

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202091420 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.09.10

(51) Int. Cl. A61K 51/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.12.17

(54) РАДИОАКТИВНОЕ МЕЧЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДОВ

(31) 62/599,830

(72) Изобретатель:

(32) 2017.12.18

Дудкин Вадим, Голдберг Шалом,

(33) US

Эрхардт Джозеф, Салгер Рис,

(86) PCT/US2018/065913

Макдевитт Тереза М. (US)

(87) WO 2019/125982 2019.06.27

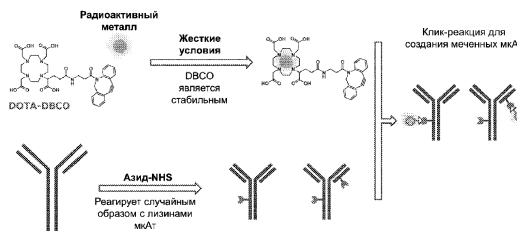
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(57) Описаны улучшенные способы радиоактивного мечения антител с применением клик-химии. Также описаны фармацевтические композиции и применения, связанные с радиоактивно мечеными антителами, полученными данными способами.



202091420

A1

A1

202091420

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563247EA/060

### РАДИОАКТИВНОЕ МЕЧЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДОВ

#### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла «Sequence\_Listing», созданный 7 декабря 2018 г. и имеющий размер 13,2 кб. Перечень последовательностей, представленный с помощью EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка в соответствии со статьей 35 Свода законов США §119(e) испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/599,830, поданной 18 декабря 2017 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способам радиоактивного мечения полипептидов, таких как антитела. В частности, изобретение относится к способам применения клик-химии для мечения полипептида ионом радиоактивного металла. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям и применениям радиоактивно меченных полипептидов.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Радионуклиды, испускающие альфа-частицы, имеют большие перспективы для лечения злокачественного новообразования благодаря комбинации в них высокой энергии с действием на короткие расстояния, что обеспечивает возможность значительного уничтожения, которое в основном локализуется в опухолевых клетках (Kim, Y.S. and M.W. Brechbiel, An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biol*, 2012. 33(3): p. 573-90). Целевая доставка альфа-излучателей с использованием антитела, каркасного белка, низкомолекулярного лиганда, аптамера или другого связывающего фрагмента, специфического к раковому антигену, обеспечивает способ селективной доставки радионуклида в опухоли для повышения их эффективности и ослабления побочных эффектов. В общепринятой практике связывающий фрагмент присоединен к хелатору, который связывается с альфа-излучающим радиоактивным металлом с образованием радиоактивного комплекса. Во многих таких примерах используют моноклональное антитело (мкАт) в качестве нацеливающего лиганда для получения того, что известно как радиоактивный иммуноконъюгат.

Актиний-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ) представляет собой альфа-излучающий радиоизотоп, который представляет особый интерес для применения в медицинских целях (Miederer et al., Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. 60(12):71-82). 10-суточный период полураспада  $^{225}\text{Ac}$  достаточно велик, чтобы облегчить получение радиоактивного

конъюгата, но достаточно короток, чтобы соответствовать фармакокинетике циркуляции средств доставки, таких как антитела. Поэтому радиоактивные иммуноконъюгаты  $^{225}\text{Ac}$  представляют особый интерес. Кроме того,  $^{225}\text{Ac}$  распадается в течение ряда стадий так, что он в конечном итоге испускают 4 альфа-частицы, прежде чем достичь стабильного изотопа  $^{209}\text{Bi}$ , тем самым увеличивая эффективность. Другой радиоизотоп, представляющий интерес для применения в медицинских целях, представляет собой лютеций-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), который испускает как гамма-излучение, подходящее для визуализации, так и бета-излучение средней энергии, подходящее для лучевой терапии. Было показано, что  $^{177}\text{Lu}$ -меченные пептиды демонстрируют уменьшенное повреждение нормальной ткани, и что  $^{177}\text{Lu}$ -мечение позволяет использовать один радиоактивно меченный агент как для терапии, так и для визуализации (Kwekkeboom DJ, et al. [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTAOTyr3]octreotate: comparison with [ $^{111}\text{In}$ -DTPA]octreotide in patients. *Eur J Nucl Med.* 2001;28: p. 1319-1325). Другие радиоизотопы, которые используются для применения в терапевтических целях, включают, например, бета- или альфа-излучатели, такие как, например, торий, радий,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{255}\text{Fm}$  и  $^{227}\text{Th}$ . Другие радиоизотопы, которые используются для визуализации, включают гамма-излучающие радиоизотопы, такие как, например,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , и  $^{111}\text{In}$ .

В предшествующих программах клинических и доклинических исследований, как правило, использовали 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA) для хелатирования актиния. Однако известно, что хелатирование актиния с использованием DOTA может представлять собой сложную задачу (Deal, K.A., et al., Improved in vivo stability of actinium-225 macrocyclic complexes. *J Med Chem*, 1999. 42(15): p. 2988-92), и для каждого антитела часто требуются жесткие условия или высокие уровни DOTA. В результате были использованы два разных подхода известные как «1-стадийный» и «2-стадийный» способы радиоактивного мечения, каждый из которых имеет свои недостатки.

Первым был разработан «2-стадийный» способ, который включает 2 химические стадии с участием актиния, (McDevitt, M.R., et al., Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science*, 2001. 294(5546): p. 1537-40).  $^{225}\text{Ac}$  хелатировали с помощью бифункционального хелатора (BFC) DOTA-изотиоцианата (DOTA-SCN) с высоким радиохимическим выходом (~95%) при pH 4,5-5, используя 2 М ацетатный буфер при 55-60 °C в течение 30 мин. Затем  $^{225}\text{Ac}$ -DOTA-SCN приводили в контакт с нацеливающим антителом с образованием радиоактивного иммуноконъюгата. Основным недостатком 2-стадийного способа является то, что ~90% SCN не выдерживает условий мечения, поэтому ~90% введенного  $^{225}\text{Ac}$  конъюгируется с неактивными формами DOTA, которые не могут быть конъюгированы с антителом. Это приводит не только к низкому выходу (как правило, всего около 10%) и более высоким затратам, но и к снижению удельной активности, что может ограничить эффективность конечного

конъюгата.

Совсем недавно для актиния был разработан «1-стадийный» способ (Maguire, W.F., et al., Efficient 1-step radiolabeling of monoclonal antibodies to high specific activity with  $^{225}\text{Ac}$  for alpha-particle radioimmunotherapy of cancer. *J Nucl Med*, 2014. 55(9): p. 1492-8). Этот способ имеет только 1 стадию химической реакции с участием актиния. Сначала DOTA-SCN конъюгировали с антителом. Затем  $^{225}\text{Ac}$  хелатировали с DOTA-мкАт в мягких условиях ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,5), достигая до 80% радиохимического выхода. Однако для достижения высоких выходов необходимо было конъюгировать высокие уровни DOTA (~10 или более на антитело). При высоком соотношении хелатор: антитело (CAR), в данном случае высоком соотношении DOTA: Ат (DAR), виды более склонны к нарушению иммунореактивности; более того, хотя среднее DAR может составлять 10, вполне вероятно, что  $^{225}\text{Ac}$  хелатируется в популяции с соотношениями, даже превышающими среднее значение. Таким образом, этот способ позволяет снизить риск связывания  $^{225}\text{Ac}$  с наименее активной фракцией антитело-хелатор. Кроме того, необходимо обрабатывать антитело и конъюгат DOTA-мкАт в условиях отсутствия металлов, чтобы избежать хелатирования обычных металлов, таких как железо, цинк и медь, что создает значительные проблемы в процессе производства.

Клик-химия представляет собой химический подход, введенный Шарплессом в 2001 году, который описывает химические реакции, специально приспособленные для быстрого и надежного получения веществ путем соединения малых единиц. См., например, Kolb, Finn and Sharpless *Angewandte Chemie International Edition* (2001) 40: 2004-2021; Evans, *Australian Journal of Chemistry* (2007) 60: 384-395). Реакции сочетания (некоторые из которых могут быть классифицированы как «клик-реакции») включают, но не ограничиваются ими, образование сложных эфиров, тиоэфиров, амидов (например, таких как пептидное сочетание) из активированных кислот или ацилгалогенидов; реакции нуклеофильного замещения (например, такие как нуклеофильное замещение галогенида или раскрытие кольца систем с напряженными кольцами); азид-алкиновое циклоприсоединение по Хьюсгену (например, 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом и алкином с образованием 1,2,3-триазольного линкера); тиол-еновое присоединение; образование имина; реакции Дильса-Альдера между тетразинами и транс-циклооктеном (ТСО); и присоединения по Михаэлю (например, присоединение малеимида).

Клик-реакции между алкинами и азидами обычно требуют добавления медного катализатора для ускорения реакции 1,3-циклоприсоединения и известны как катализируемые медью реакции азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC). Однако клик-реакции между циклооктином или производными циклооктина и азидами обычно не требуют добавления медного катализатора, а вместо этого протекают посредством промотируемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC) (Debets, M.F., et al., *Bioconjugation with strained alkenes and alkynes*. *Acc Chem Res*, 2011. 44(9): p. 805-15).

Сайт-специфичность стала наиболее важным направлением в разработке конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) (Agarwal, P. and C.R. Bertozzi, Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. *Bioconjug Chem*, 2015. 26(2): p. 176-92), поскольку было продемонстрировано, что как эффективность, так и безопасность ADC могут быть повышены с помощью способов сайт-специфической конъюгации по сравнению со случайной конъюгацией. Считается, что для радиоактивных иммуноконъюгатов могут быть достигнуты аналогичные преимущества в отношении безопасности и эффективности.

