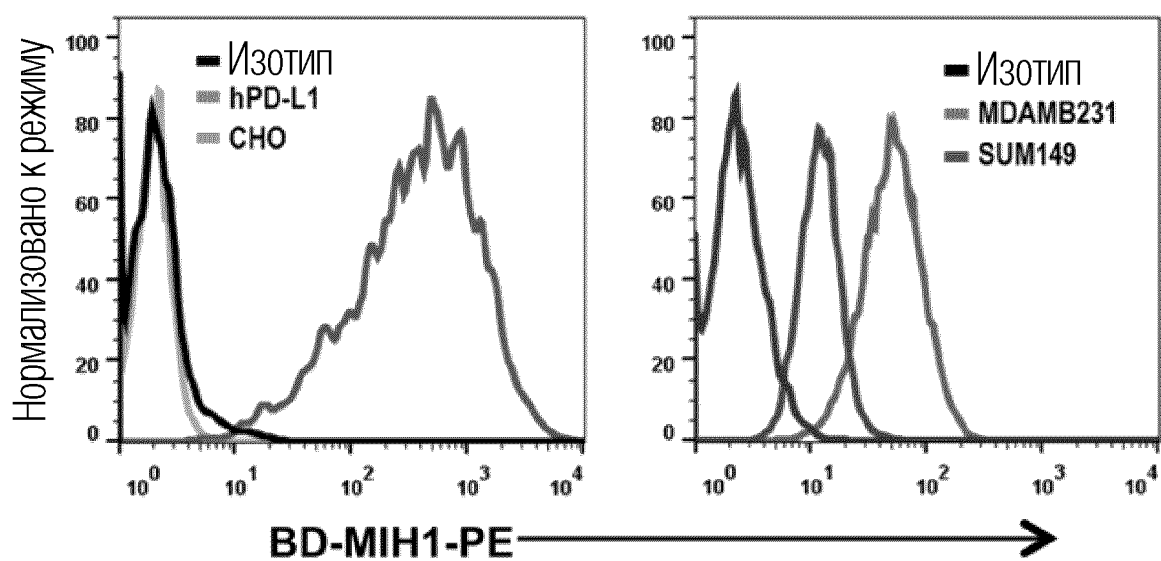
Интенсивность



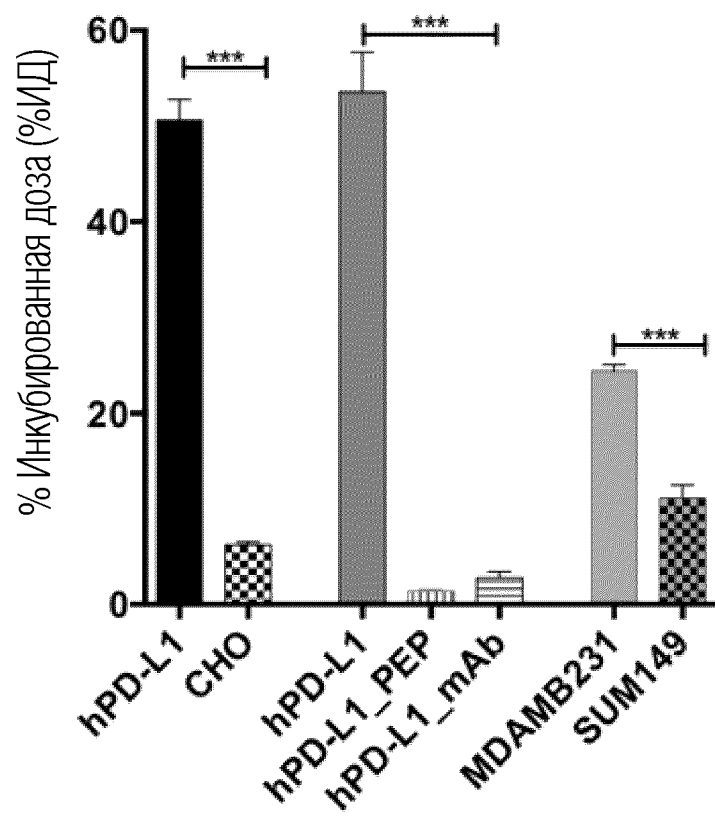
ФИГ. 7



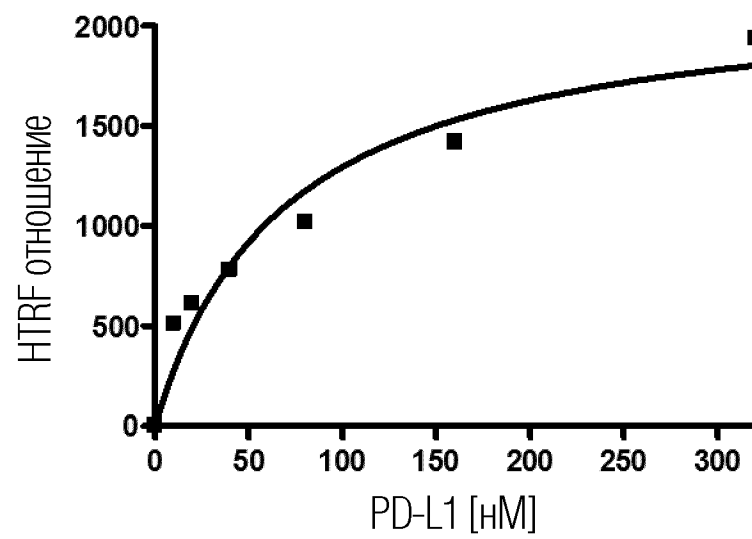
ФИГ. 8А



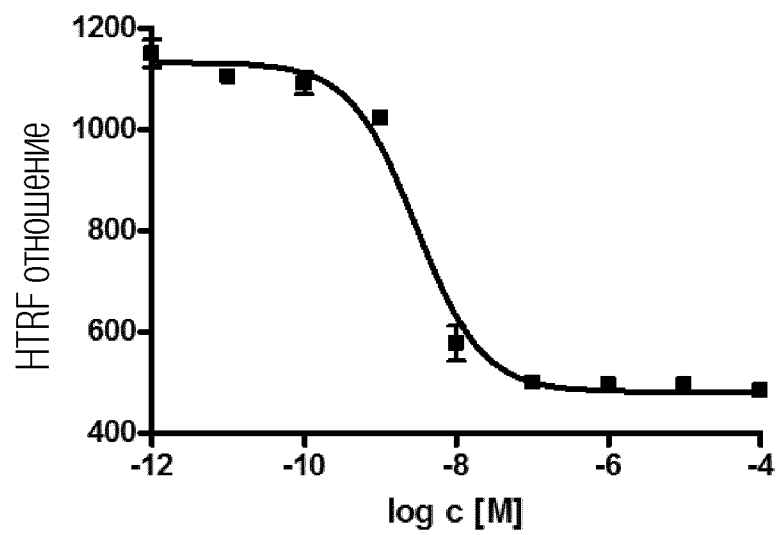
ФИГ. 8В



ФИГ. 8С

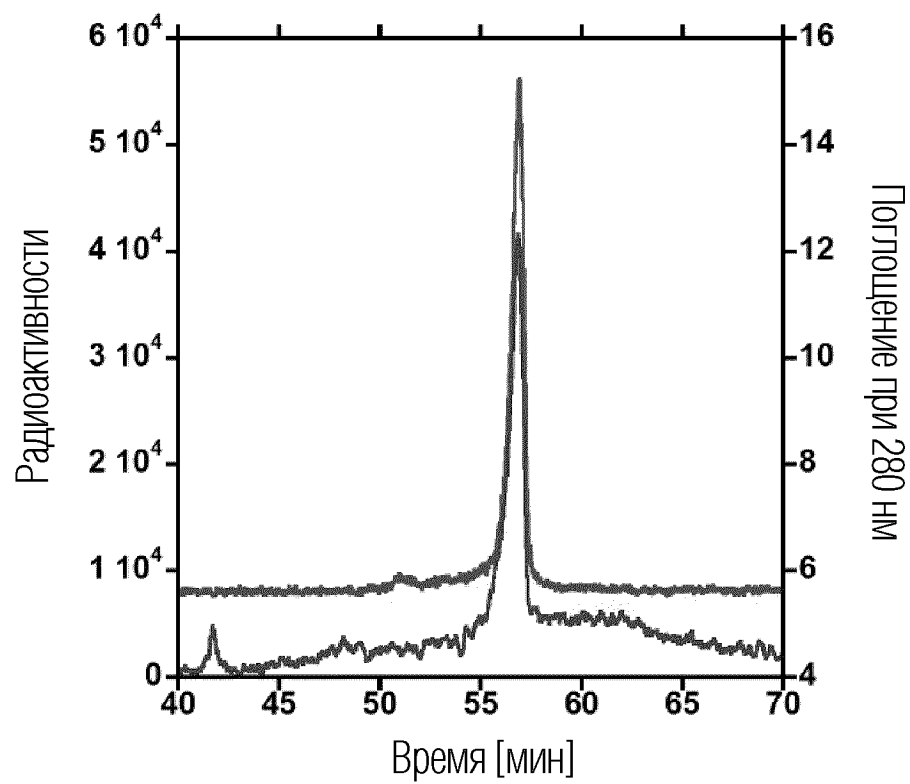


ФИГ. 9

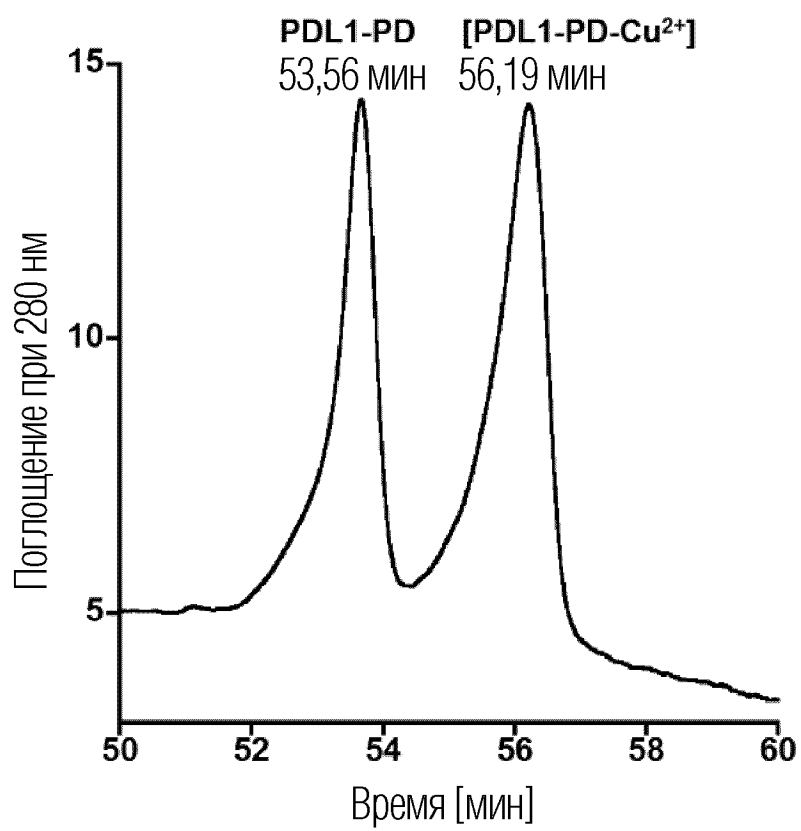


ФИГ. 10

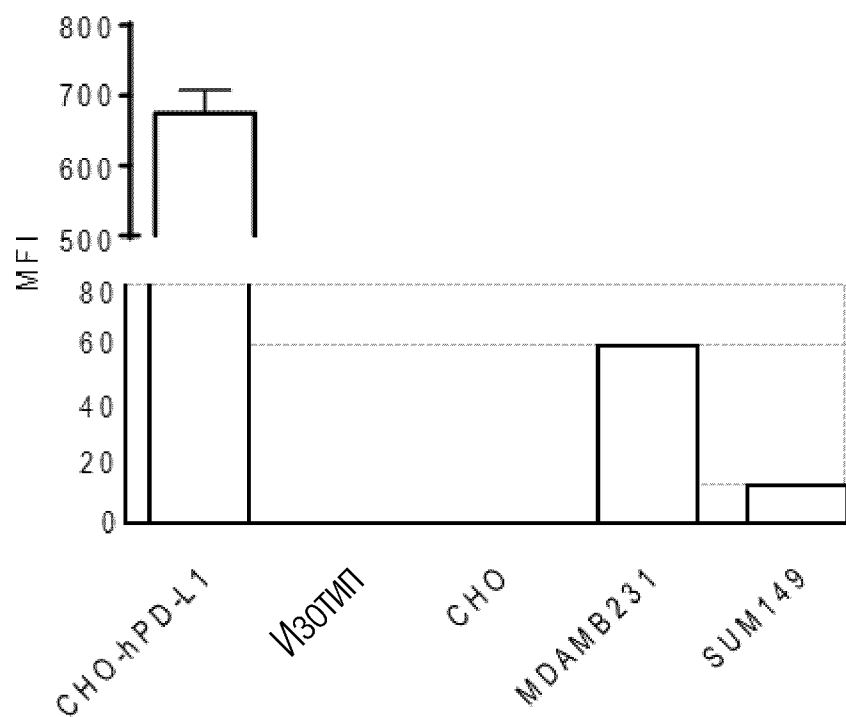
14/60



ФИГ. 11



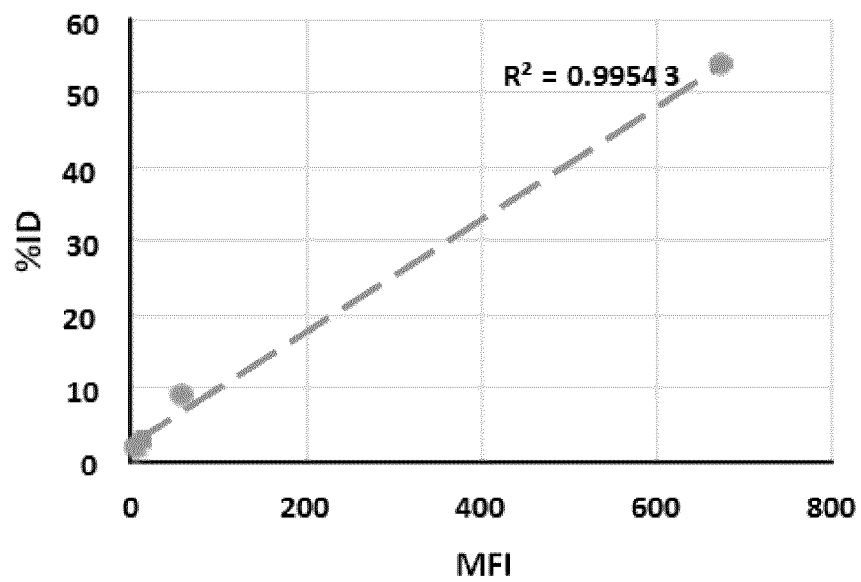
ФИГ. 12



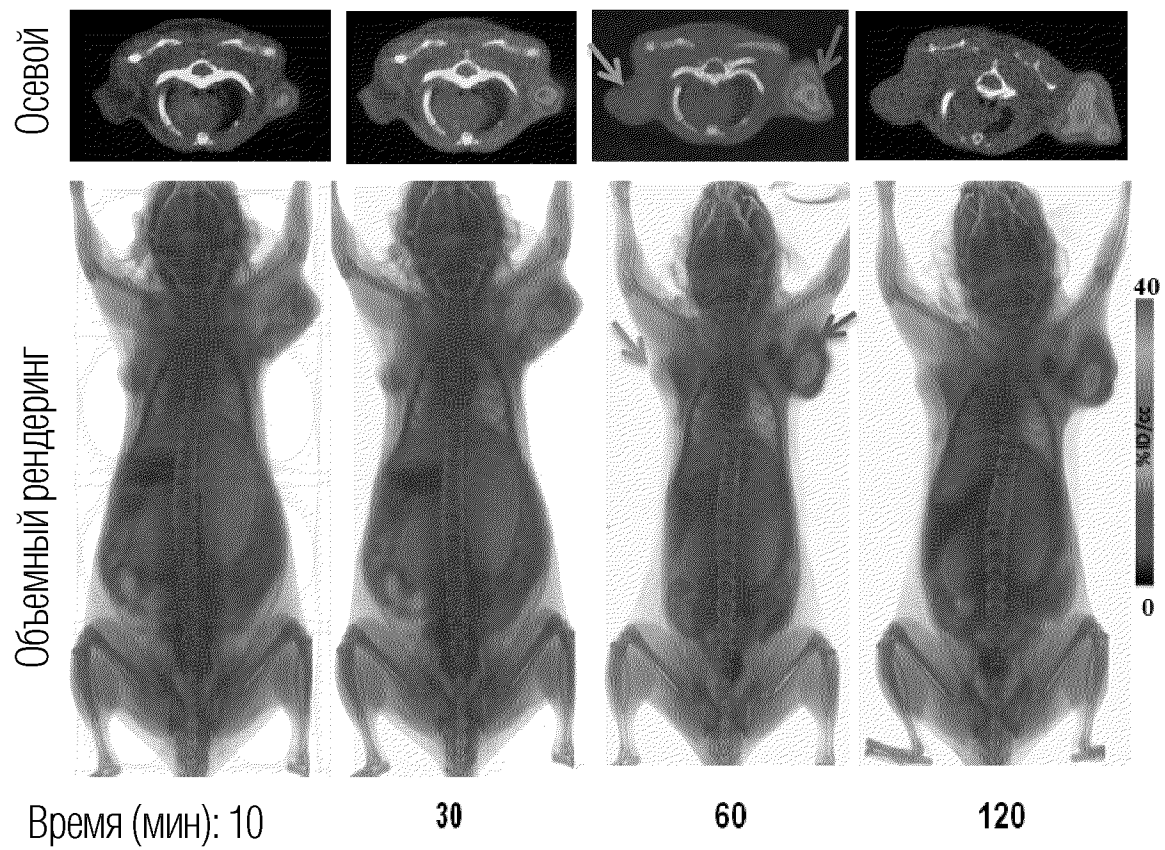
ФИГ. 13

17/60

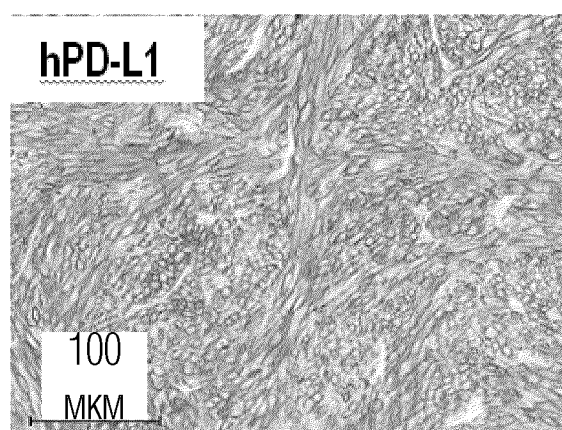
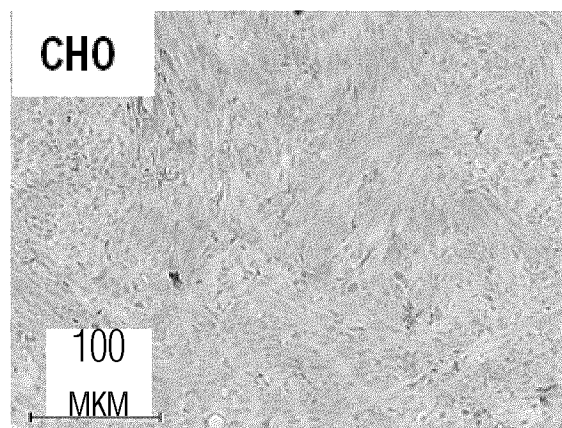
Корреляция