Как указано выше, в настоящее время остается потребность в эффективных способах получения стабильных радиоактивных иммуноконъюгатов с высокой удельной активностью и высоким выходом.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая способы применения клик-реакций к радиоактивно меченым полипептидам, таким как антитела. В способе согласно изобретению азид-модифицированное антитело и радиоактивный комплекс, содержащий ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, содержащим алкиновую группу, применяют в клик-химии для получения стабильных радиоактивных иммуноконъюгатов, имеющих низкое соотношение хелатор: антитело (CAR), и высокие радиохимические выходы, при этом необходимо сниженное использование радиоактивного металла, а условия отсутствия металлов требуются только на стадии получения исходного радиоактивного комплекса. Способы согласно изобретению упрощают предыдущие способы получения радиоактивных иммуноконъюгатов с повышением безопасности, эффективности и однородности.

В одном общем аспекте изобретение относится к способу мечения полипептида ионом радиоактивного металла, включающему:

- a. обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции;
- b. обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции; и
- c. приведение в контакт модифицированного полипептида с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции реагировать со вторым партнером по клик-реакции, чтобы таким образом пометить полипептид ионом радиоактивного металла.

В другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей радиоактивно меченный полипептид, полученный при помощи способа согласно изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения неопластического заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом,

включающему введение субъекту фармацевтической композиции согласно изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к комбинации или набору, содержащему:

а. модифицированный полипептид, содержащий полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции; и

б. радиоактивный комплекс, содержащий ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

причем комбинация или набор должны применяться для мечения полипептида ионом радиоактивного металла.

В других общих аспектах изобретение относится к терапевтическому или диагностическому агенту («тераностическому агенту»), содержащему радиоактивно меченный полипептид, полученный при помощи способа согласно изобретению.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Предшествующее краткое описание сущности изобретения, а также последующее подробное описание сущности изобретения, будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми графическими материалами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, приведенными в графических материалах.

В графических материалах показано следующее:

На Фиг. 1 представлена схема радиоактивного мечения антитела в соответствии со способом данного изобретения; на фигуре показана случайная конъюгация, причем когда азиды сайт-специфически конъюгированы с моноклональным антителом (мкАт) используется аналогичная схема радиоактивного мечения;

на Фиг. 2 показана схема синтеза для улучшенного двухстадийного получения  $^{89}\text{Zr}$ -DOTA-мкАт при помощи клик-реакций в соответствии с вариантом осуществления заявки;

на Фиг. 3 показано клеточное связывание радиоиммуноконъюгатов In-111: связанная радиоактивность увеличивается с увеличением количества клеток; в частности:

на Фиг. 3А показано связывание с линией клеток рака предстательной железы C4-2B (PSMA+, рецептор трансферрина +) с помощью радиоактивного иммуноконъюгата PSMA-связывающего антитела («PSMB127») с In-111, и радиоактивного конъюгата человеческого трансферрина с In-111 в соответствии с вариантами осуществления заявки; и

На Фиг. 3В показано связывание с линией клеток эпидермоидной карциномы человека A431 (EGFR+) с помощью радиоактивных иммуноконъюгатов EGFR-связывающих антител цетуксимаба и панитумумаба с In-111 в соответствии с вариантами осуществления заявки, и отсутствие связывания этих конъюгатов с контрольной (EGFR-) линией клеток ОМЛ человека MOLM-13;

На Фиг. 4 показана кинетика клеточной интернализации In-111 в линии клеток рака

предстательной железы C4-2B, обработанной радиоактивным иммуноконъюгатом анти-PSMA мкАт с In-111 в соответствии с вариантом осуществления заявки; связанный с поверхностью In-111 быстро исчезал с поверхности клетки и перераспределялся внутриклеточно; и

На Фиг. 5 показаны результаты исследования ксенотрансплантации опухоли у мышей; мышам имплантировали клетки LNCaP рака предстательной железы человека; когда опухоли достигали 100 мм<sup>3</sup>, мышей лечили однократной дозой радиоактивно меченного при помощи клик-реакции радиоактивного конъюгата анти-PSMA мкАт («PSMB127») с актинием в соответствии с одним из вариантов применения в диапазоне активностей или изотипическим контролем, человеческим антителом IgG4, которое связывается с вирусной мишенью, отсутствующей в этой системе радиоактивного конъюгата; в частности:

На Фиг. 5A показан объем опухоли для каждой группы; размеры измеряли до тех пор, пока не оставалось меньше половины группы;

На Фиг. 5B показаны кривые выживаемости для групп контрольного мкАт; и

На Фиг. 5C показаны кривые выживаемости для групп анти-PSMA мкАт.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

Все технические и научные термины в данном документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в данном документе имеют значения, установленные в данном описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в данном документе, включены в него посредством ссылки, как если бы они полностью излагались в данном документе.

Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

На протяжении всего данного описания и последующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово «содержать» и его вариации, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как означающие включение упомянутого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При применении в

настоящем документе термин «содержащий» может быть заменен термином «включающий в себя» или иногда при применении в настоящем документе может быть заменен термином «имеющий».

При применении в настоящем документе термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не упомянутый в элементе формулы изобретения. При применении в настоящем документе термин «состоящий по существу из» не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любые из вышеупомянутых терминов «содержащий», «содержащий в себе», «включающий» и «имеющий» при применении в настоящем документе в контексте аспекта или варианта осуществления описания могут быть заменены термином «состоящий из» или «состоящий по существу из» для варьирования объемов описания.

В контексте данного документа соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий, как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте данного документа. Также подразумевается, что одновременное применение более чем одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

В попытке помочь читателю заявки описание было разделено на различные абзацы или разделы или направлено на различные варианты осуществления заявки. Эти разделения не следует рассматривать как разъединение сущности абзаца, или раздела, или вариантов осуществления от сущности другого абзаца, или раздела, или вариантов осуществления. Напротив, специалисту в данной области техники будет понятно, что описание имеет широкое применение и охватывает все комбинации различных разделов, абзацев и предложений, которые могут быть рассмотрены. Обсуждение любого варианта осуществления предназначено только для примера и не предполагает, что объем описания, включая формулу изобретения, ограничен этими примерами.

#### ***Радиоактивное мечение полипептидов при помощи клик-реакции***

В отличие от известных процедур, способы согласно данному изобретению обеспечивают улучшенный способ получения радиоактивных иммуноконъюгатов, которые подходят, например, для применения в медицинских целях у субъектов, например, людей, нуждающихся в этом. В частности, способы, описанные в данном документе, устраняют основные ограничения существующих способов, обеспечивая процессы как в отношении хелатирования ионов металлов с высоким выходом, включая, но не ограничиваясь ими,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{89}\text{Zr}$ , так и в отношении низкого DAR. Изобретение



позволяет получать единственную партию меченных азидом полипептидов, таких как конъюгат азид-мкАт, которые затем могут быть использованы для получения радиоактивно меченного средства для диагностических (например, когда мечен  $^{89}\text{Zr}$  или  $^{111}\text{In}$ ) или терапевтических (например, когда мечен  $^{225}\text{Ac}$ ) целей, в которых радиоактивная метка присоединена на одном и том же сайте(ах) в пределах партии меченных азидом полипептидов, которые могут быть получены или при помощи сайт-специфической модификации, или при помощи случайной азидной конъюгации. Например, при случайной азидной конъюгации образцы партии меченных азидом полипептидов, содержащих одно распределение модифицированных азидом сайтов, могут быть помечены радиоактивным изотопом для различных целей с применением клик-реакций согласно изобретению.

Способ согласно изобретению, который основан на клик-реакциях и называется «радиоактивным мечением при помощи клик-реакции», включает (1) получение модифицированного полипептида, такого как антитело, которое содержит партнера по клик-реакции, например, азидный фрагмент; (2) получение радиоактивного комплекса, содержащего ион радиоактивного металла, например,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции, например, алкиновой группой, такой как DOTA-добензоциклооктин (DOTA-DBCO) или дефероксамин-DBCO (DFO-DBCO); и (3) проведение реакции между партнерами по клик-реакции, модифицированным пептидом и радиоактивным комплексом, такой как промотируемое напряжением азид-алкиновое циклоприсоединение (SPAAC) между азидным фрагментом и алкиновой группой.

Способ согласно изобретению позволяет хелатировать радиоактивный металл в условиях низкого или высокого pH и/или высокой температуры для достижения максимальной эффективности, что может быть достигнуто без риска инактивации алкинового партнера по реакции. Эффективное хелатирование и эффективная реакция SPAAC между азидо-мкАт и радиоактивным комплексом позволяет получать радиоиммуноконъюгаты с высоким радиохимическим выходом даже при низких соотношениях азид: мкАт. В способе согласно изобретению единственной стадией, в которой следовые металлы должны быть исключены, является хелатирование ионов радиоактивного металла в хелатирующий фрагмент; стадии производства, очистки и конъюгации антител не должны проводиться в условиях отсутствия металлов.

В контексте данного документа «клик-химия» относится к химическому понятию, введенному Шарплессом, которое описывает химические реакции, специально приспособленные для быстрого и надежного образования ковалентных связей путем соединения малых единиц, включающих реакционноспособные группы (см. Kolb, et al., *выше*). Клик-химия относится не к конкретной реакции, а к концепции, включающей, не ограничиваясь этим, реакции, которые имитируют реакции, обнаруженные в природе. В некоторых вариантах осуществления клик-реакции являются модульными, имеют

широкую область применения, дают высокие продукты реакции, дают безопасные побочные продукты, являются стереоспецифичными, демонстрируют большую термодинамическую движущую силу, которая способствует реакции с одним продуктом реакции, и/или могут проводиться при физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления клик-реакция демонстрирует высокую экономию атомов, может быть проведена в простых реакционных условиях, использует легко доступные исходные материалы и реагенты, не использует токсичных растворителей или использует растворитель, который является мягким или легко удаляемым, таким как вода, и/или обеспечивает простое выделение продукта хроматографическими методами, такими как кристаллизация или дистилляция. В определенных вариантах осуществления клик-реакция представляет собой циклоприсоединение по Хьюсгену или 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом ( $-N_3$ ) и алкином или алкиновым фрагментом с образованием 1,2,4-триазольного линкера.

В общем аспекте изобретение относится к способу мечения полипептида, аптамера или низкомолекулярного лиганда ионом радиоактивного металла, включающему:

- a. обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции;
- b. обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции; и
- c. приведение в контакт модифицированного полипептида с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции реагировать со вторым партнером по клик-реакции, чтобы таким образом пометить полипептид ионом радиоактивного металла.

В контексте данного документа термин «полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, связанных с ними природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями. Термин «полипептид» относится к полипептиду любого размера, структуры или функции. Как правило, полипептид имеет длину не менее трех аминокислот. Полипептид может быть природным, рекомбинантным или синтетическим, или любой их комбинацией. Синтетические полипептиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления полипептид представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело, или его фрагмент, такой как его антигенсвязывающий фрагмент. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления антитело или его фрагмент является специфическим для ракового антигена. В соответствии с другими вариантами осуществления полипептид представляет собой сконструированный домен или каркасный белок.

В контексте данного документа термин «антитело» или «иммуноглобулин» используется в широком значении и относится к молекулам иммуноглобулинов или

антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела включая мышьиные/крысиные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

В общем смысле антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые специфически связываются со специфическим антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела согласно данному изобретению могут быть любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно антитела согласно данному изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа и лямбда. Соответственно, антитела согласно изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела согласно изобретению содержат константные области тяжелой и/или легкой цепи, мышьиных антител или человеческих антител. Каждый из четырех подклассов IgG имеет различные биологические функции, известные как эффекторные функции. Эти эффекторные функции, как правило, опосредованы через взаимодействие с Fc-рецептором (FcγR) или путем связывания C1q и фиксации комплемента. Связывание с FcγR может приводить к антителозависимому клеточно-опосредованному цитолизу, тогда как связывание с факторами комплемента может приводить к комплемент-опосредованному лизису клеток. Антитело, пригодное для изобретения, может не иметь или может иметь минимальную эффекторную функцию, но сохранять свою способность связывать FcRn.

В контексте данного документа термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), молекула одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (одАт), димер scFv (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит структуру полного антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. При использовании в настоящем документе термин «одноцепочечное антитело» относится к стандартному для данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом размером от около 15 до около 20 аминокислот. При использовании в

настоящем документе термин «однодоменное антитело» относится к стандартному для данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

В контексте данного документа термин «каркас» или «каркасный белок» относится к любому белку, который имеет домен, связывающий мишень, и который может связываться с мишенью. Каркас содержит «каркасную область», которая, как правило, является структурной, и «связывающий домен», который вступает в контакт с мишенью и обеспечивает специфическое связывание. Связывающий домен каркаса не обязательно должен определяться одной непрерывной последовательностью каркаса. В некоторых случаях каркас может быть частью более крупного связывающего белка, который сам по себе может быть частью мультимерного связывающего белка, который содержит несколько каркасов. Некоторые связывающие белки могут быть би- или мультиспецифическими в том смысле, что они могут связываться с двумя или более различными эпитопами. Каркас может быть получен из одноцепочечного антитела, или каркас может быть получен не из антитела.

Полипептиды согласно изобретению могут быть ковалентно связаны с первым партнером по клик-реакции с использованием любого способа химической или ферментативной модификации полипептида, известного специалистам в данной области техники с учетом данного описания. В способах случайной модификации полипептидов можно использовать реакционноспособные к амину группы, которые реагируют с первичными аминами, которые присутствуют на N-конце каждой полипептидной цепи и в боковой цепи остатков лизина. Примеры реакционноспособных к амину групп, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, N-гидроксисукцинимид (NHS), замещенный NHS, такой как сульфо-NHS, изотиоцианат и тетра- и пер-фторфениловый эфир. В способах случайной модификации полипептидов можно использовать реакционноспособные к тиолу группы, которые реагируют с тиолами или сульфгидрилами, которые существуют в боковой цепи остатков цистеина. Примеры реакционноспособных к тиолу групп, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, малеимид, галоацетил и фенилоксадиазолсульфон. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления модифицированный полипептид получают путем приведения в контакт боковой цепи, предпочтительно аминокислотной группы боковой цепи лизина, с электрофилом, ковалентно связанным с первым партнером по клик-реакции (например, NHS-азид).

Способ согласно изобретению дополнительно позволяет получать сайт-специфические радиоактивно меченные полипептиды. Способ радиоактивного мечения при помощи клик-реакции согласно изобретению облегчает сайт-специфическое получение радиоактивных иммуноконъюгатов, используя преимущества известных способов для сайт-специфического введения азидных групп в антитела (Li, X., et al. Preparation of well-defined antibody-drug conjugates through glycan remodeling and strain-

promoted azide-alkyne cycloadditions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014. 53(28): p. 7179-82; Xiao, H., et al., Genetic incorporation of multiple unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013. 52(52): p. 14080-3). Способы присоединения молекул к белкам или антителам сайт-специфическим образом известны в данной области техники, и любой способ сайт-специфического мечения антител, известный специалистам в данной области техники, может быть использован в изобретении с учетом данного описания. Примеры способов сайт-специфической модификации антител, подходящих для использования в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, включение сконструированных остатков цистеина (например, TНIOMAB™), использование неприродных аминокислот или гликанов (например, селеноцистеина, p-AcPhe, формилглицин-образующего фермента (FGE, SMARTag™) и т. д.), и ферментативные способы (например, использование гликотрансферазы, эндогликозидазы, трансглутаминазы микроорганизмов или бактерий (MTG или BTG), сортазы А и т. д.). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления модифицированный полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который получают путем подгонки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента при помощи бактериальной эндогликозидазы, специфической для  $\beta$ -1,4-связи между остатками корового GlcNAc в сайте гликозилирования Fc антитела, например, GlycINATOR (Genovis), которая оставляет **внутреннюю часть GlcNAc интактной на Fc, что обеспечивает сайт-специфическое включение азидосахаров в этот сайт.** Подогнанное или его антигенсвязывающий фрагмент могут затем реагировать с меченым азидом сахаром, таким как UDP-N-азидоацетилгалактозамин (UDP-GalNaz) или UDP-6-азидо-6-дезоксигалактозамин (UDP-6-азидо-6-дезоксигалактозамин), в присутствии гликозилтрансферазы, такой как галактозилтрансфераза GalT или GalNAc-трансфераза, чтобы таким образом получить модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления модифицированный полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который получают путем дегликозилирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента амидазой. Полученное в результате дегликозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут затем реагировать с азидоамином, предпочтительно 3-азидопропиламином, 6-азидогексиламином или любым азидо-линкер-амином или любым азидо-алкиламином, таким как азидо-полиэтиленгликоль (ПЭГ)-амин, например, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)тетраэтиленгликоль, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)пентаэтиленгликоль, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоль и т. д. или в присутствии трансглутаминазы микроорганизмов, чтобы таким образом получить модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В контексте данного документа термин «аптамер» относится к одноцепочечному олигонуклеотиду (одноцепочечной молекуле ДНК или РНК), который может специфически связываться со своей мишенью с высокой аффинностью. Аптамер может

быть использован в качестве молекулы, нацеленной на различные органические и неорганические вещества.

В контексте данного документа термин «низкомолекулярный лиганд» относится к низкомолекулярному органическому соединению. В контексте данного документа низкомолекулярные лиганды могут относиться к соединениям, которые имеют размер менее чем около 1000 дальтон, и могут быть синтезированы в лаборатории или найдены в природе.