ФИГ. 14



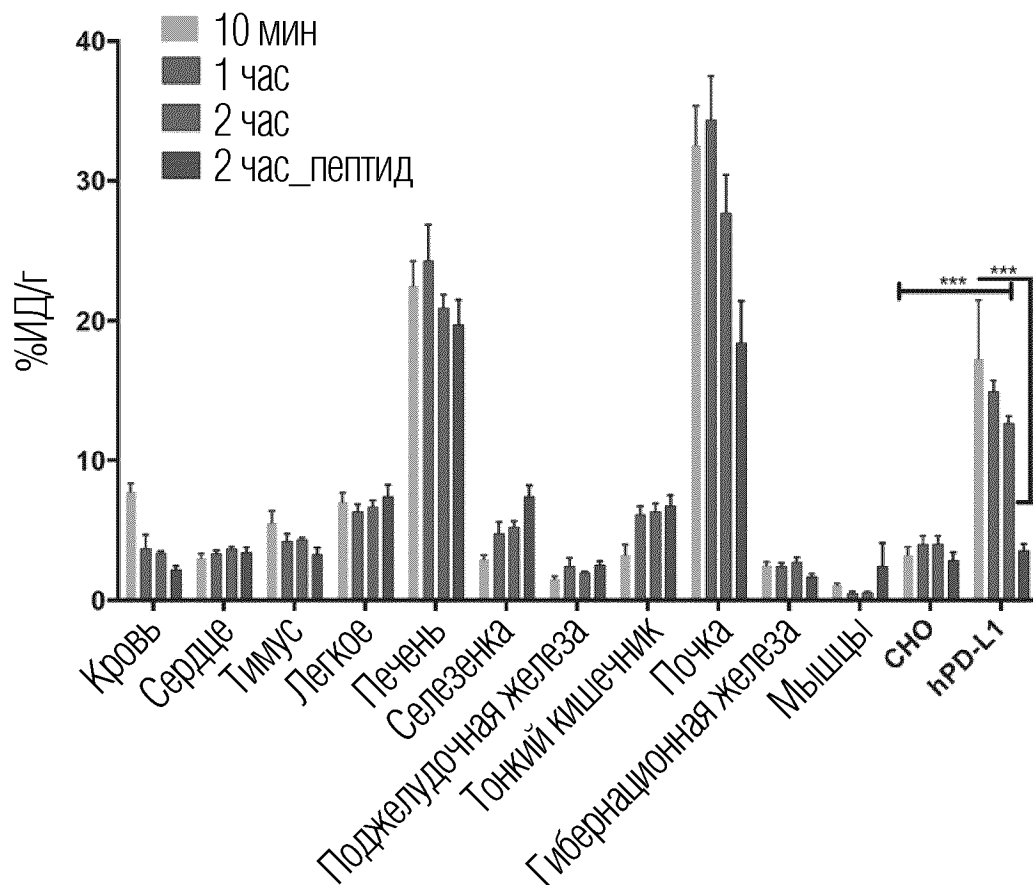
ФИГ. 15А



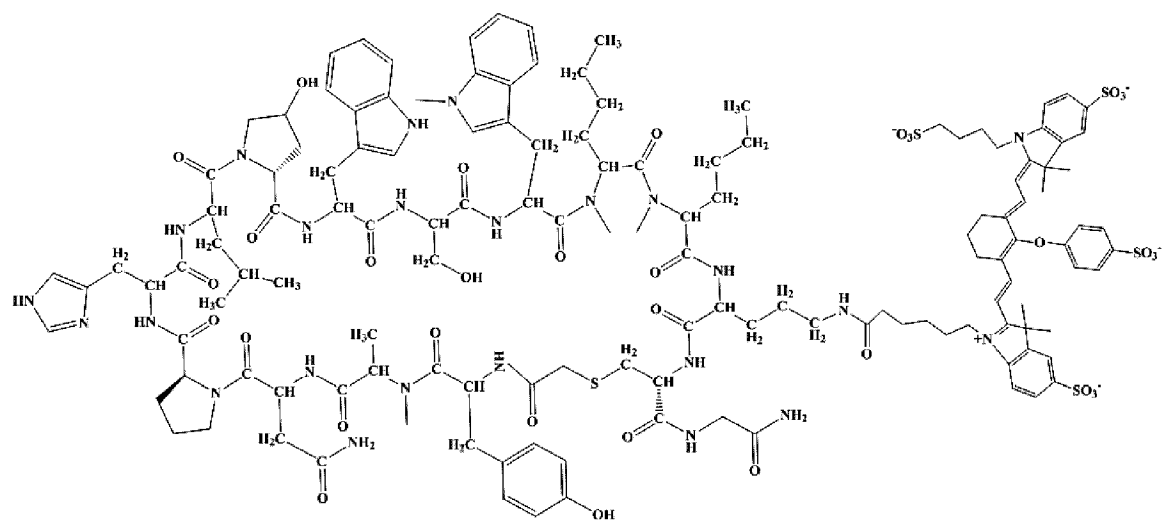
ФИГ. 15В



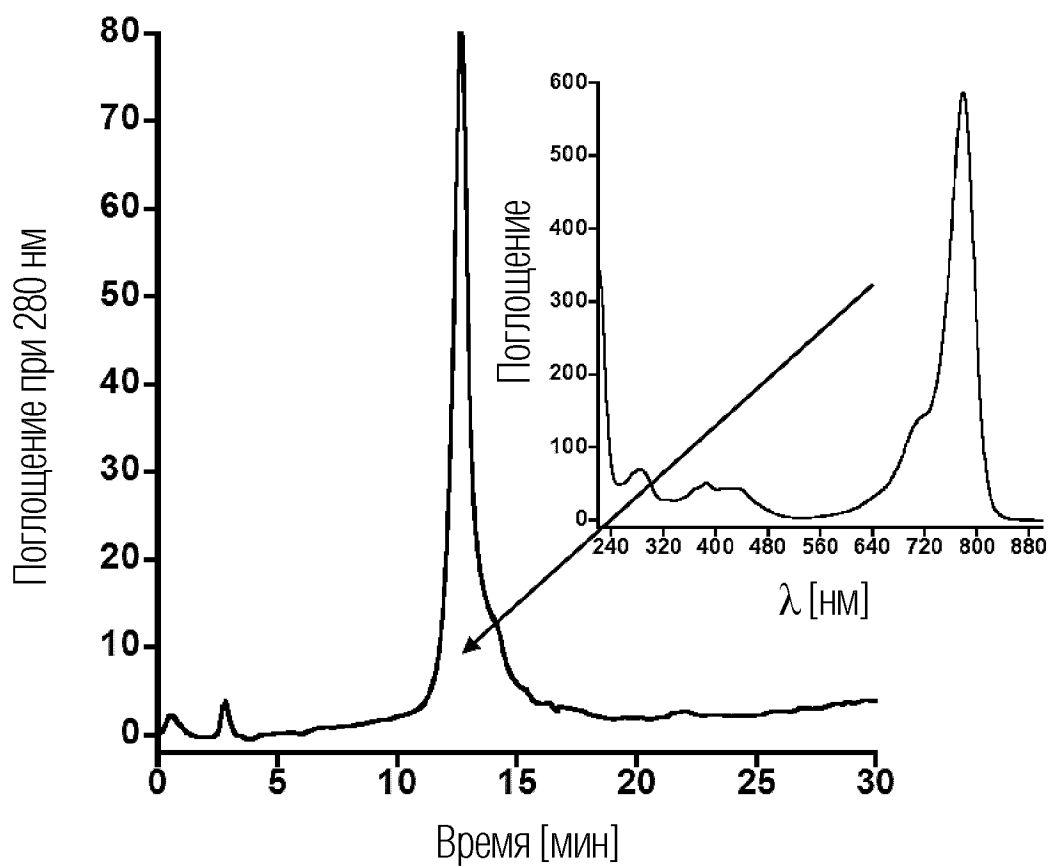
ФИГ. 16



ФИГ. 17



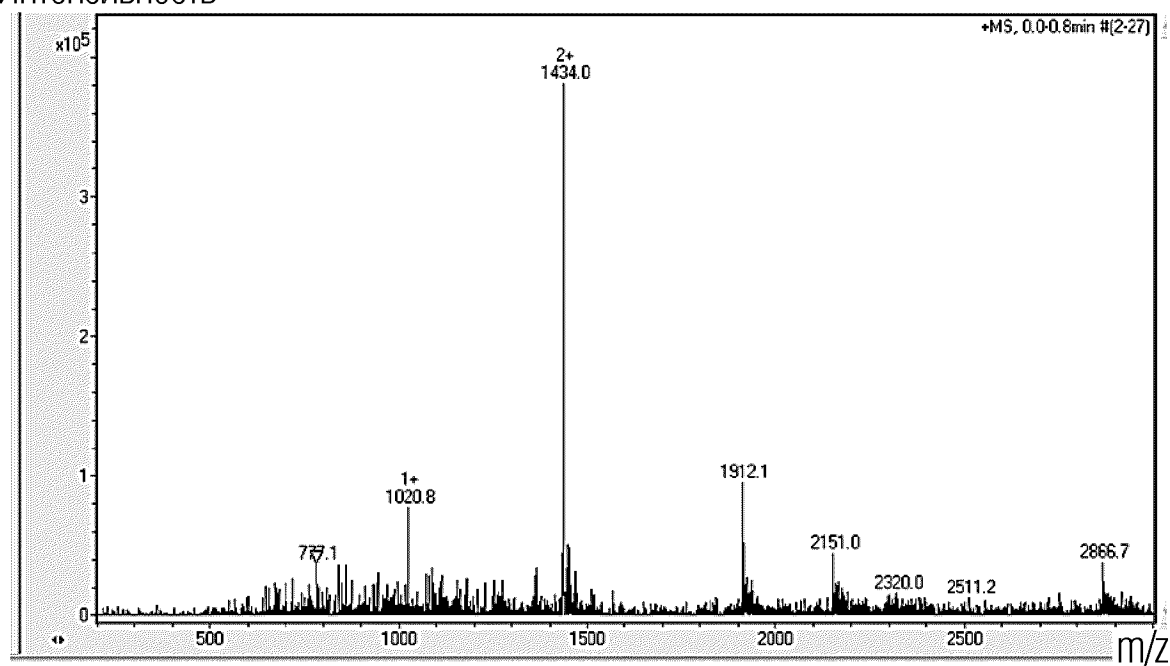
ФИГ. 18А



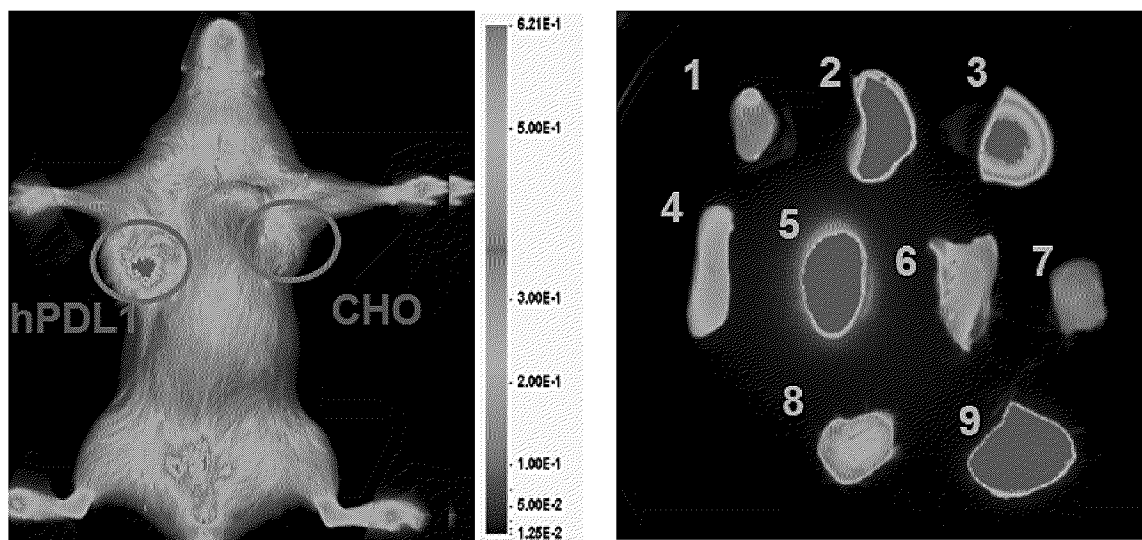
ФИГ. 18В

24/60

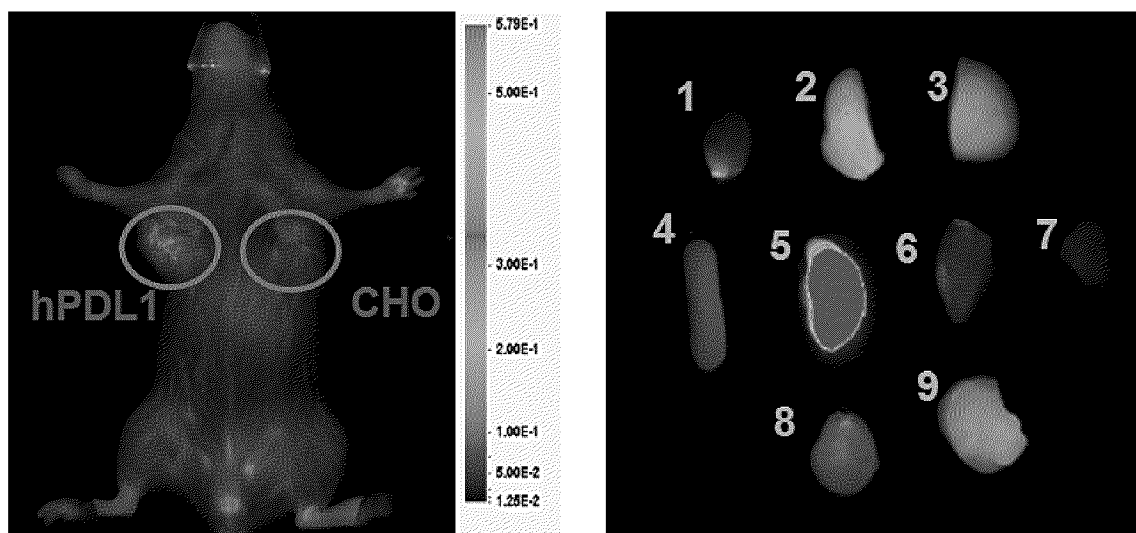
Интенсивность



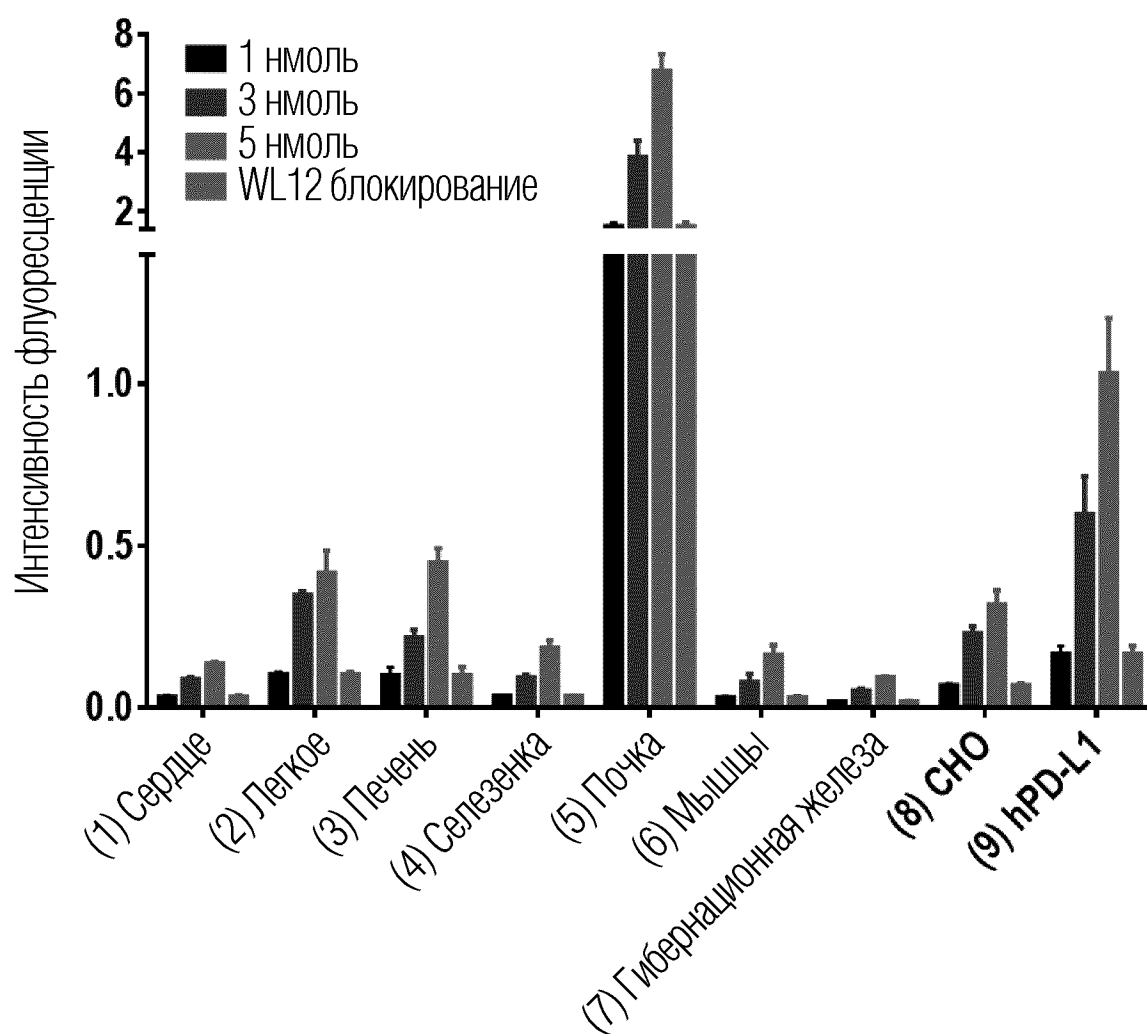
ФИГ. 18С



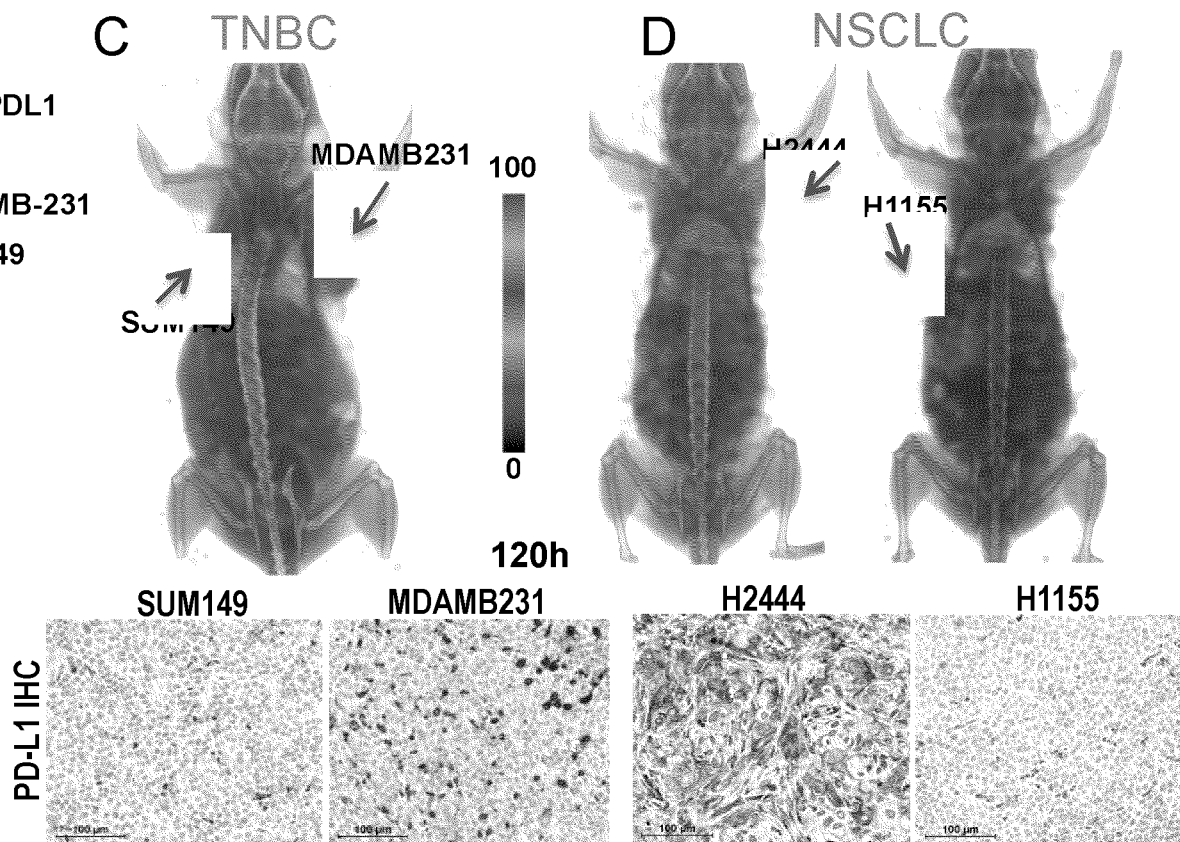
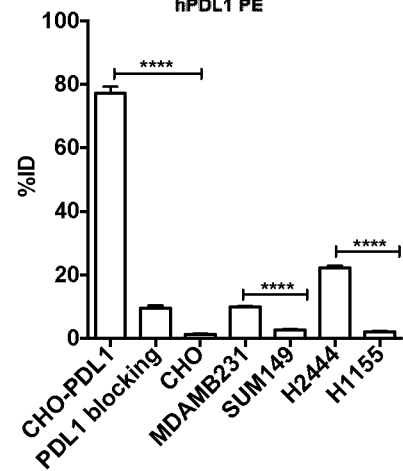
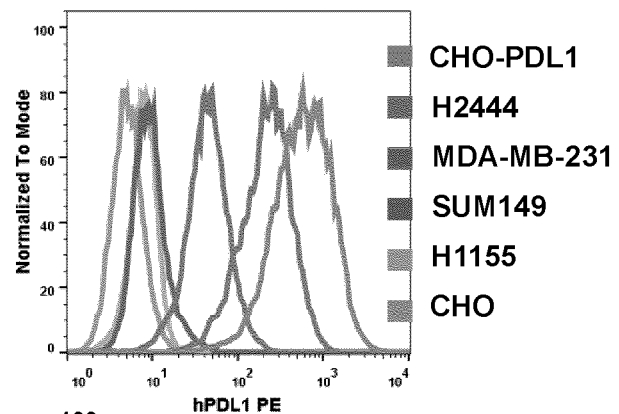
ФИГ. 19А