В контексте данного документа термин «партнер по клик-реакции» или «ручка клик-реакции» относится к реагенту или реакционноспособной группе, которые могут участвовать в клик-реакции. Партнером по клик-реакции может быть фрагмент, который редко встречается в природных биомолекулах и химически инертен по отношению к биомолекулам, но, например, при взаимодействии с реакционноспособной к азиду или реакционноспособной к алкину группой реакция может происходить эффективно в биологически соответствующих условиях, например, в условиях культивирования клеток, таких как отсутствие избыточного тепла или агрессивных реагентов. Как правило, для клик-реакций необходимо по меньшей мере две молекулы, содержащие партнеров по клик-реакции, которые могут взаимодействовать друг с другом. Такие партнеры по клик-реакции, которые реагируют друг с другом, иногда упоминаются в данном документе как пары ручек клик-реакции или пары клик-реакции. В некоторых вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой азид и напряженный алкин, например, циклооктин или любой другой алкин. В других вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой реакционноспособные диены и подходящие тетразиндиенофилы. Например, транс-циклооктен, норборнен или бисциклононен можно соединить с подходящим тетразиндиенофилом в качестве пары клик-реакции. В еще других вариантах осуществления тетразолы могут выступать в качестве скрытых источников нитрилиминов, которые могут соединяться с неактивированными алкенами в присутствии ультрафиолетового света с образованием пары клик-реакции, называемой парой «фотоклик»-реакции. В других вариантах осуществления партнеры клик-реакции представляют собой цистеин и малеимид. Например, цистеин из пептида (например, GGGC) может взаимодействовать с малеимидом, который связан с хелатирующим агентом (например, NOTA). Специалистам в данной области техники известны другие подходящие скобы клик-реакции (см., например, Spicer et al., *Selective chemical protein modification. Nature Communications*. 2014; 5: p. 4740). В других вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой компоненты лигирования по Штаудингеру, такие как фосфин и азид. В других вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой компоненты реакции Дильса-Альдера, такие как диены, такие как тетразин, и алкены, такие как транс-циклооктен (TCO) или норборнен. Иллюстративные партнеры по клик-реакции описаны в US20130266512 и в WO2015073746, соответствующее описание партнеров по клик-реакции в обоих случаях включено в данный документ посредством ссылки. В соответствии с предпочтительными

вариантами осуществления один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкиновую группу, а другой партнер по клик-реакции содержит азид. В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкеновую группу, а другой партнер по клик-реакции содержит диен.

В контексте данного документа термин «алкин», «алкиновая группа» или «алкиновый фрагмент» относится к функциональной группе, содержащей тройную углерод-углеродную связь. Алкиновые фрагменты включают терминальные алкины и циклоалкины, предпочтительно терминальные алкины и циклоалкины, которые реагируют с азидными группами. Терминальный алкин имеет по меньшей мере один атом водорода, связанный с атомом углерода с тройной связью. Циклоалкин представляет собой циклоалкильное кольцо, содержащее одну или более тройных связей. Примеры циклоалкинов включают, но не ограничиваются ими, циклооктин и производные циклооктина, такие как бициклонин (BCN), двухфтористый циклооктин (DIFO), дибензоциклооктин (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинон (BARAC), дибензоазациклооктин (DIBAC), диметоксиазациклооктин (DIMAC), дибензоциклооктин (DBCO), дифторбензоциклооктин (DIFBO), монобензоциклооктин (MOBO) и тетраметокси-DIBO (TMDIBO). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит циклоалкин, предпочтительно DBCO. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления другой партнер по клик-реакции содержит азид, предпочтительно NHS-азид.

В контексте данного документа термин «диен» относится к соединению, имеющему две двойные углерод-углеродные связи, причем эти двойные связи конъюгированы в 1,3-положении. Двойные связи диена могут быть цис или транс. Примеры диенов включают, но не ограничиваются ими, тетразиновую или тетразольную группу.

В контексте данного документа термин «алкен», «алкеновая группа» или «алкеновый фрагмент» относится к молекуле ненасыщенного углеводорода, которая содержит двойную углерод-углеродную связь. В соответствии с конкретными вариантами осуществления алкен может содержать от 2 до 100 атомов углерода. Примеры алкенов включают, но не ограничиваются ими, норборнен и транс-циклооктен (ТСО). В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкеновую группу, предпочтительно норборнен или ТСО. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления другой партнер по клик-реакции содержит диен, предпочтительно тетразиновую или тетразольную группу.

В контексте данного документа термин «ковалентно связанный» означает, что полипептид присоединен к первому партнеру по клик-реакции посредством по меньшей мере одной ковалентной связи, и что хелатин присоединен ко второму партнеру по клик-

реакции посредством по меньшей мере одной ковалентной связи. Связь может быть прямой, то есть без линкера, или не прямой, то есть через линкер.

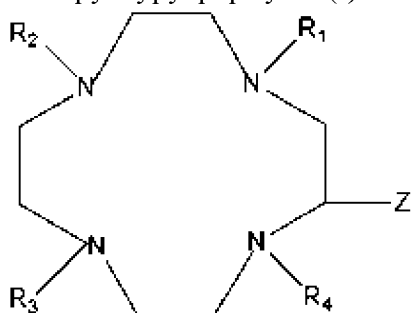
В контексте данного документа термин «линкер» относится к химическому фрагменту, который присоединяет полипептид или хелатирующий агент к партнеру по клик-реакции. В изобретении может быть использован любой подходящий линкер, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Линкеры могут представлять собой, например, одинарную ковалентную связь, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкильный фрагмент, полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер, пептидный линкер, линкер на основе сахара или расщепляемый линкер, такой как дисульфидная связь или сайт расщепления протеазой, такой как валин-цитруллин-РАВ.

В контексте данного документа термин «ион радиоактивного металла» или «ион радиометалла» относится к одному или более изотопам элементов, которые испускают частицы и/или фотоны. В изобретении может быть использован любой радиоактивный металл, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Примеры радиоактивных металлов, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$ , и  $^{255}\text{Fm}$ . В контексте данного документа термин «диагностический излучатель» относится к иону радиоактивного металла, который полезен в применении для диагностики или визуализации. Примеры диагностических излучателей включают, но не ограничиваются этим, гамма-излучатели, такие как  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , и  $^{111}\text{In}$ . В контексте данного документа термин «терапевтический излучатель» относится к иону радиоактивного металла, который полезен в применении для терапевтических целей. Примеры терапевтических излучателей включают, но не ограничиваются ими, бета- или альфа-излучатели, такие как торий, радий,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{255}\text{Fm}$  и  $^{227}\text{Th}$ . В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления ион радиоактивного металла представляет собой  $^{225}\text{Ac}$ . В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления полипептид может быть мечен неметаллическими радиоактивными метками для использования в предварительном нацеливании или для тераностических применений. Примеры неметаллических радиоактивных меток, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими,  $^{125}\text{I}$  и  $^{18}\text{F}$ .

Радиоактивные комплексы, описанные в данном документе, содержат ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом. В соответствии с вариантами осуществления изобретения хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с партнером по клик-реакции, причем иногда он упоминается в данном документе как «бифункциональный хелатор».



В контексте данного документа термин «хелатирующий агент» или «хелатор» относится к химическому соединению, который может хелатировать радиоактивный металл, такой как  $^{225}\text{Ac}$ , или металл посредством координационного связывания. В изобретении может быть использован любой хелатирующий агент, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. В одном варианте осуществления хелатирующий агент содержит макроцикл. Примеры хелатирующих агентов, содержащих макроцикл, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, дефероксамин (ДФО), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) и диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТПА). В другом варианте осуществления хелатирующий агент содержит лиганд с открытой цепью. Примеры хелатирующих агентов, содержащих лиганд с открытой цепью, пригодных для использования в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N, N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (ДОТА), 1,4,7,10,13,16-гексаазациклогексадекан-N, N',N'',N''',N''''-гексауксусную кислоту (НЕНА), 1,4,7,10,13-пентаазациклопентанадекан-N, N',N'',N''', N''''-пентауксусную кислоту (ПЕПА), макропу (Macropa) (Thiele et al., An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017 Nov 13;56(46): p. 14712-14717), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (ТЕТА), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрапропионовую кислоту (ДОТРА), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовую кислоту (ТЕТРА) и 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраметилефосфоновую кислоту (ДОТМР). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления хелатирующий агент содержит структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $C_1$ - $C_4$  алкил или ( $C_1$ - $C_2$  алкил) фенил, и

$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $C_1$ - $C_4$  алкил; и

$Z$  представляет собой  $(\text{CH}_2)_n\text{Y}$ , где

$n$  равен 1-10, и

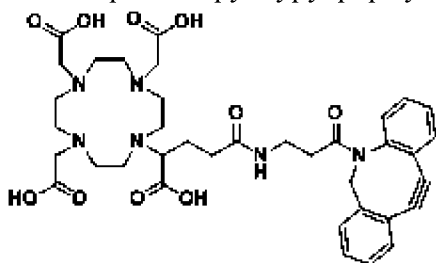
$Y$  представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

альтернативно,  $Z$  представляет собой водород; и

каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{X}$ , где

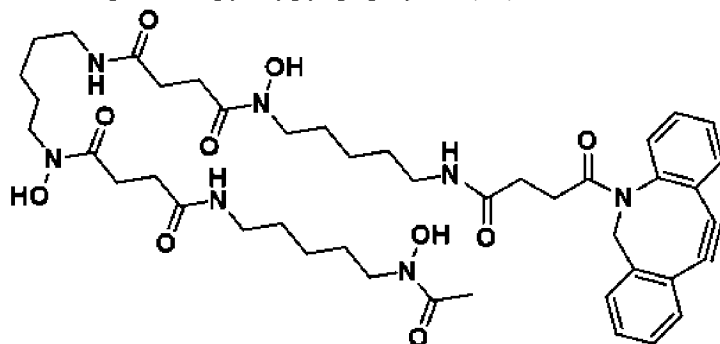
Q независимо представляет собой водород, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> алкил) фенил, и X независимо представляет собой водород, бензил, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (II):



формула (II).

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (III):



формула (III).

В варианте осуществления изобретение относится к способу мечения полипептида ионами двух или более радиоактивных металлов с использованием способа согласно изобретению. Например, способ двойного мечения полипептида ионами двух радиоактивных металлов включает:

a. обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции и вторым партнером по клик-реакции;

b. обеспечение первого радиоактивного комплекса, содержащего ион первого радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с третьим партнером по клик-реакции; и

c. обеспечение второго радиоактивного комплекса, содержащего ион второго радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с четвертым партнером по клик-реакции; и

d. приведение в контакт модифицированного полипептида с первым и вторым

радиоактивными комплексами в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции реагировать с третьим партнером по клик-реакции, а второму партнеру по клик-реакции реагировать с четвертым партнером по клик-реакции, чтобы таким образом пометить полипептид ионами первого и второго радиоактивных металлов.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкиновую группу, а другой из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит азид, и при этом один из третьего и четвертого партнеров по клик-реакции содержит алкеновую группу, а другой из третьего и четвертого партнеров по клик-реакции содержит диен.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления ион первого или второго радиоактивного металла представляет собой диагностический излучатель, а другой представляет собой терапевтический излучатель. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления ионы первого, и второго радиоактивного металла представляют собой терапевтические излучатели.

В данной области техники известны условия проведения клик-реакций, а в изобретении могут быть использованы любые условия для проведения клик-реакций, известные специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Примеры условий включают, но не ограничиваются ими, инкубацию модифицированного полипептида и радиоактивного комплекса в соотношении от 1:1 до 1000:1 при pH от 4 до 10 и температуре от 20 °C до 70 °C.

Продукты способов радиоактивного мечения при помощи клик-реакции в соответствии с изобретением могут быть проанализированы с использованием способов, известных специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Например, анализ методом ЖХ/МС может быть использован для определения соотношения хелатора и меченного полипептида; аналитическую эксклюзионную хроматографию можно использовать для определения олигомерного состояния полипептидов и конъюгатов полипептида; радиохимический выход можно определить с помощью мгновенной тонкослойной хроматографии (например, iTLC-SG), а радиохимическую чистоту можно определить с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Примеры способов описаны в настоящем документе, например в примерах ниже.

#### ***Фармацевтические композиции и способы лечения***

Способ радиоактивного мечения при помощи клик-реакции согласно изобретению может быть модифицирован в подход предварительного нацеливания (Kraeber-Bodere, F., et al., A pretargeting system for tumor PET imaging and radioimmunotherapy. Front Pharmacol, 2015. 6: p. 54). Во-первых, азидо-мкАт вводят, он связывается с целевыми клетками, и ему позволяют со временем быть выведенным из системы кровообращения или удаляют очищающим агентом. Впоследствии радиоактивный комплекс вводят и подвергают реакции SPAAC с азидо-мкАт, связанными в целевом участке, в то время как оставшийся несвязанный радиоактивный комплекс быстро выводится из системы кровообращения (Deal, K.A., et al., Improved in vivo stability of actinium-225 macrocyclic complexes. J Med

Chem, 1999. 42(15): p. 2988-92). Данная методика предварительного нацеливания обеспечивает способ усиления локализации ионов радиоактивных металлов в целевом участке у субъекта

Соответственно, в другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей радиоактивно меченный полипептид, полученный при помощи способа согласно изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель.

В контексте настоящего документа термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с конкретными вариантами осуществления с учетом данного описания в изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела или на основе радиоактивного комплекса.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в данном документе, составлены с обеспечением их приемлемости для предполагаемого способа введения пациенту. Например, композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы они подходили для внутривенного, подкожного, внутримышечного или внутриопухолевого введения.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления модифицированный полипептид и радиоактивный комплекс можно вводить в одной и той же или разных композициях.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения неопластического заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции согласно изобретению.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления способ согласно изобретению включает введение терапевтически эффективной дозы фармацевтической композиции согласно изобретению, причем композиция содержит радиоактивно меченный полипептид для нацеливания на клетки, связанные с неопластическим заболеванием или расстройством, так что при нацеливании альфа-частицы из  $^{225}\text{Ac}$  и его продукты распада доставляются к целевым клеткам и вызывают цитотоксический эффект, тем самым обеспечивая лечение неопластического заболевания или расстройства.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически

эффективные количества модифицированного полипептида и радиоактивного комплекса вводят в разных композициях.

Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству активного ингредиента или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, для определения диапазона оптимальной дозы могут необязательно быть использованы анализы *in vitro*. Подбор конкретной эффективной дозы может выполнить (например, путем клинических исследований) специалист в данной области с учетом нескольких факторов, включая подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы, массу тела пациента, состояние иммунной системы пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также зависит от способа введения и степени тяжести заболевания и должна быть определена на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитывать на кривых дозовой зависимости, полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделей.

В контексте данного документа термины «лечить», «лечащий» и «лечение» предназначены для обозначения улучшения или изменения по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, при котором было бы полезно введение иона радиоактивного металла, таким как неопластическое заболевание или расстройство, которые не обязательно явно выражены у субъекта, но могут быть явно выраженными у субъекта. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, предотвращению развития или проявления, или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, при котором было бы полезно введение иона радиоактивного металла, таким как неопластическое заболевание или расстройство. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у пациента.

Примеры неопластических заболеваний или расстройств включают, но не ограничиваются ими, диссеминированное злокачественное новообразование, солидную злокачественную опухоль, гипертрофию, ишемическую болезнь сердца или сосудистую

окклюзию, заболевание или расстройство, связанное с инфицированной клеткой, микроорганизмом или вирусом, или заболевание или расстройство, связанное с воспалительной клеткой, такое как ревматоидный артрит (РА).

Используемый в данном документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно к млекопитающему. В соответствии с конкретными вариантами осуществления пациент представляет собой млекопитающее, включая млекопитающих, отличных от приматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку, игрунку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В конкретных вариантах осуществления пациент представляет собой человека.

Любая схема применения модифицированного полипептида и радиоактивного комплекса может быть использована с учетом данного описания. Как правило, когда модифицированный полипептид и радиоактивный комплекс вводят в разных композициях, радиоактивный комплекс можно вводить в любое время после введения модифицированного антитела.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, используемые для лечения неопластического заболевания или расстройства, можно использовать в комбинации с другими агентами, которые эффективны для лечения связанных неопластических заболеваний или расстройств.

Используемый в настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения лекарственных средств субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства пациенту или одновременно с таким введением.

В другом общем аспекте изобретение относится к тераностическому агенту, содержащему радиоактивно меченное антитело, полученное при помощи способа согласно изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель, причем иммунологические свойства радиоактивно меченого антитела сохранены.

В контексте данного документа термин «тераностический» относится к способности обеспечивать любую из диагностических и терапевтических функций. В одном варианте осуществления тераностический агент обеспечивает как диагностические, так и терапевтические функции. В другом варианте осуществления тераностический агент представляет собой активный фармацевтический агент без диагностической функции. В

еще одном варианте осуществления тераностический агент представляет собой агент, пригодный для диагностики, но не имеющий терапевтической функции.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления ион радиоактивного металла представляет собой диагностический излучатель, предпочтительно  $^{89}\text{Zr}$ . В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления ион радиоактивного металла представляет собой терапевтический излучатель, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ . В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления тераностический агент используют для обеспечения субъекту, нуждающемуся в этом, как диагностических, так и терапевтических функций.

### ***Комбинации и наборы***

В данном документе предложена комбинация, содержащая:

- a. модифицированный полипептид, содержащий полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции; и
- b. радиоактивный комплекс, содержащий ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

причем комбинация должна применяться для мечения полипептида ионом радиоактивного металла.

В соответствии с конкретными вариантами комбинация согласно изобретению представляет собой реакционную смесь, используемую для мечения полипептида ионом радиоактивного металла. В соответствии с другими вариантами осуществления комбинация представляет собой контейнер или набор, используемый для получения радиоактивно меченного полипептида *in vitro* или *in vivo*. Такие комбинации могут также дополнительно иметь этикетки или инструкции в форме, предписанной государственным учреждением, регулирующим производство, применение или оборот фармацевтических или биологических продуктов, причем упомянутые этикетки отражают разрешение такого учреждения на производство, применение или оборот препарата в целях введения человеку. Комбинации, охватываемые в данном документе, могут быть использованы в вышеупомянутых способах мечения полипептида ионом радиоактивного металла или лечения неопластического заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом.

### **ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

В настоящем изобретении также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой способ мечения полипептида ионом радиоактивного металла, включающий:

- a. обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции;
- b. обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит

хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции; и

с. приведение в контакт модифицированного полипептида с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции реагировать со вторым партнером по клик-реакции, чтобы таким образом пометить полипептид ионом радиоактивного металла.

Вариант осуществления 1a представляет собой способ согласно варианту осуществления 1, в котором хелат содержит макроцикл.

Вариант осуществления 1b представляет собой способ согласно варианту осуществления 1, в котором хелатирующий агент содержит лиганд с открытой цепью.

Вариант осуществления 2 представляет собой способ согласно варианту осуществления 1, в котором один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкиновую группу, а другой партнер по клик-реакции содержит азид.

Вариант осуществления 3 представляет собой способ согласно варианту осуществления 2, в котором первый партнер по клик-реакции содержит азидную группу, а второй партнер по клик-реакции содержит алкиновую группу.

Вариант осуществления 3a представляет собой способ согласно варианту осуществления 2 или 3, в котором алкиновая группа включает терминальный алкин.

Вариант осуществления 3b представляет собой способ согласно варианту осуществления 2 или 3, в котором алкиновая группа включает циклоалкины, предпочтительно циклооктин или производное циклооктина.

Вариант осуществления 3c представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает бициклононин (BCN).

Вариант осуществления 3d представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает двухфтористый циклооктин (DIFO).

Вариант осуществления 3e представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает дибензоциклооктин (DIBO).

Вариант осуществления 3f представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает биарилазациклооктинон (BARAC).