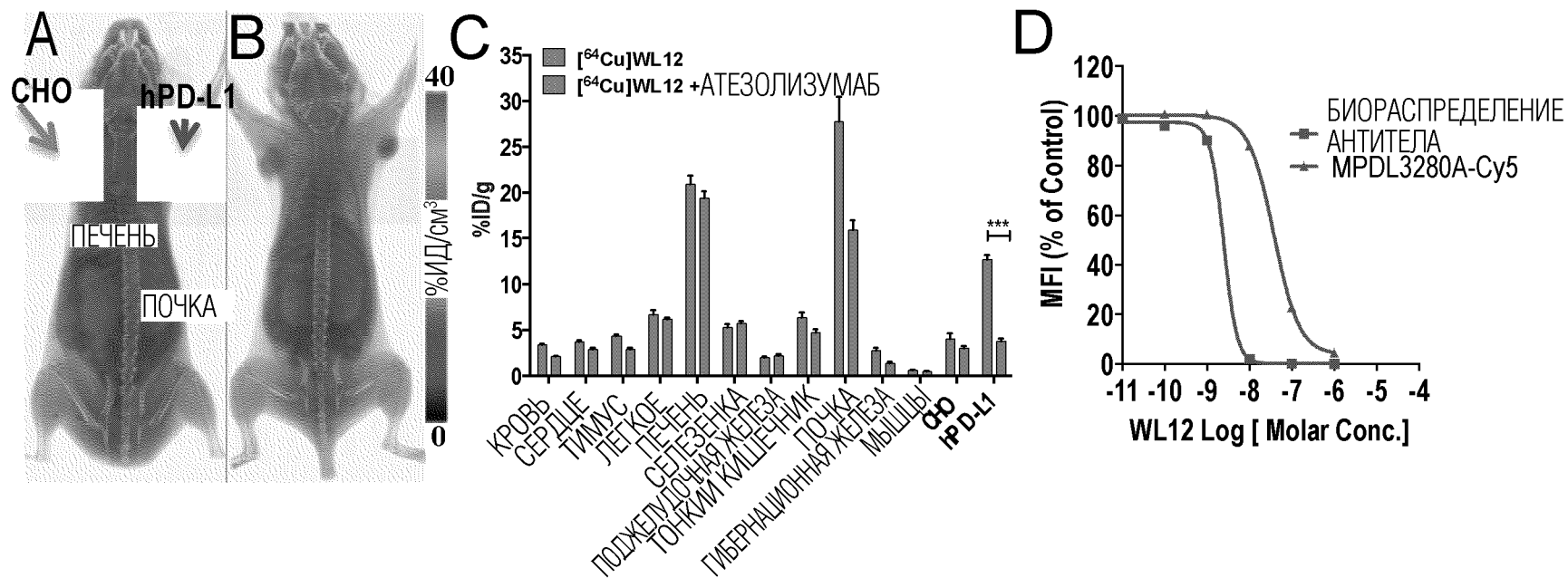
ФИГ. 19В



ФИГ. 19С

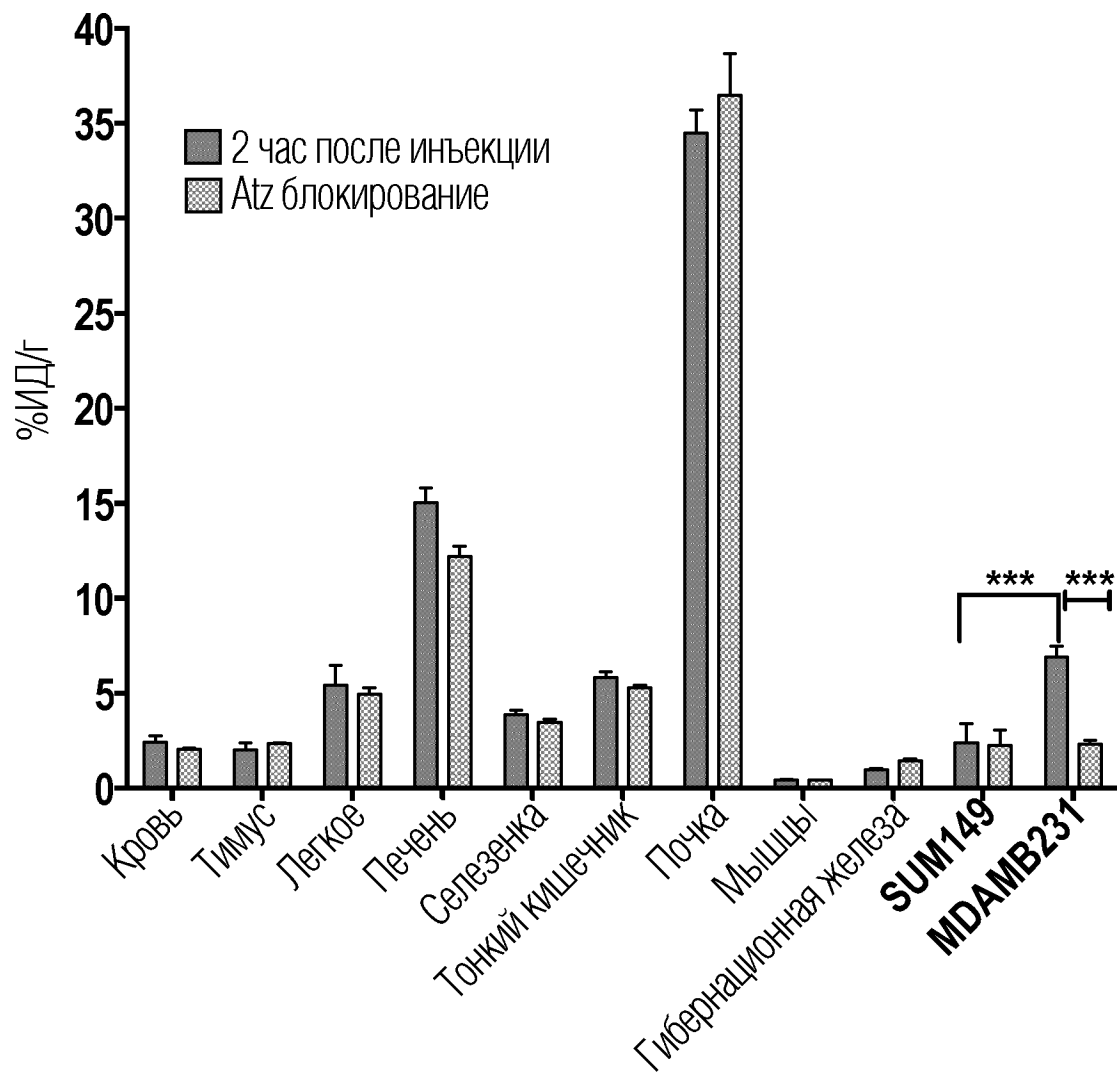


ФИГ. 20

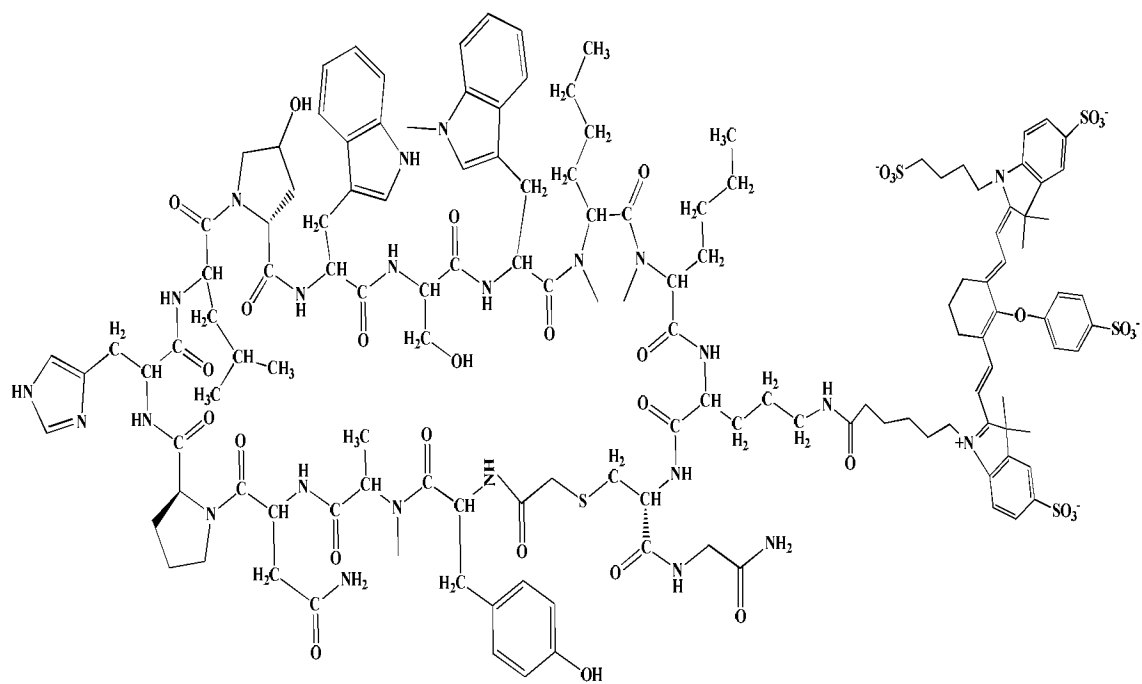


ФИГ. 21

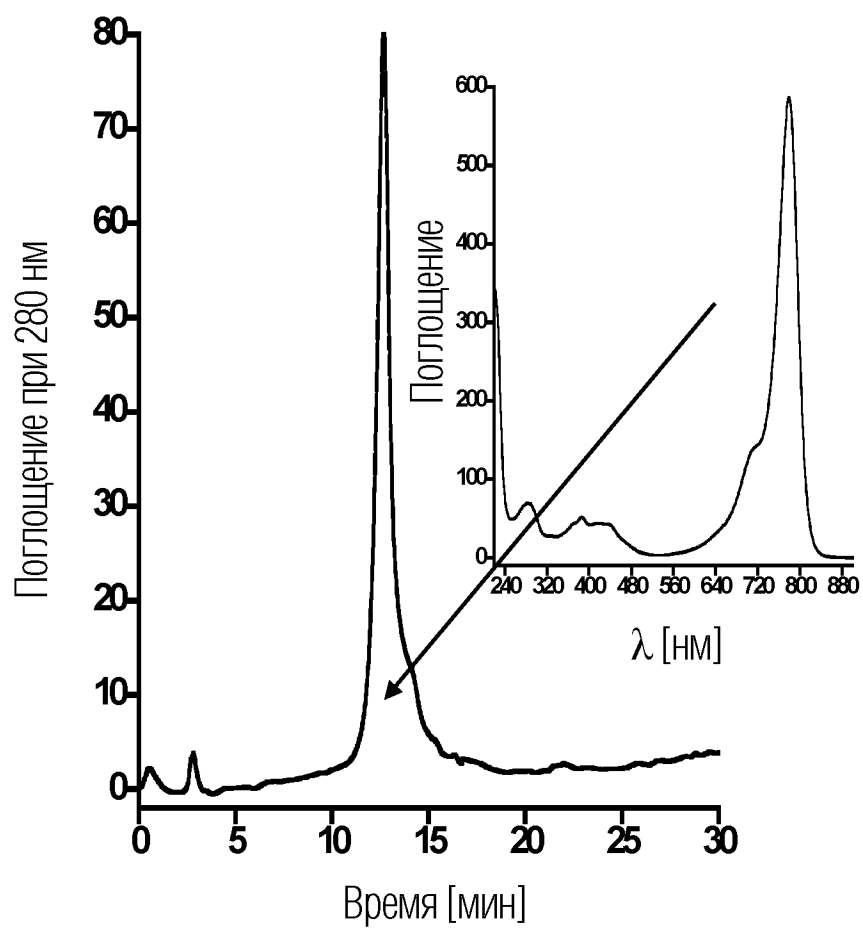
30/60



ФИГ. 22



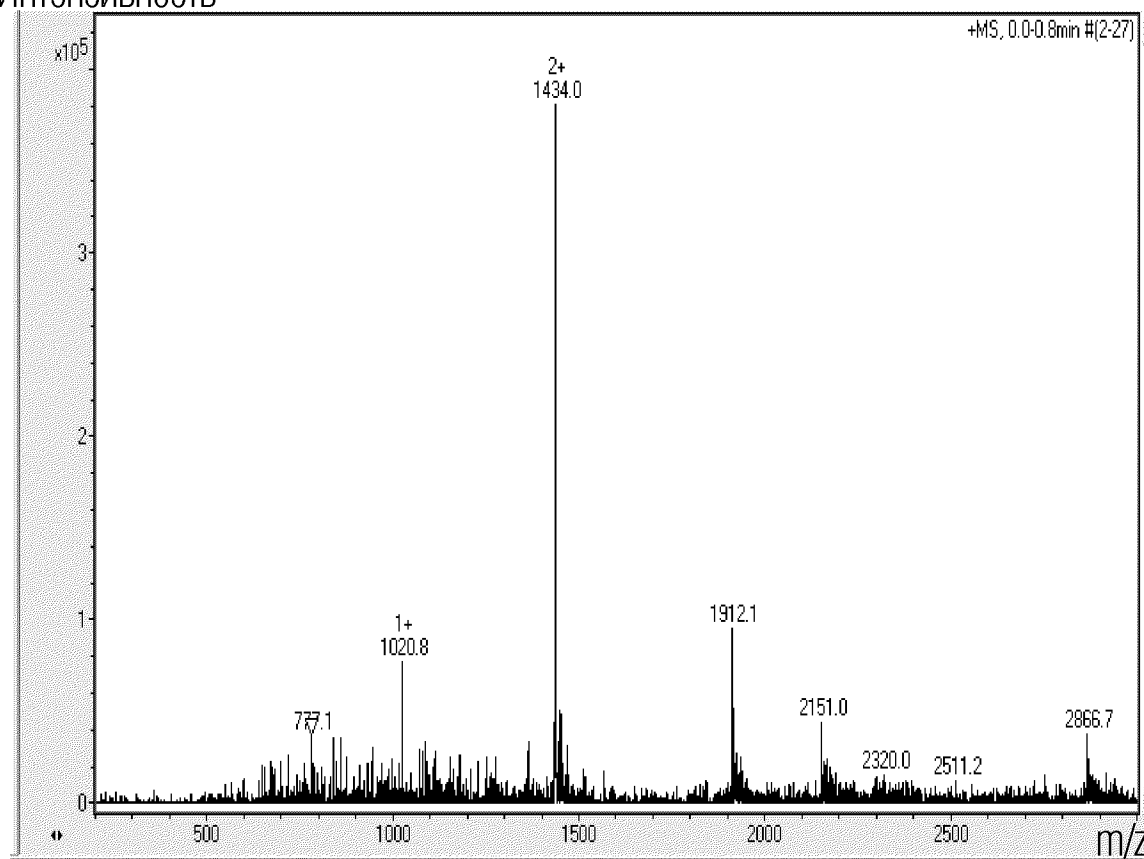
ФИГ. 23А



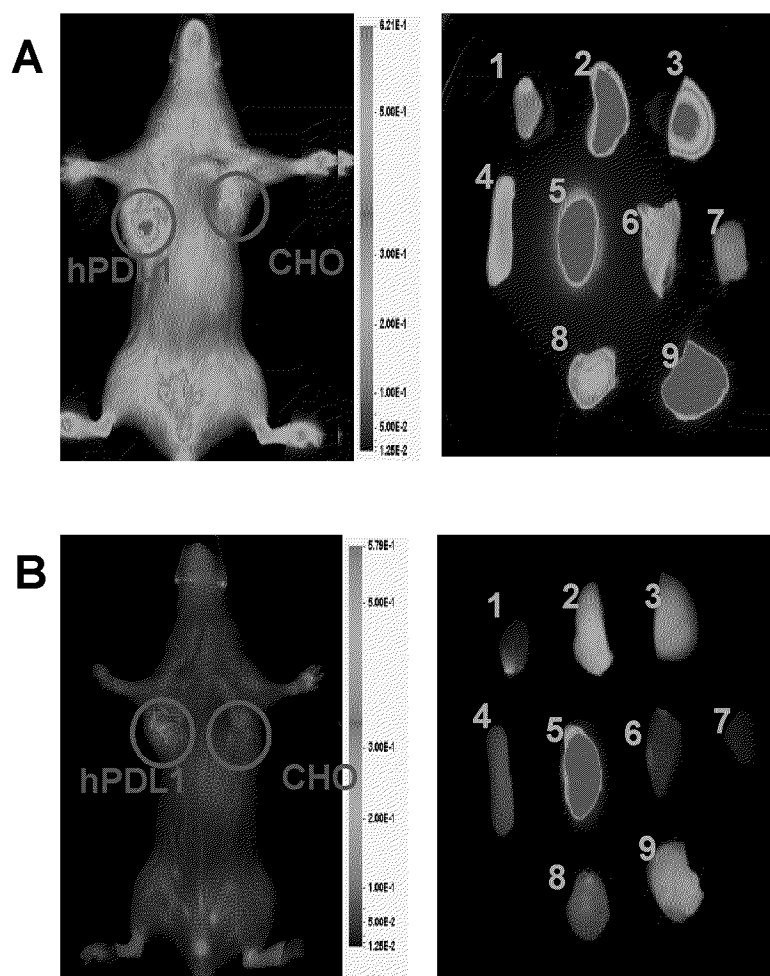
ФИГ. 23В

33/60

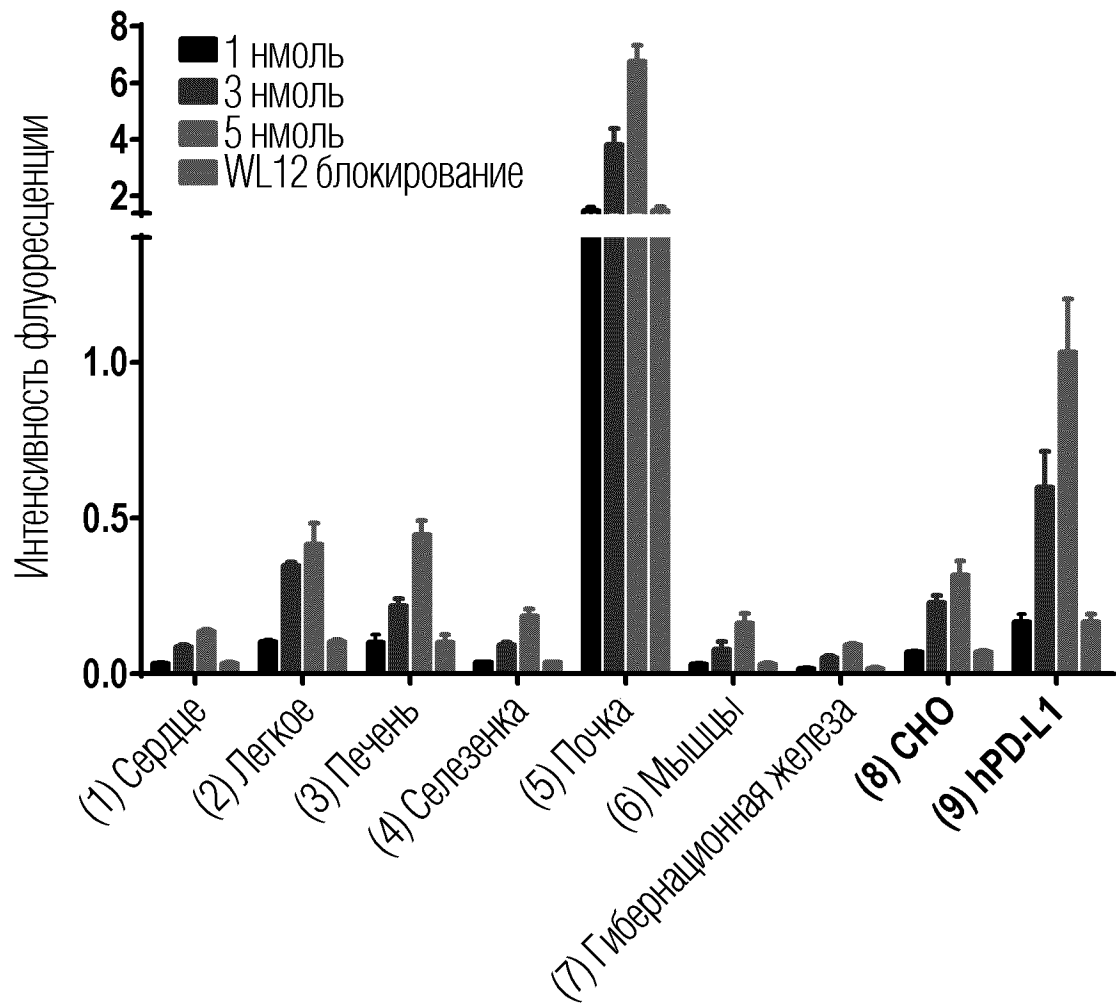