Вариант осуществления 3g представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает дибензоазациклооктин (DIBAC).

Вариант осуществления 3h представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает диметоксиазациклооктин (DIMAC).

Вариант осуществления 3i представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает дибензоциклооктин (DBCO).

Вариант осуществления 3j представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает дифторбензоциклооктин (DIFBO).



Вариант осуществления 3k представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает монобензоциклооктин (МОВО).

Вариант осуществления 3l представляет собой способ согласно варианту осуществления 3b, в котором алкиновая группа включает тетраметокси-DIBO (TMDIBO).

Вариант осуществления 3m представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 2-3l, в котором азидная группа включает NHS-азид.

Вариант осуществления 4 представляет собой способ согласно варианту осуществления 1, в котором один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкеновую группу, а другой партнер по клик-реакции содержит диен.

Вариант осуществления 4a представляет собой способ согласно варианту осуществления 4, в котором диен включает тетразиновую или тетразольную группу.

Вариант осуществления 4b представляет собой способ согласно варианту осуществления 4 или 4a, в котором алкеновая группа включает норборнен.

Вариант осуществления 4c представляет собой способ согласно варианту осуществления 4 или 4a, в котором алкеновая группа содержит транс-циклооктен (ТСО).

Вариант осуществления 5 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-4c, в котором полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 6 представляет собой способ согласно варианту осуществления 5, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 6a представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6, в котором модифицированный полипептид получают путем случайного конъюгирования одной или более азидных групп с полипептидом.

Вариант осуществления 6b представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6, в котором модифицированный полипептид представляет собой модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученный путем сайт-специфического включения первого партнера по клик-реакции.

Вариант осуществления 6c представляет собой способ согласно варианту осуществления 6b, в котором модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают путем подгонки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента при помощи бактериальной эндогликозидазы, специфической для  $\beta$ -1,4-связи между остатками(ом) корового GlcNac в сайте(ах) гликозилирования **Fc антитела для получения подогнанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и приведения в контакт подогнанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с азидосахаром, предпочтительно азидосахарным субстратом UDP-GalNaz, в присутствии гликотрансферазы, предпочтительно галактозилтрансферазы GalT.**

Вариант осуществления 6d представляет собой способ согласно варианту осуществления 6b, где модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают дегликозилированием антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента амидазой для получения дегликозилированного **антитела или** его антигенсвязывающего фрагмента, и приведение в контакт дегликозилированного **антитела** или его антигенсвязывающего фрагмента с азидоамином, предпочтительно 3-азидопропиламином, в присутствии транслугтаминазы микроорганизмов.

Вариант осуществления 6e представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 6-6d, где антитело представляет собой антитело, которое связывается с простатическим специфическим мембранным антигеном человека (PSMA) или его антигенсвязывающим фрагментом, предпочтительно антитело содержит последовательность CDR1 HC SEQ ID NO: 3, последовательность CDR2 HC SEQ ID NO: 4, последовательность CDR3 HC SEQ ID NO: 5, последовательность CDR1 легкой цепи (LC) SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2 LC SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 LC SEQ ID NO: 8.

Вариант осуществления 6f представляет собой способ согласно варианту осуществления 6e, в котором антитело содержит последовательность HC SEQ ID NO: 9 и последовательность LC SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 7 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6d, в котором ион радиоактивного металла представляет собой  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{255}\text{Fm}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , или  $^{111}\text{In}$ .

Вариант осуществления 7a представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6d, в котором ион радиоактивного металла представляет собой  $^{225}\text{Ac}$ .

Вариант осуществления 7b представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6d, в котором ион радиоактивного металла представляет собой  $^{111}\text{In}$ .

Вариант осуществления 7c представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6d, где в котором ион радиоактивного металла представляет собой  $^{89}\text{Zr}$ .

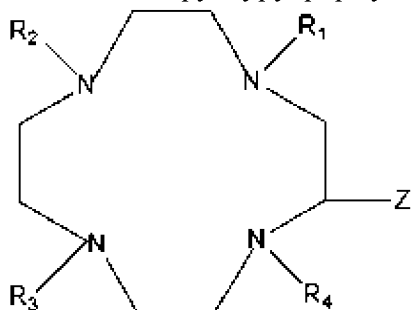
Вариант осуществления 8 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-7c, в котором хелатирующий фрагмент ковалентно связан со вторым партнером по клик-реакции через линкер.

Вариант осуществления 9 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-8, дополнительно включающий приведение в контакт электрофила на боковой цепи, предпочтительно аминокруппы боковой цепи лизина, или введенного в полипептид, с сульфгидрильной группой, ковалентно связанной с первым партнером по клик-реакции для получения модифицированного полипептида, предпочтительно NHS-азидом.

Вариант осуществления 10 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где модифицированный полипептид содержит полипептид,

ковалентно связанный, непосредственно или через линкер, с азидной, тетразиновой или тетразольной группой.

Вариант осуществления 11 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-10, в котором хелатирующий агент содержит макроцикл, предпочтительно структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CHQCO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил или ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$  алкил) фенил, и

$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил; и

$Z$  представляет собой  $(\text{CH}_2)_n\text{Y}$ , где

$n$  равен 1-10, и

$Y$  представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

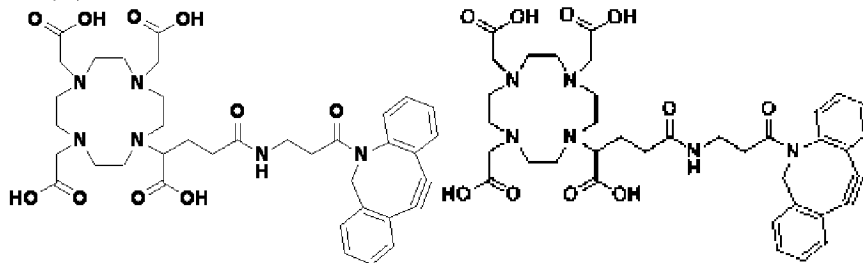
альтернативно,  $Z$  представляет собой водород; и

каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CHQCO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил или ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$  алкил) фенил, и

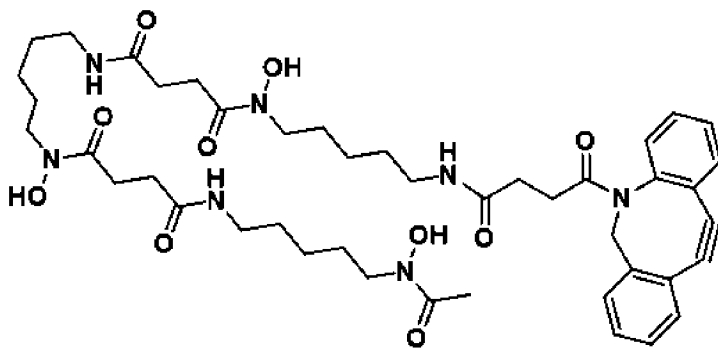
$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции.

Вариант осуществления 12 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-11, в котором хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (II):



формула (II).

Вариант осуществления 12a представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-11, в котором хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, имеющий лиганд с открытой цепью, предпочтительно хелатирующий фрагмент, имеющий структуру формулы (III):



формула (III).

Вариант осуществления 12b представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 1-10, в котором хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, выбранный из группы, состоящей из 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N, N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты (DOTA), дефероксамина (ДФО), 1,4,7,10,13,16-гексаазациклогексадекан-N, N',N'',N''',N''''-гексауксусной кислоты (HEHA), 1,4,7,10,13-пентаазациклопентанадекан-N, N',N'',N''', N''''-пентауксусной кислоты (PEPA), этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА) макропы (Thiele et al., An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017 Nov 13;56(46): p. 14712-14717), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (ТЕТА), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрапропионовой кислоты (ДОТРА), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовой кислоты (ТЕТРА), и 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраметилефосфоновой кислоты (ДОТМР).

Вариант осуществления 12c представляет собой способ согласно варианту осуществления 12b, в котором хелатирующий агент включает 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N, N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (DOTA).

Вариант осуществления 12d представляет собой способ согласно варианту осуществления 12b, в котором хелатирующий агент содержит дефероксамин (ДФО).

Вариант осуществления 13 представляет собой способ мечения полипептида, предпочтительно антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, ионом радиоактивного металла, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , включающий:

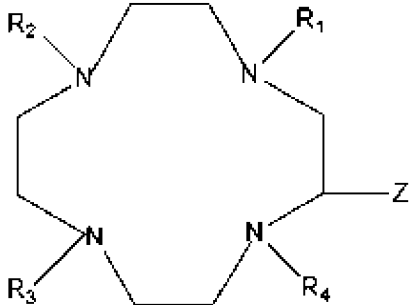
а. обеспечение модифицированного полипептида, предпочтительно модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего полипептид, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной, тетразиновой или тетразольной группой;

б. обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион радиоактивного металла, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , связанный с хелатирующим фрагментом, причем хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с алкиновой или алкеновой группой; и

с. приведение в контакт модифицированного полипептида или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих

азидной, тетразиновой или тетразольной группе реагировать с алкиновой или алкеновой группой, чтобы таким образом пометить полипептид или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ионом радиоактивного металла, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ ,

где хелатирующий агент содержит структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CHQCO}_2\text{X}$ , где  $Q$  независимо представляет собой водород,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил или ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$  алкил) фенил, и  $X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил; и

$Z$  представляет собой  $(\text{CH}_2)_n\text{Y}$ , где

$n$  равен 1-10, и

$Y$  представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный с алкиновой группой;

альтернативно,  $Z$  представляет собой водород; и

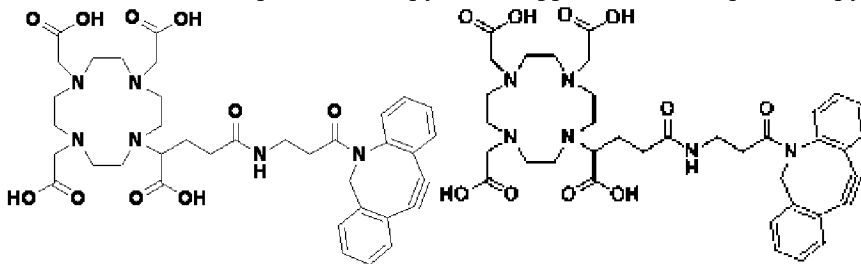
каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CHQCO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил или ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$  алкил) фенил, и

$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный с алкиновой группой.

Вариант осуществления 13a представляет собой способ согласно варианту осуществления 13, в котором хелатирующий агент включает 1,4,7,10-тетраазациклододекан- $N, N', N'', N'''$ -тетрауксусную кислоту (DOTA).

Вариант осуществления 13b представляет собой способ согласно варианту осуществления 13, в котором хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (II):



формула (II).

Вариант осуществления 13d представляет собой способ мечения полипептида, предпочтительно антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, ионом

радиоактивного металла, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , включающий:

а. обеспечение модифицированного полипептида, предпочтительно модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего полипептид, или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной, тетразиновой или тетразольной группой;

б. обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион радиоактивного металла, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , связанный с хелатирующим фрагментом, причем хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с алкиновой или алкеновой группой; и

с. приведение в контакт модифицированного полипептида или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих азидной, тетразиновой или тетразольной группе реагировать с алкиновой или алкеновой группой, чтобы таким образом пометить полипептид или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ионом радиоактивного металла, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ ,

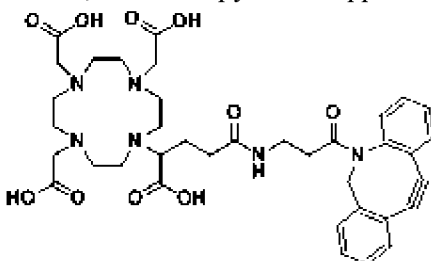
где хелатирующий агент содержит лиганд с открытой цепью, предпочтительно дефероксамин (ДФО).

Вариант осуществления 14 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 13-13с, в котором хелатирующий агент ковалентно связан с алкиновой или алкеновой группой через линкер.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 13-14, дополнительно включающий приведение в контакт электрофила на боковой цепи, предпочтительно аминогруппы боковой цепи лизина, или введенный в полипептид, предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, с сульфгидрильной группой, ковалентно связанной с азидом, предпочтительно NHS-азидом, чтобы получить модифицированный полипептид или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

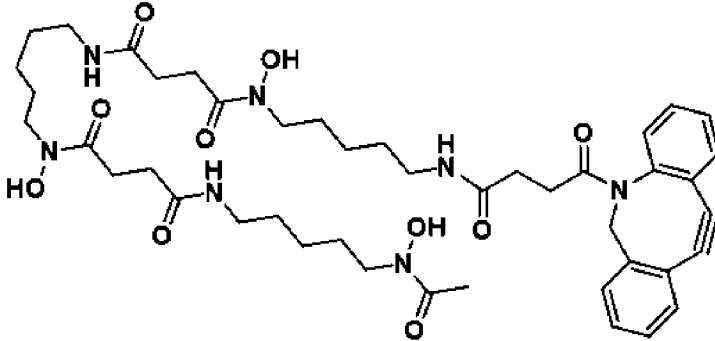
Вариант осуществления 16 представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 13-15, в котором полипептид, предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связан с азидом через линкер.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ согласно варианту осуществления 13, в котором полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ион радиоактивного металла представляет собой  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , и хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (II):



формула (II).

Вариант осуществления 17a представляет собой способ согласно варианту осуществления 13с, в котором полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ион радиоактивного металла представляет собой  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , и хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (III):



формула (III).

Вариант осуществления 17b представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 13-17a, где полипептид представляет собой антитело, которое связывается с простатическим специфическим мембранным антигеном человека (PSMA) или его антигенсвязывающим фрагментом, предпочтительно антитело содержит последовательность CDR1 HC SEQ ID NO: 3, последовательность CDR2 HC SEQ ID NO: 4, последовательность CDR3 HC SEQ ID NO: 5, последовательность CDR1 легкой цепи (LC) SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2 LC SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 LC SEQ ID NO: 8.

Вариант осуществления 17с представляет собой способ согласно варианту осуществления 17b, в котором антитело содержит последовательность HC SEQ ID NO: 9 и последовательность LC SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ двойного мечения полипептида ионами двух радиоактивных металлов, включающий:

- a. обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции и вторым партнером по клик-реакции;
- b. обеспечение первого радиоактивного комплекса, содержащего ион первого радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с третьим партнером по клик-реакции; и
- c. обеспечение второго радиоактивного комплекса, содержащего ион второго радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с четвертым партнером по клик-реакции; и
- d. приведение в контакт модифицированного полипептида с первым и вторым радиоактивными комплексами в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-

реакции реагировать с третьим партнером по клик-реакции, а второму партнеру по клик-реакции реагировать с четвертым партнером по клик-реакции, чтобы таким образом пометить полипептид ионами первого и второго радиоактивных металлов.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ согласно варианту осуществления 18, в котором один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкиновую группу, а другой из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит азид, и при этом один из третьего и четвертого партнеров по клик-реакции содержит алкеновую группу, а другой из третьего и четвертого партнеров по клик-реакции содержит диен.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ согласно варианту осуществления 18 или 19, в котором ион первого или второго радиоактивного металла представляют собой диагностический излучатель, а другой представляет собой терапевтический излучатель.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ согласно варианту осуществления 18 или 19, в котором ионы как первого, так и второго радиоактивных металлов представляют собой терапевтические излучатели.

Вариант осуществления 21a представляет собой способ согласно варианту осуществления 20 или 21, в котором диагностический излучатель представляет собой  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , или  $^{111}\text{In}$ .

Вариант осуществления 21b представляет собой способ согласно любому из вариантов осуществления 20-21a, в котором терапевтический излучатель представляет собой  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{255}\text{Fm}$  или  $^{227}\text{Th}$ .

Вариант осуществления 22 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую радиоактивно меченный полипептид, полученный способом согласно любому из вариантов осуществления 1-21b, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ лечения или диагностики заболевания или расстройства, в частности неопластического заболевания или расстройства, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 22.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ согласно варианту осуществления 23, в котором фармацевтическая композиция содержит две композиции для последовательного введения, первая из которых содержит модифицированный полипептид, а вторая содержит радиоактивный комплекс или радиоактивные комплексы.

Вариант осуществления 25 представляет собой тераностический агент, содержащий радиоактивно меченное антитело, полученное при помощи способа согласно любому из вариантов осуществления 1-21b, и фармацевтически приемлемый носитель, причем сохранены иммунологические свойства радиоактивно меченного антитела.

Вариант осуществления 26 представляет собой тераностический агент согласно



варианту осуществления 25, где ион радиоактивного металла представляет собой диагностический излучатель, предпочтительно  $^{89}\text{Zr}$ .

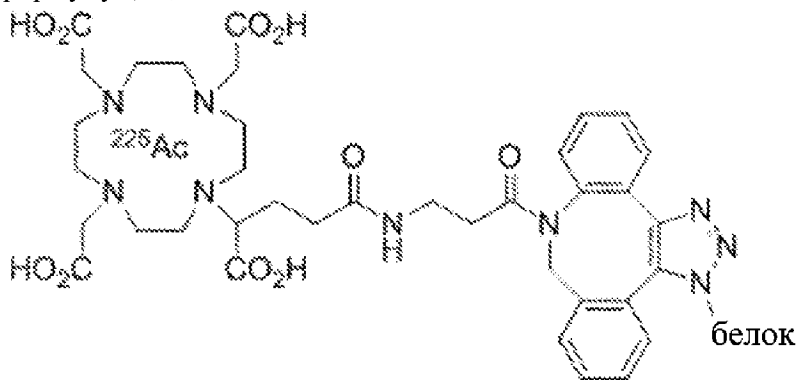
Вариант осуществления 27 представляет собой тераностический агент согласно варианту осуществления 25, где ион радиоактивного металла представляет собой терапевтический излучатель, предпочтительно  $^{225}\text{Ac}$ .

Вариант осуществления 27а представляет собой тераностический агент согласно варианту осуществления 25, где ион радиоактивного металла представляет собой  $^{111}\text{In}$ .

Вариант осуществления 27b представляет собой тераностический агент согласно любому из вариантов осуществления 25-27а, в котором полипептид представляет собой антитело, которое связывается с простатическим специфическим мембранным антигеном человека (PSMA) или его антигенсвязывающим фрагментом, предпочтительно антитело содержит последовательность CDR1 HC SEQ ID NO: 3, последовательность CDR2 HC SEQ ID NO: 4, последовательность CDR3 HC SEQ ID NO: 5, последовательность CDR1 легкой цепи (LC) SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2 LC SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 LC SEQ ID NO: 8.