Интенсивность



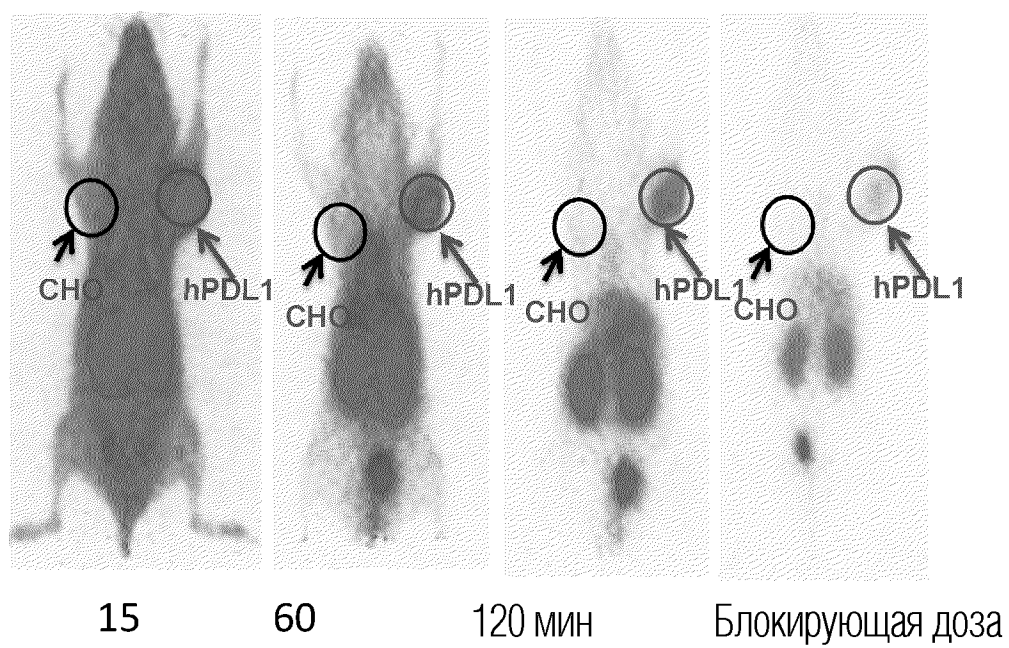
ФИГ. 23С



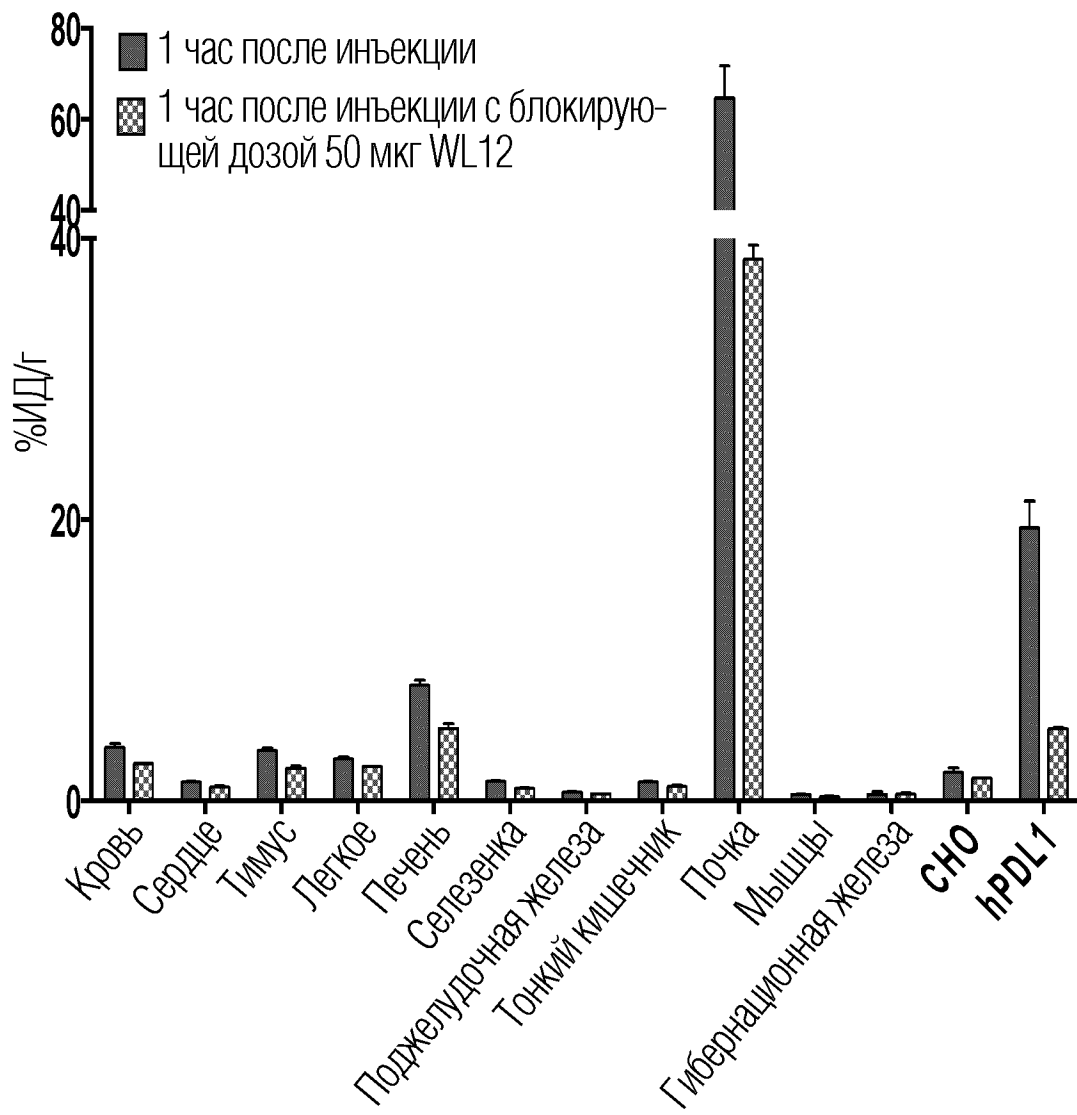
ФИГ. 24А и 24В



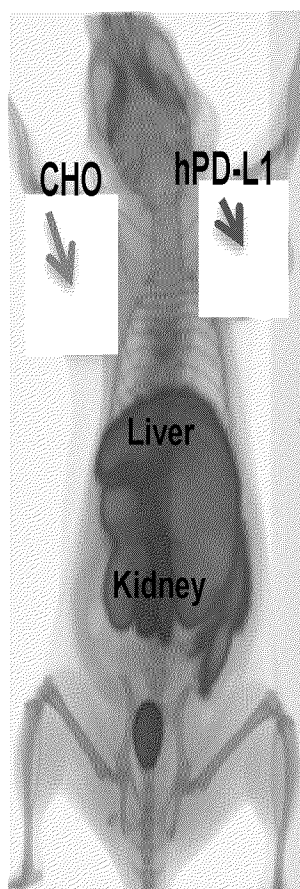
ФИГ. 24С



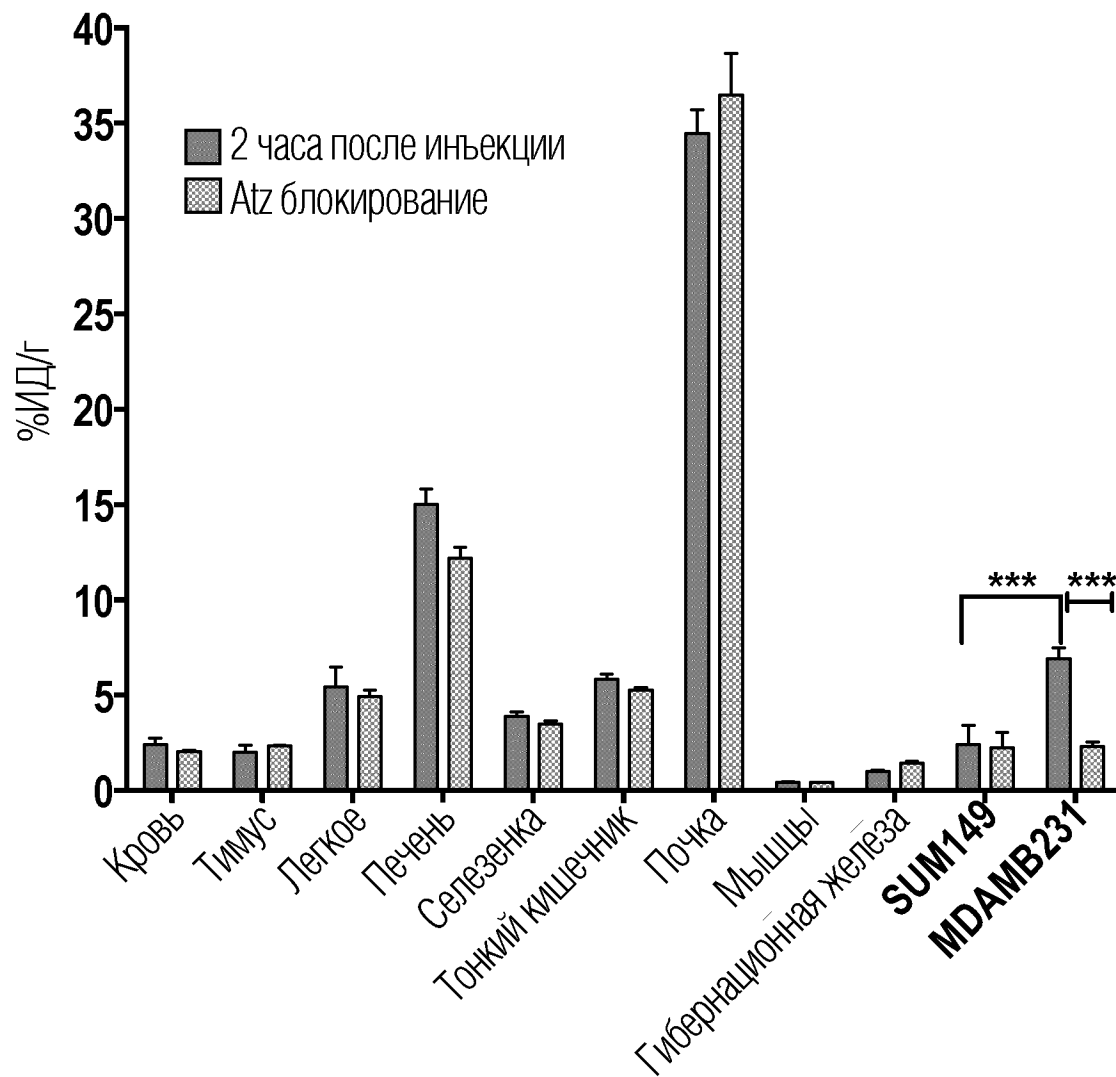
ФИГ. 25А



ФИГ. 25В

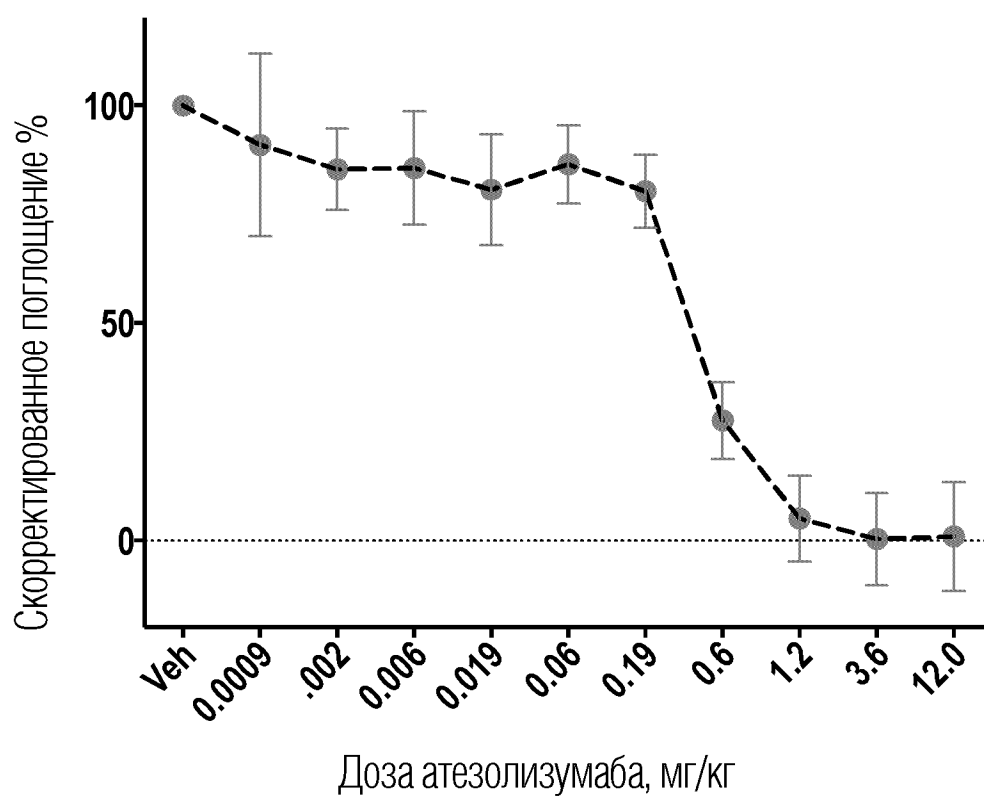


ФИГ. 26

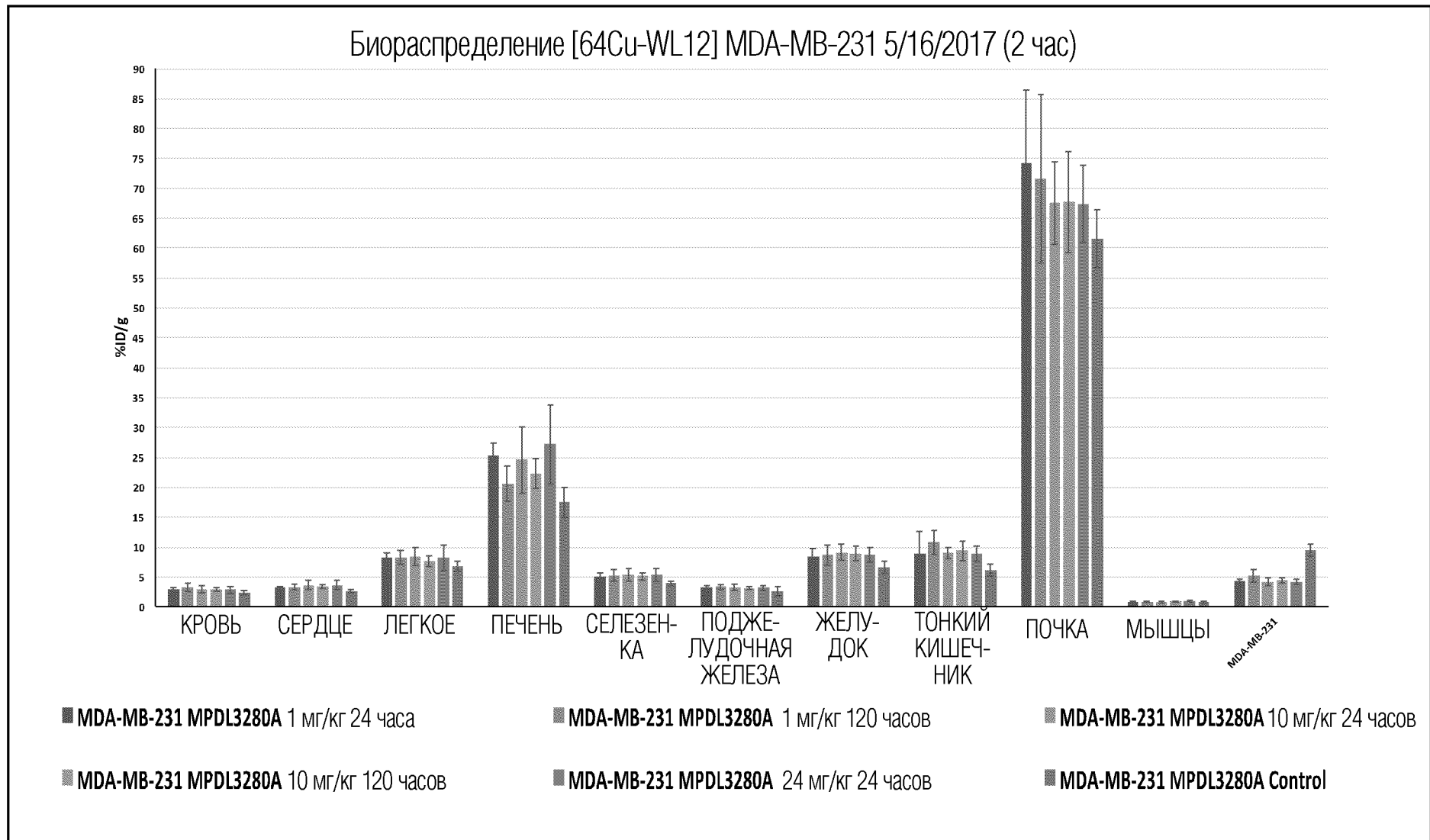


ФИГ. 27

40/60

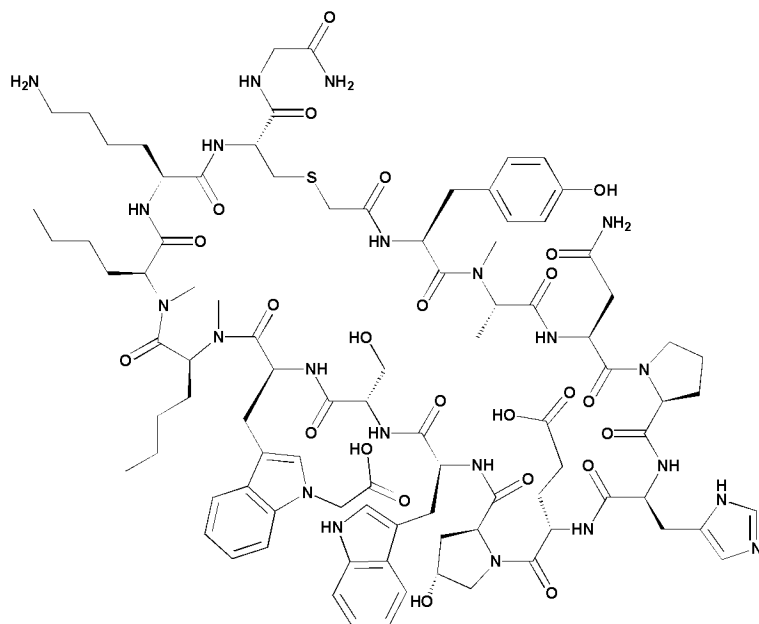


ФИГ. 28



ФИГ. 29

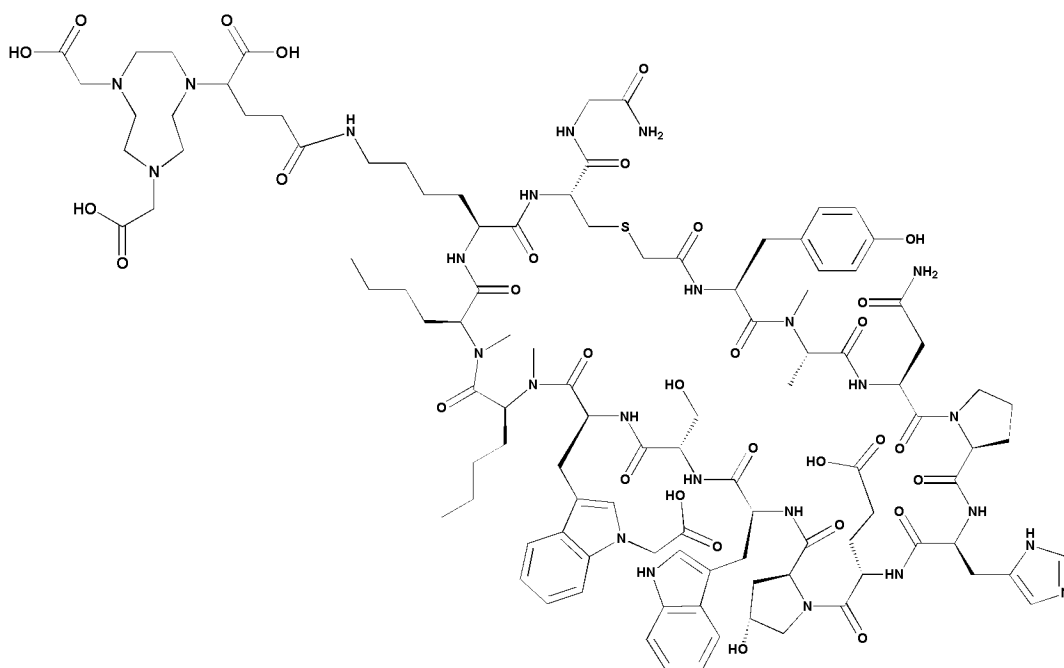
42/60



DK-A-221

Химическая формула: $C_{92}H_{126}N_{22}O_{24}S$

Молекулярная масса: 1956,21

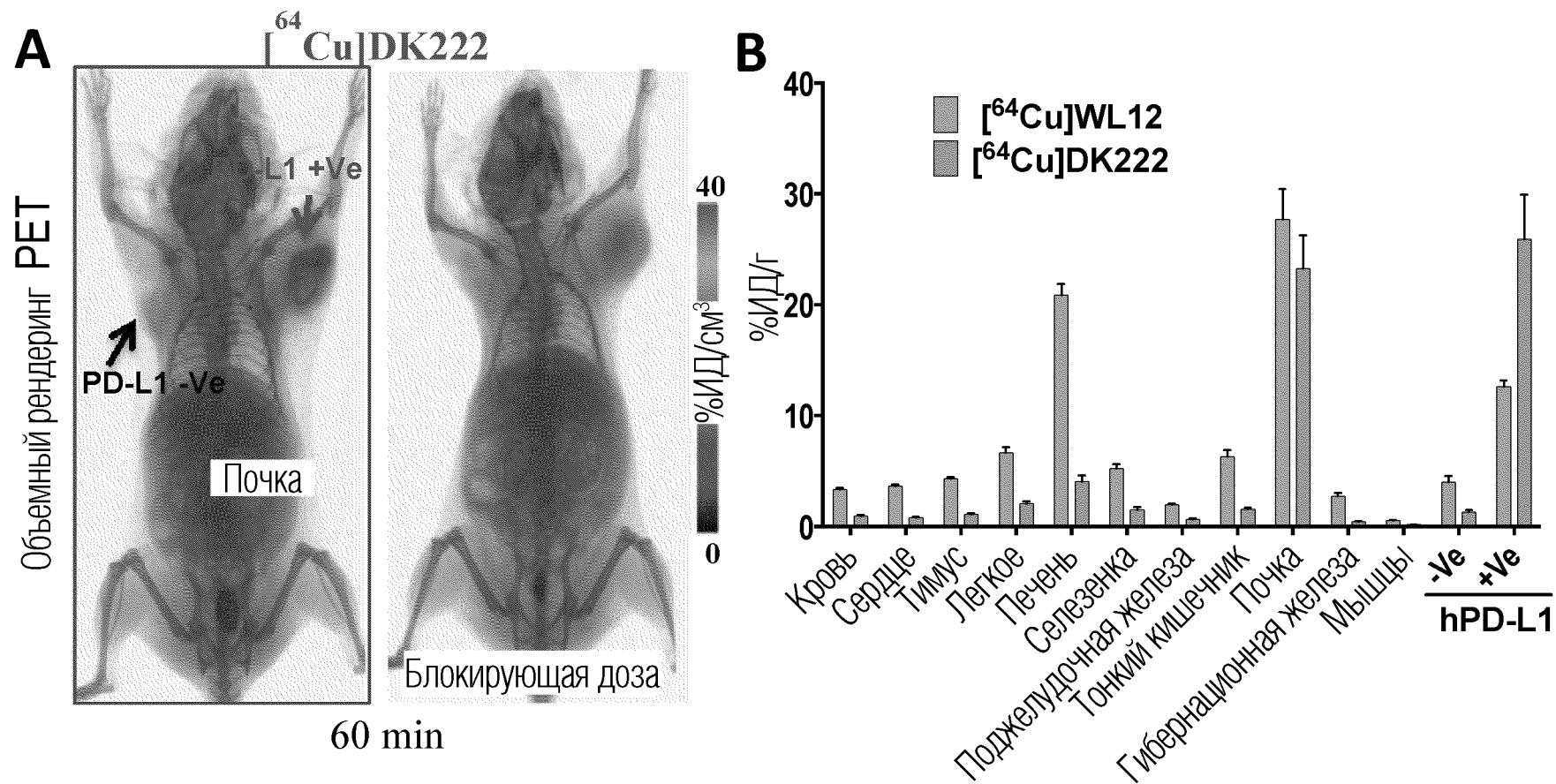


DK-A-222

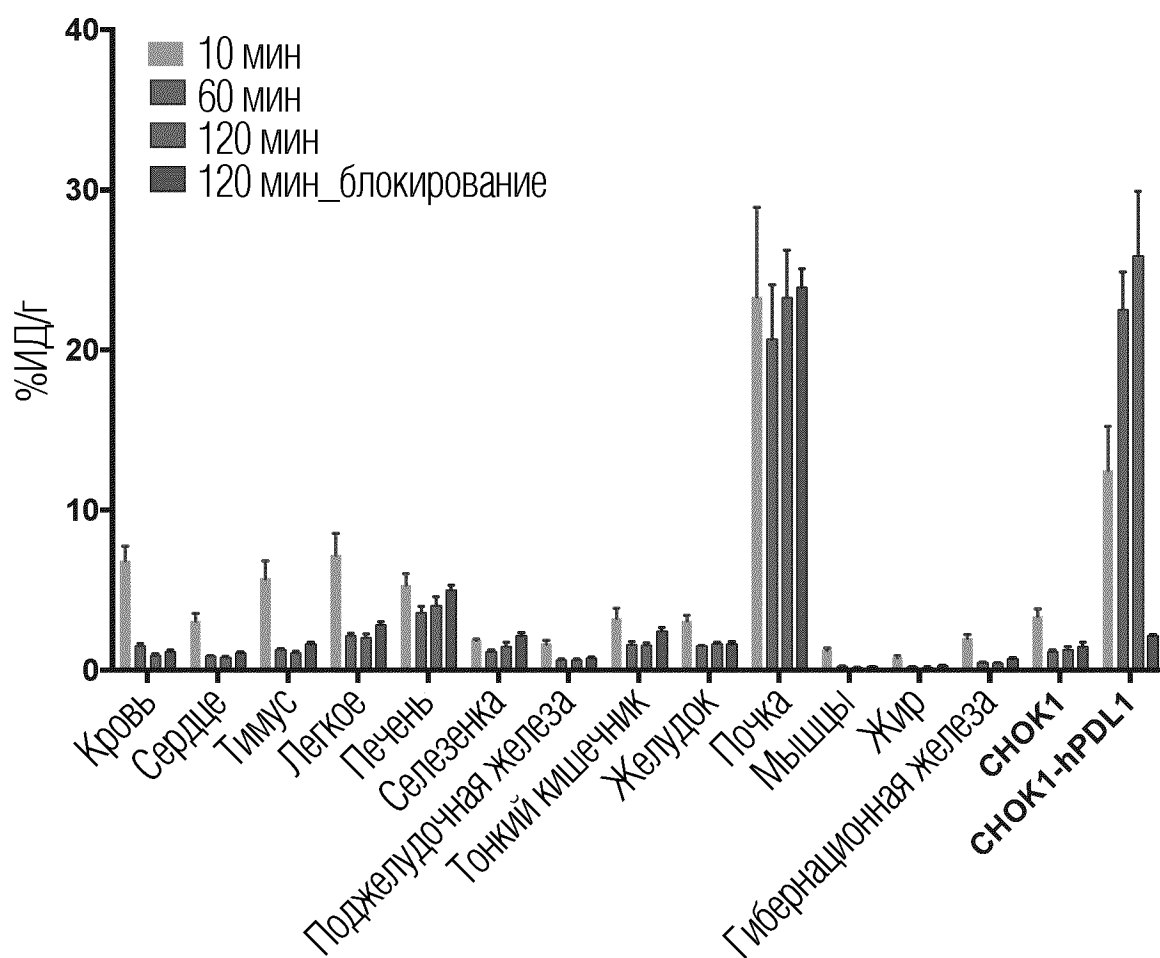
Химическая формула: $C_{107}H_{149}N_{25}O_{31}S$

Молекулярная масса: 2313,57

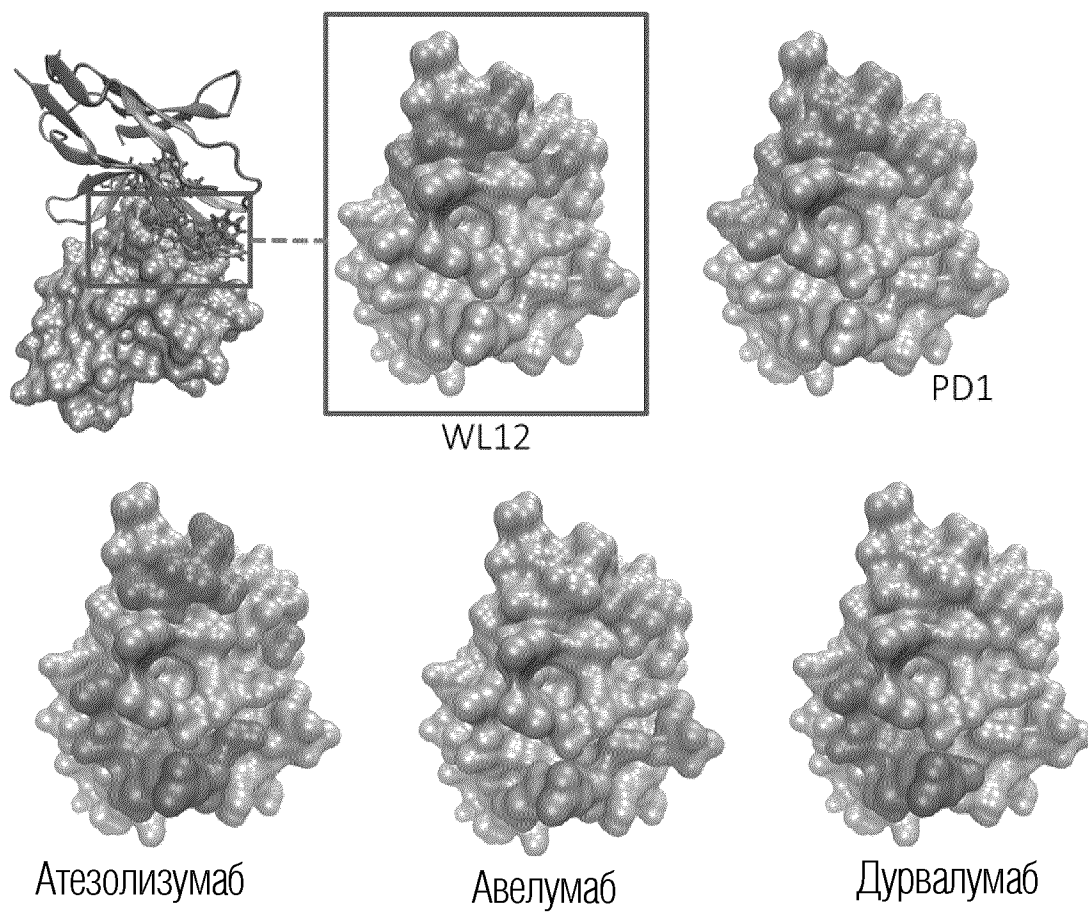
ФИГ. 30



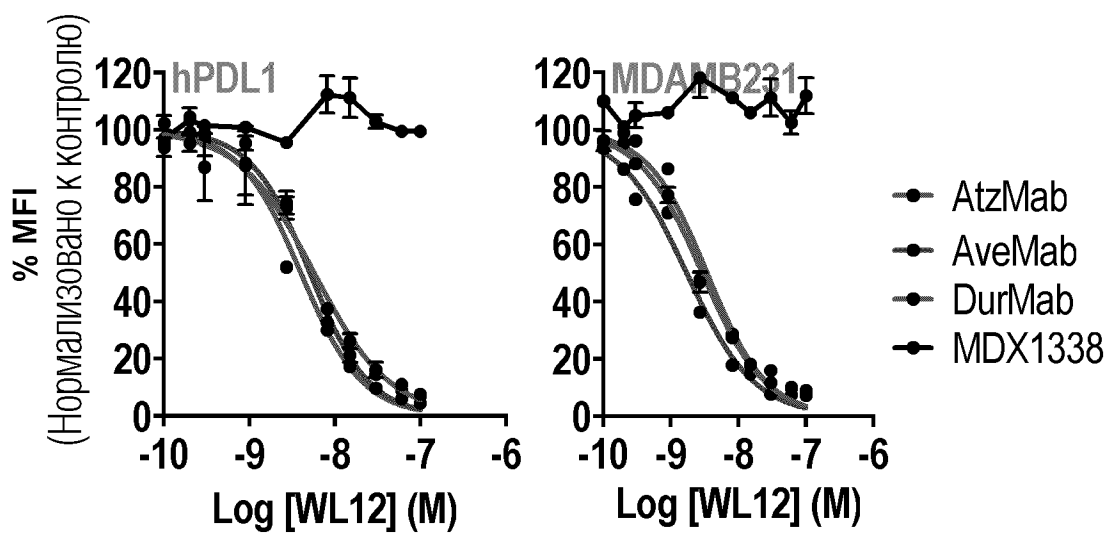
ФИГ. 31



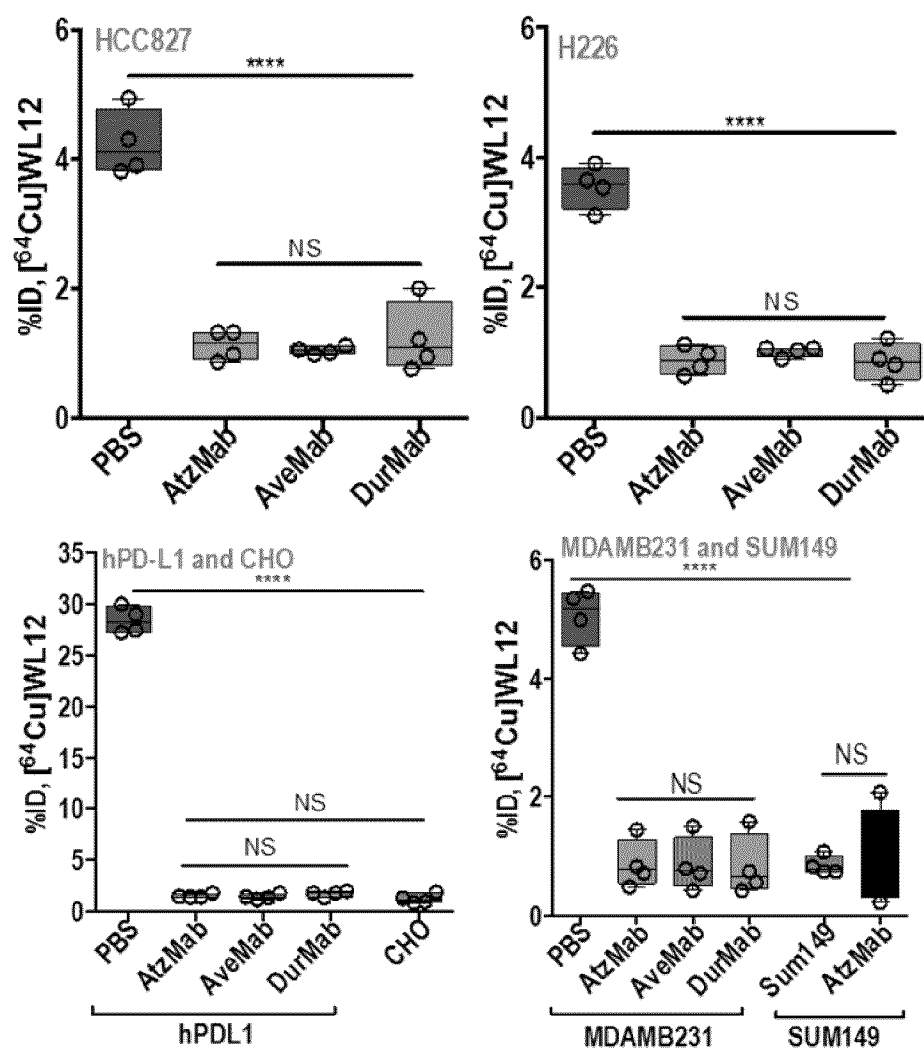
ФИГ. 32



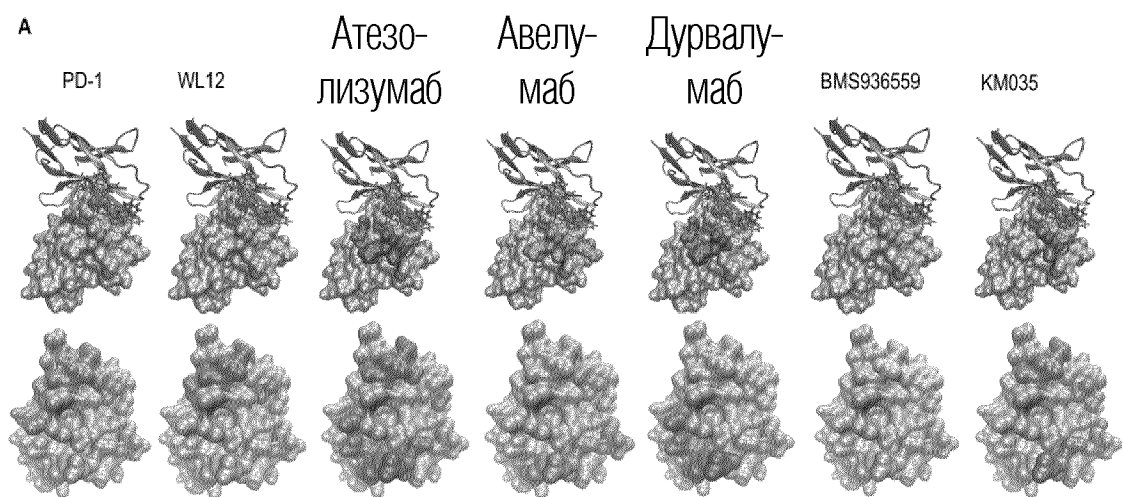
ФИГ. 33А



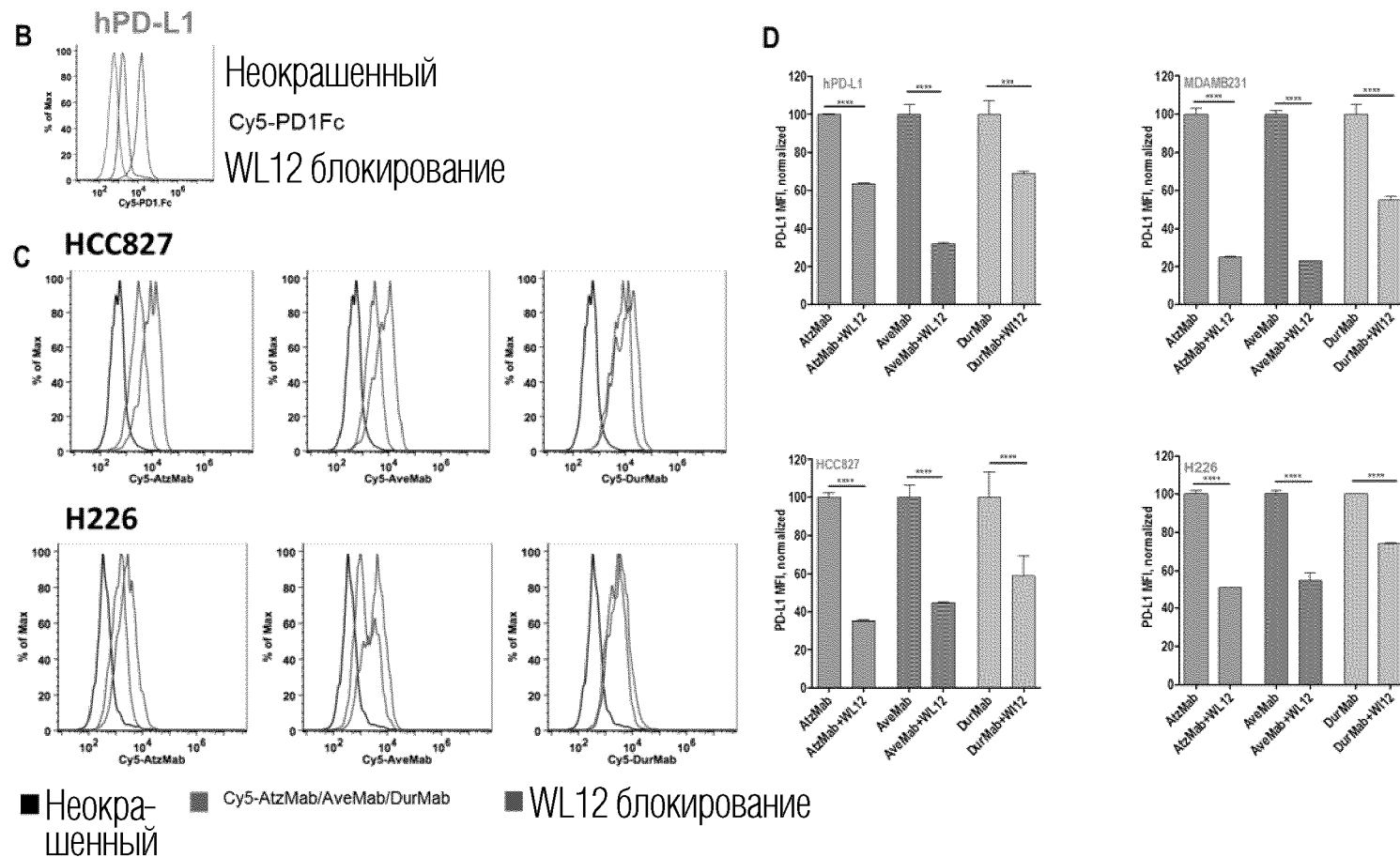
ФИГ. 33В



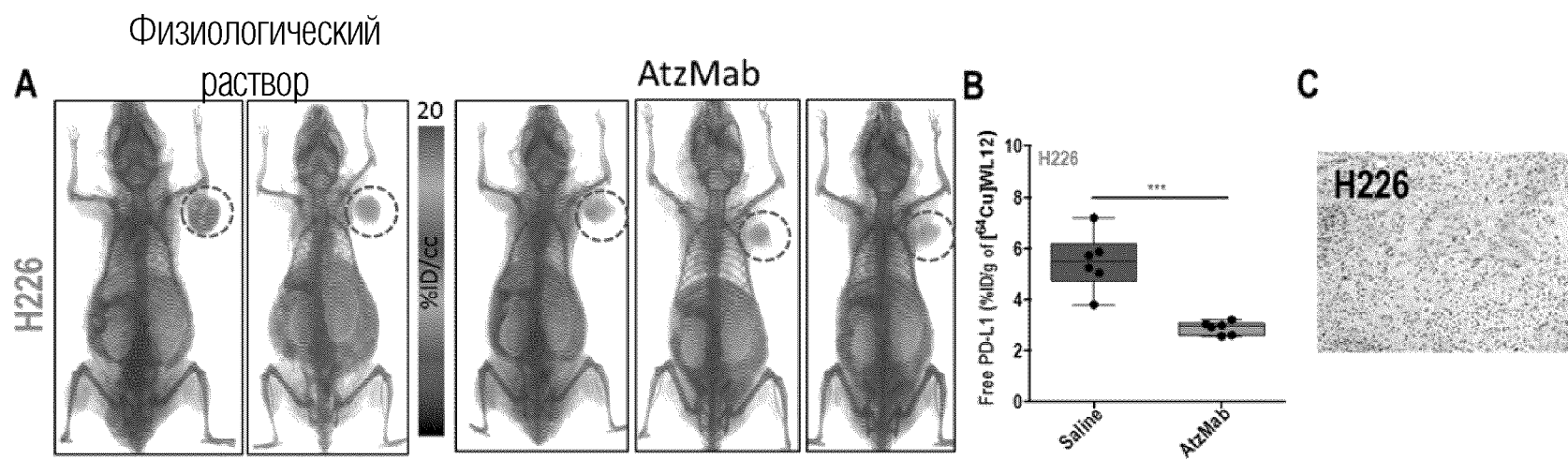
ФИГ. 33С



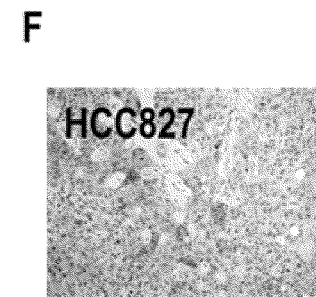
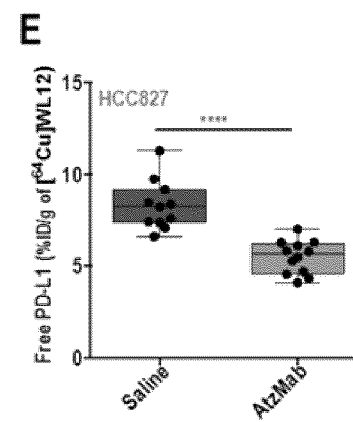
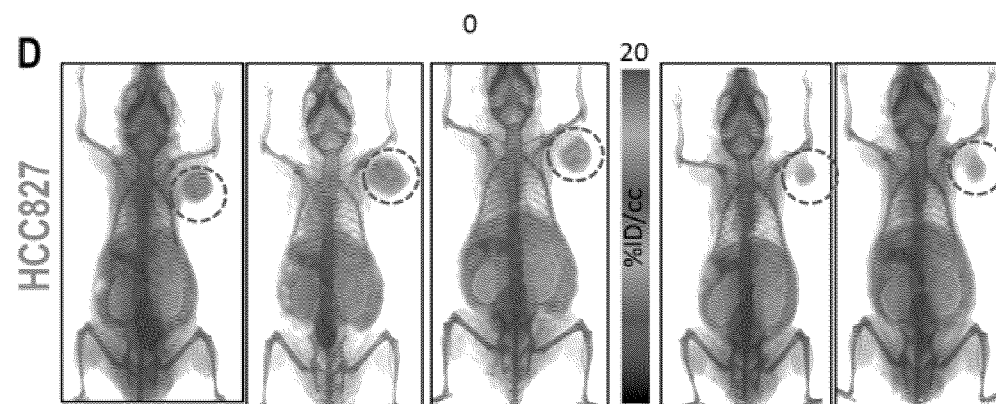
ФИГ. 34А



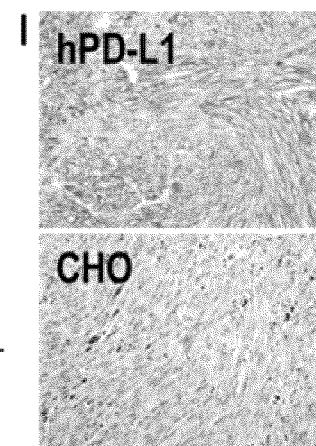
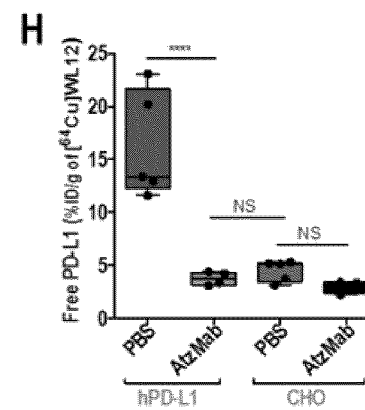
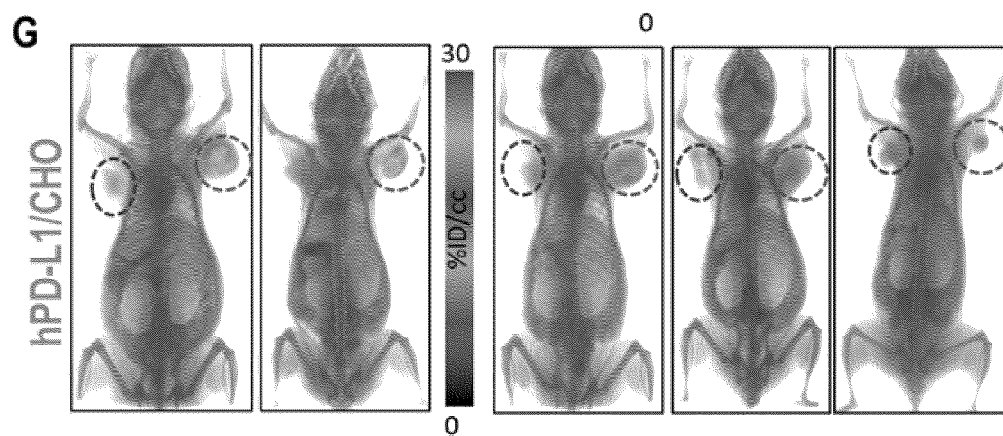
ФИГ. 34В, 34С и 34D



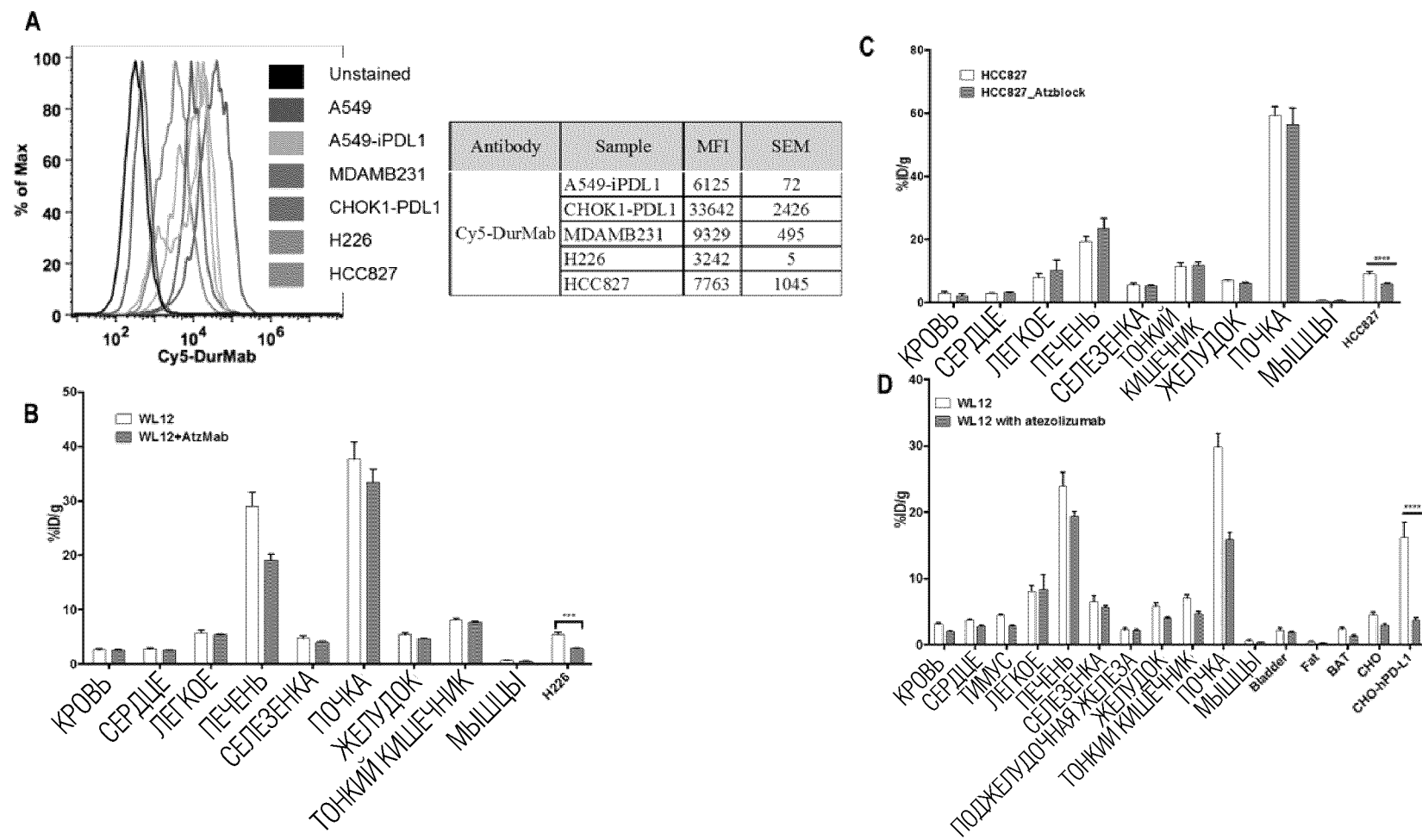
ФИГ. 35А, 35В и 35С



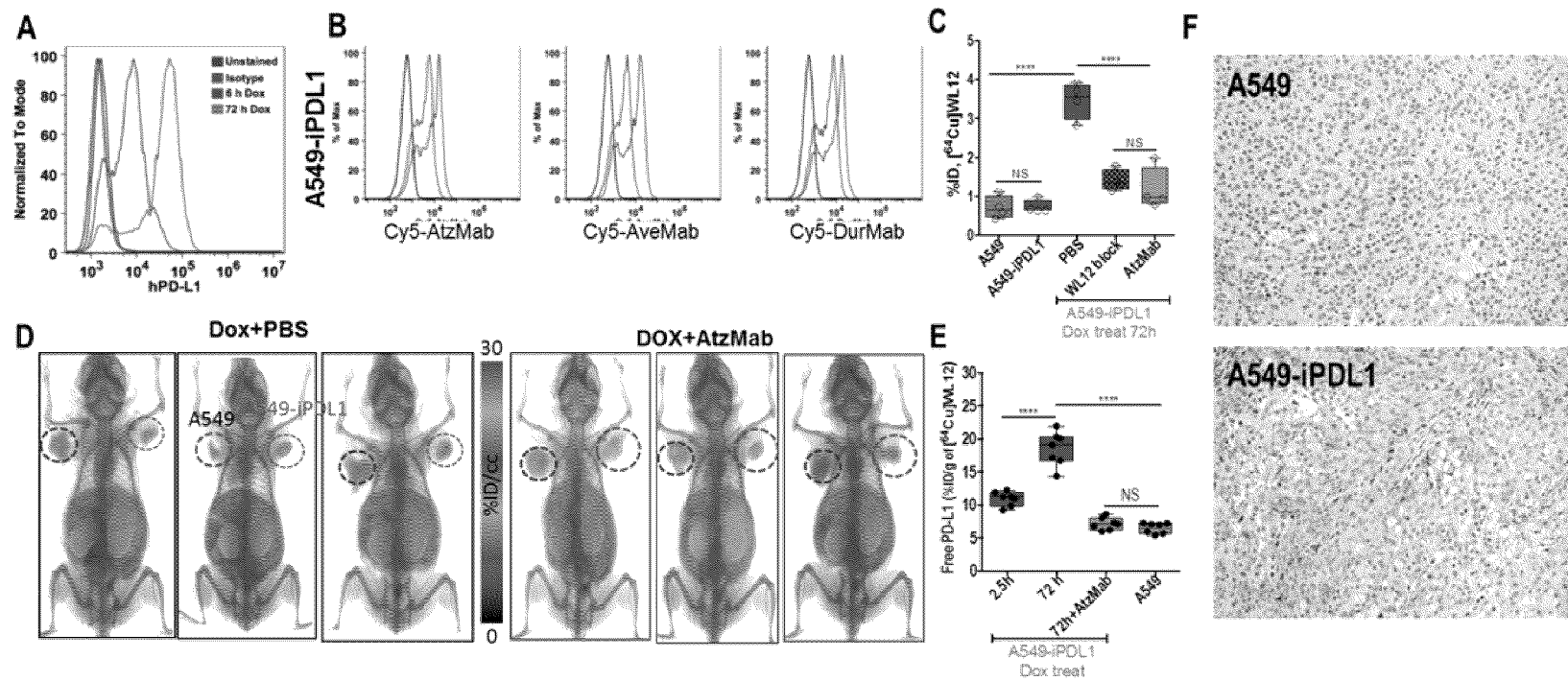
ФИГ. 35D, 35E и 35F



ФИГ. 35G, 35H и 35I

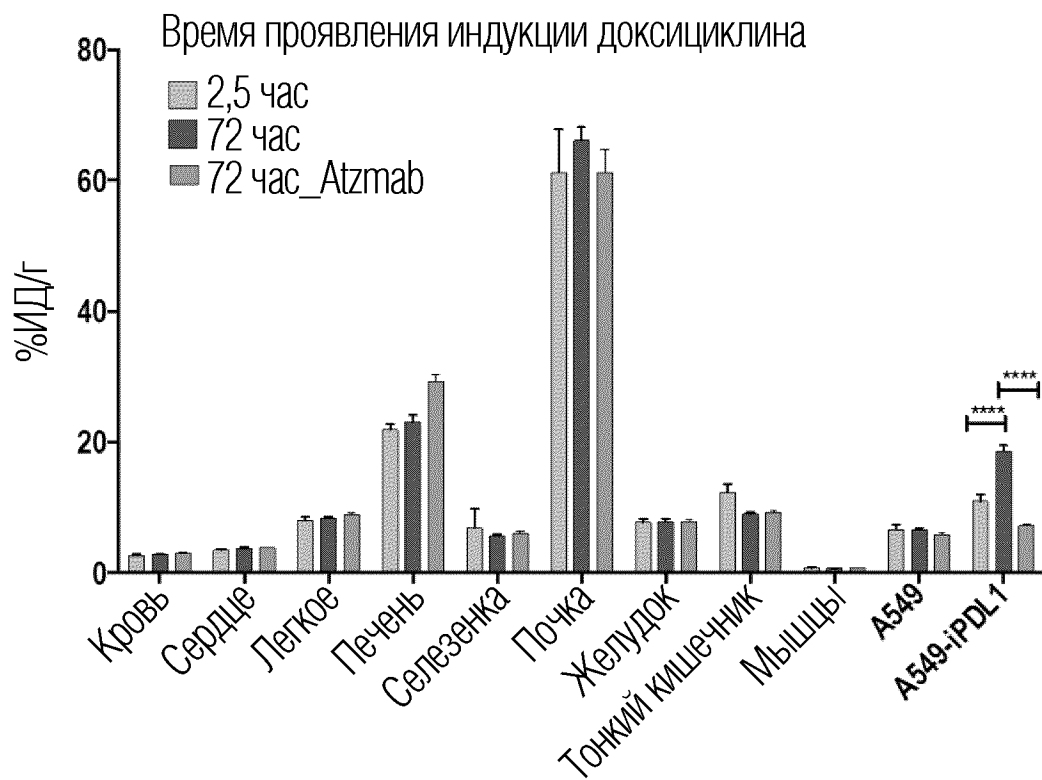


ФИГ. 36

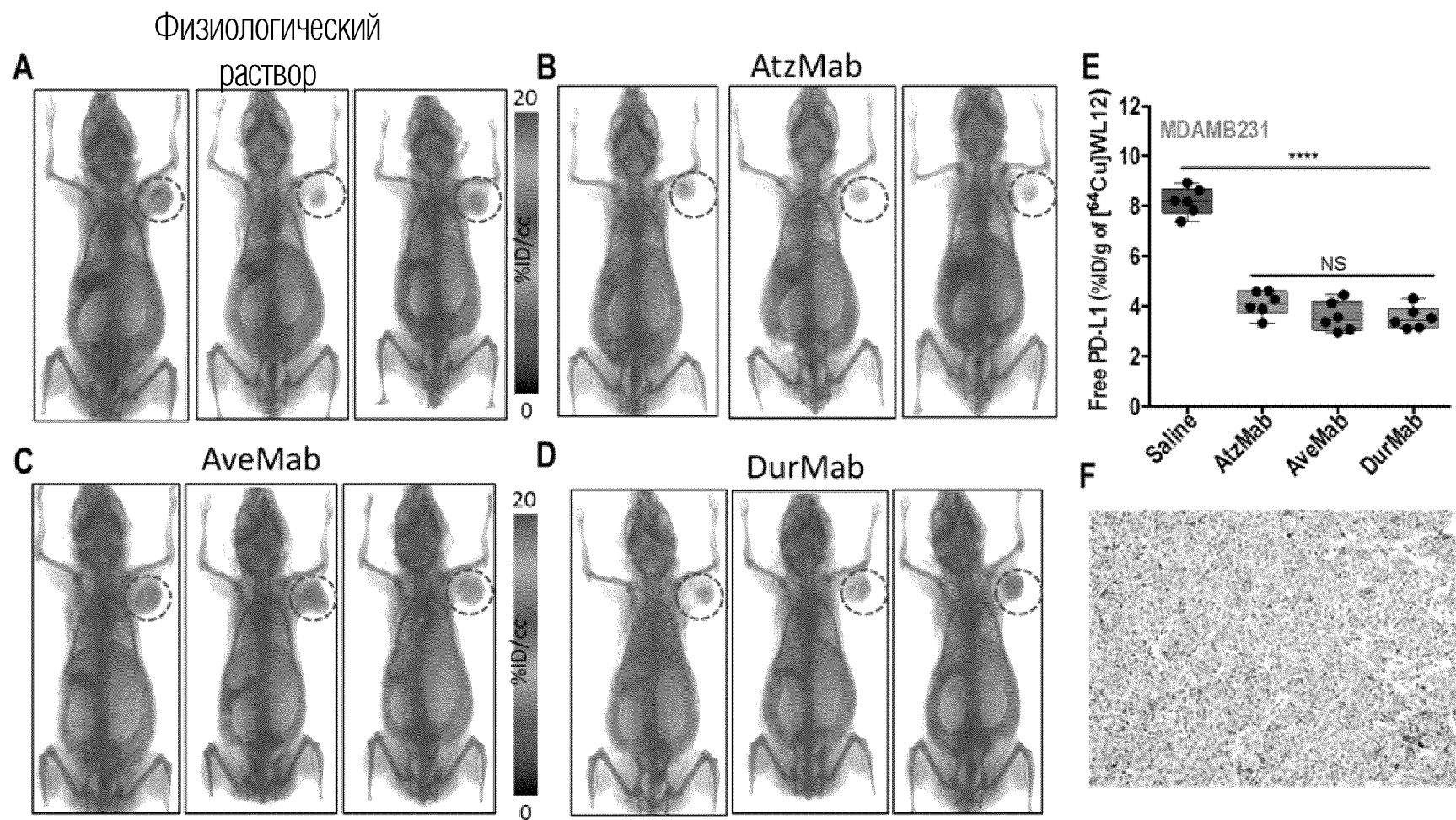


ФИГ. 37

55/60

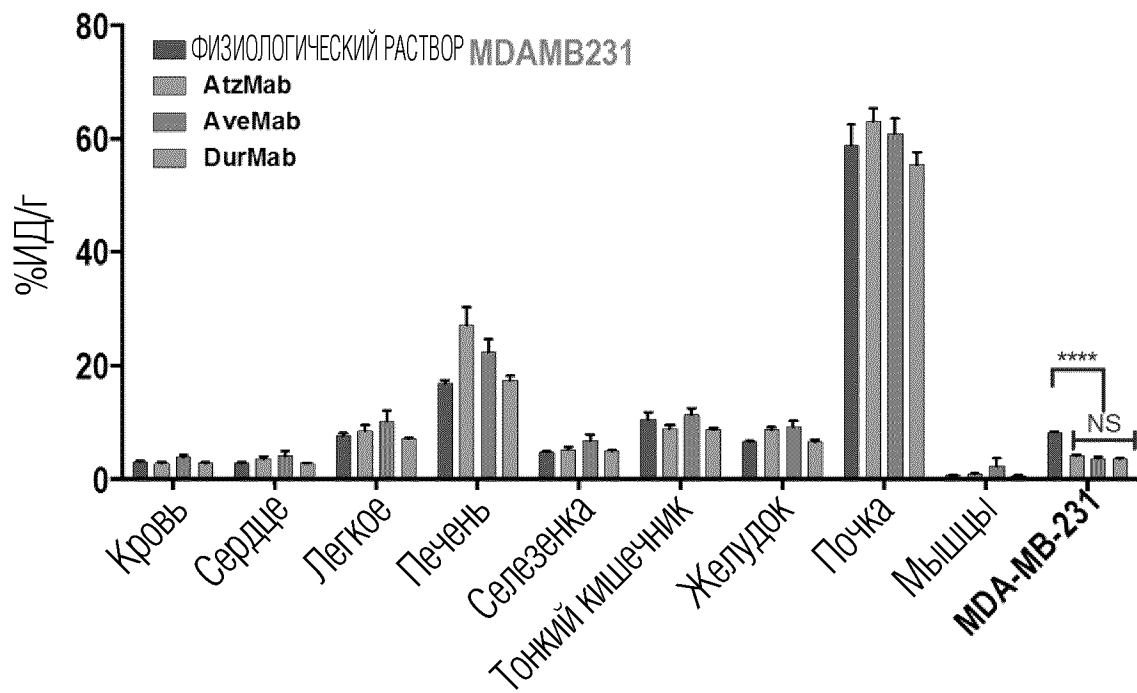


ФИГ. 38

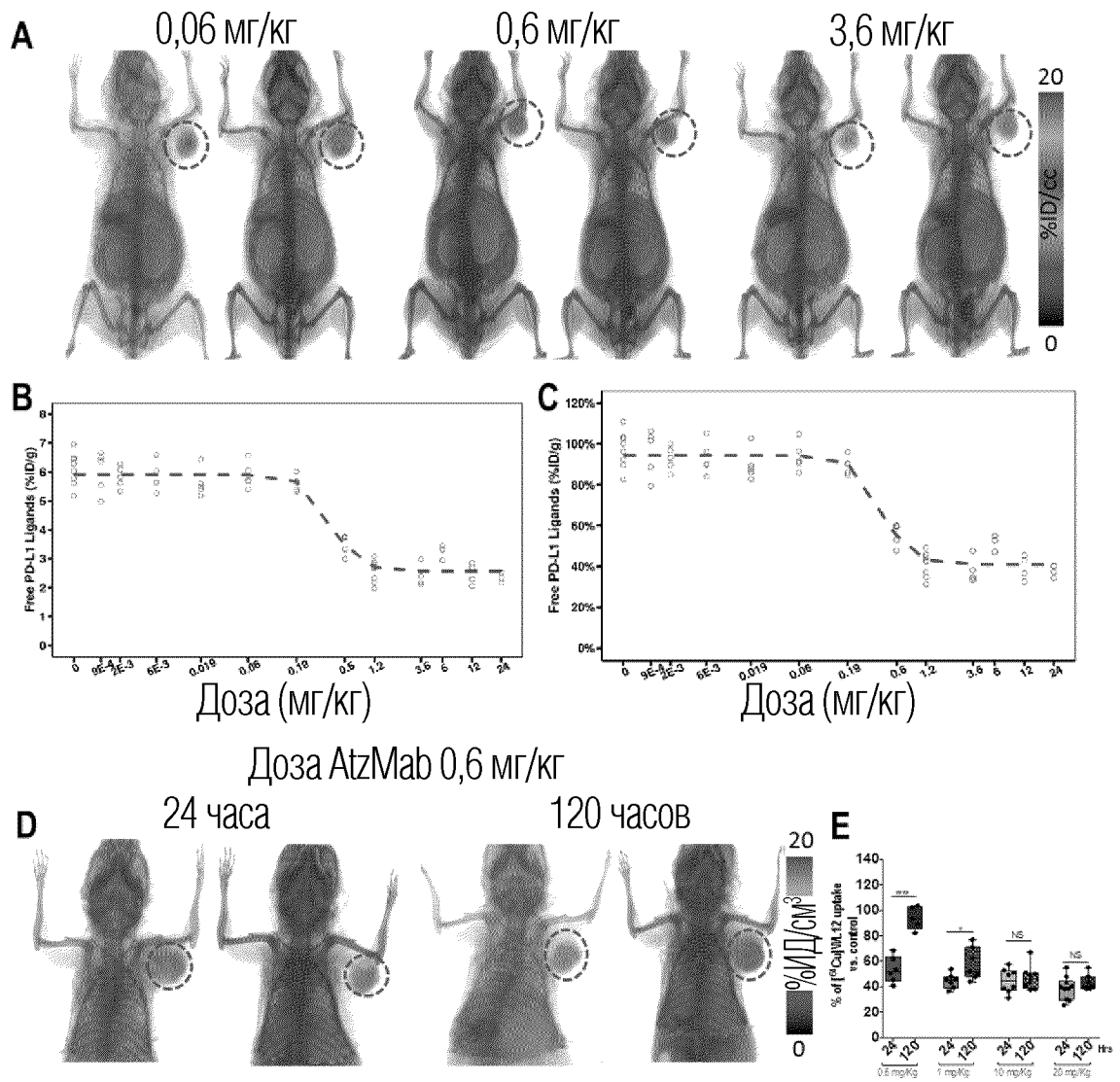


ФИГ. 39

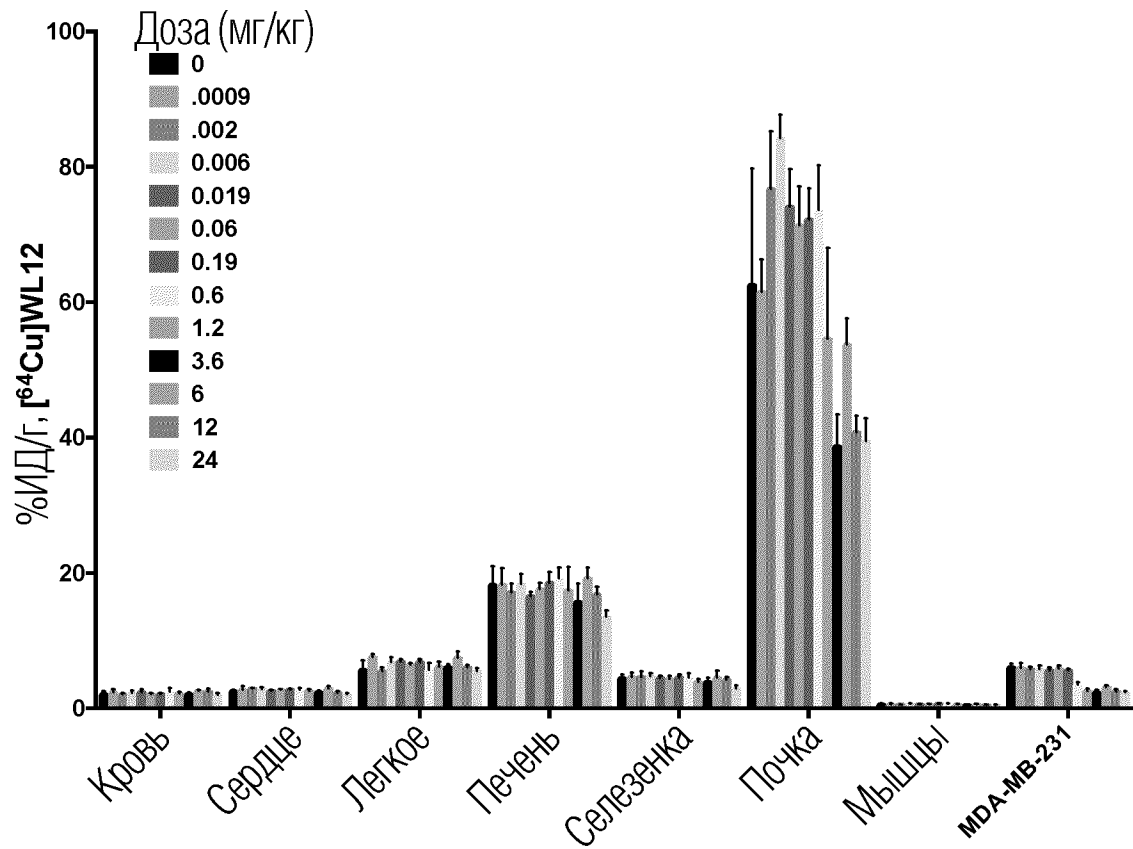
57/60



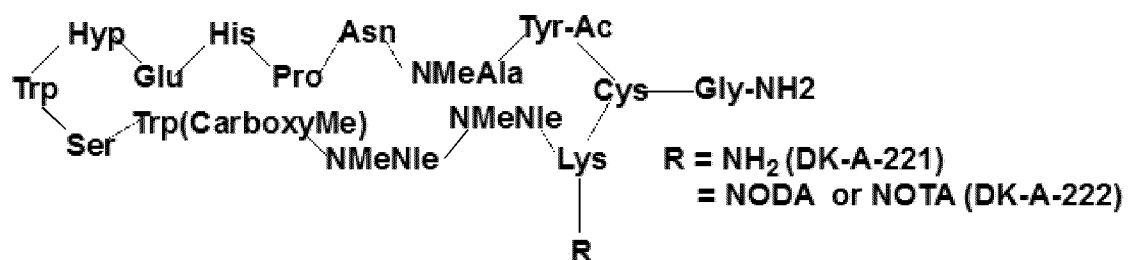
ФИГ. 40



ФИГ. 41



ФИГ. 42



DK-A-221=Цикло-(-Ас-Тир-NMeАла-Асн-Про-Нис-Глу-Нур-Трп-Сер-Трп(карбоксиметил)-NMeNle-NMeNle-Lys-Cys-)-Gly-NH₂

ФИГ. 43