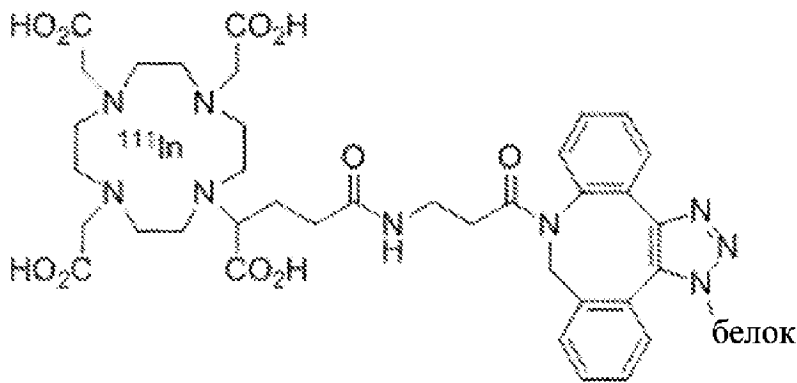
Вариант осуществления 27с представляет собой тераностический агент согласно варианту осуществления 27b, в котором антитело содержит последовательность HC SEQ ID NO: 9 и последовательность LC SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 27d представляет собой тераностический агент согласно любому из вариантов осуществления 25-27с, в котором радиоактивно меченное антитело имеет формулу (IV):



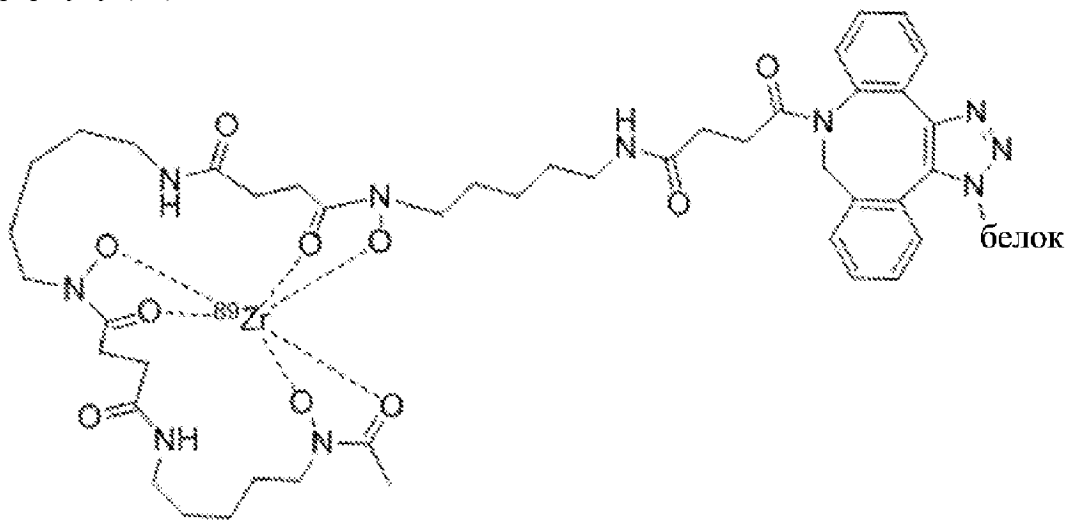
формула (IV) (DOTA-Ас-DBCO-белок), альтернативно,  $^{225}\text{Ac}$  замещен другим ионом радиоактивного металла, таким как  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{255}\text{Fm}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , или  $^{111}\text{In}$ .

Вариант осуществления 27е представляет собой тераностический агент согласно любому из вариантов осуществления 25-27с, в котором радиоактивно меченное антитело имеет формулу (V):



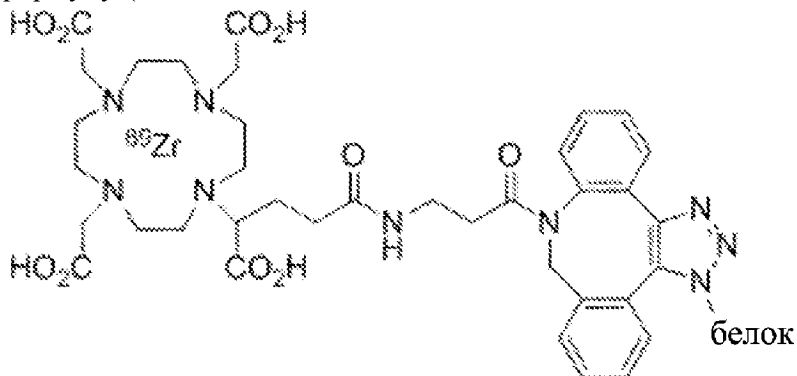
формула (V) (DOTA-In-DBCO-белок).

Вариант осуществления 27f представляет собой тераностический агент согласно любому из вариантов осуществления 25-27с, в котором радиоактивно меченное антитело имеет формулу (VI):



формула (VI) (DFO-Zr-DBCO-белок), альтернативно,  $^{89}\text{Zr}$  замещен другим ионом радиоактивного металла, таким как  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{255}\text{Fm}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ , или  $^{111}\text{In}$ .

Вариант осуществления 27g представляет собой тераностический агент согласно любому из вариантов осуществления 25-27с, в котором радиоактивно меченное антитело имеет формулу (VII):



формула (VII) (DOTA-Zr-DBCO-белок).

Вариант осуществления 27h представляет собой тераностический агент согласно любому из вариантов осуществления 25-27g, в котором радиоактивно меченное антитело имеет соотношение хелатор: антитело (CAR) менее 3.

Вариант осуществления 27i представляет собой тераностический агент согласно любому из вариантов осуществления 25-27h, в котором радиоактивно меченное антитело имеет соотношение хелатор: антитело (CAR), равное 2.

Вариант 28 осуществления представляет собой комбинацию, предпочтительно набор, содержащий:

a. модифицированный полипептид, содержащий полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции; и

b. радиоактивный комплекс, содержащий ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

причем комбинация должна применяться для мечения полипептида ионом радиоактивного металла.

Вариант осуществления 28a представляет собой комбинацию или набор согласно варианту осуществления 28, в котором хелатирующий агент содержит макроцикл.

Вариант осуществления 28b представляет собой комбинацию или набор согласно варианту осуществления 28, в которых хелатирующий агент содержит лиганд с открытой цепью.

Вариант осуществления 29 представляет собой комбинацию или набор согласно варианту осуществления 28, который должен использоваться для мечения полипептида ионом радиоактивного металла посредством реакции между первым и вторым партнерами по клик-реакции *in vitro*.

Вариант осуществления 30 представляет собой комбинацию или набор согласно варианту осуществления 28, который должен использоваться для мечения полипептида ионом радиоактивного металла посредством реакции между первым и вторым партнерами по клик-реакции *in vivo*.

Вариант осуществления 31 представляет собой композицию, содержащую модифицированный полипептид, содержащий полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции.

Вариант 32 осуществления представляет собой композицию, содержащую радиоактивный комплекс, содержащий ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, причем хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции.

Вариант осуществления 32a представляет собой композицию согласно варианту осуществления 32, в котором хелатирующий агент содержит макроцикл.

Вариант осуществления 32b представляет собой композицию согласно варианту осуществления 32, в котором хелатирующий агент содержит лиганд с открытой цепью.

Вариант 33 осуществления представляет собой комбинацию или набор согласно

любому из вариантов осуществления 28-30 или композицию согласно варианту осуществления 31 или 32, причем полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 33а представляет собой комбинацию, или набор, или композицию согласно варианту осуществления 33, причем антитело способно связываться с простатическим специфическим мембранным антигеном человека (PSMA) или его антигенсвязывающим фрагментом, предпочтительно антитело содержит последовательность CDR1 HC SEQ ID NO: 3, последовательность CDR2 HC SEQ ID NO: 4, последовательность CDR3 HC SEQ ID NO: 5, последовательность CDR1 легкой цепи (LC) SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2 LC SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 LC SEQ ID NO: 8.

Вариант осуществления 33b представляет собой комбинацию или набор, или композицию согласно варианту осуществления 33а, причем антитело содержит последовательность HC SEQ ID NO: 9 и последовательность LC SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 33с представляет собой комбинацию или набор, или композицию согласно варианту осуществления 33а или 33b, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с азидной группой.

Вариант осуществления 33d представляет собой комбинацию или набор или композицию согласно варианту осуществления 33с, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с азидной группой случайным образом.

Вариант осуществления 33е представляет собой комбинацию или набор, или композицию согласно варианту осуществления 33с, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сайт-специфически ковалентно связаны с азидной группой.

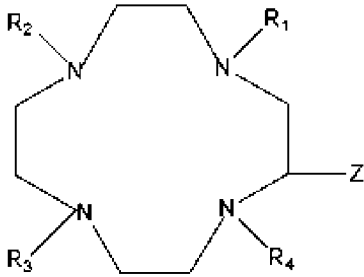
Вариант осуществления 33f представляет собой комбинацию или набор, или композицию согласно варианту осуществления 33е, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с азидной группой при помощи способа, включающего: подгонку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента при помощи бактериальной эндогликозидазы, специфической для  $\beta$ -1,4-связи между остатками(ом) корового GlcNac в **сайте(ах) гликозилирования Fc антитела для получения подогнанного антитела** или его антигенсвязывающего фрагмента, **и приведение в контакт подогнанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с азидосахаром**, предпочтительно азидосахарным субстратом UDP-GalNaz, в присутствии гликотрансферазы, предпочтительно галактозилтрансферазы GalT.

Вариант осуществления 33g представляет собой комбинацию или набор, или композицию согласно варианту осуществления 33е, причем модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают при помощи способа, включающего дегликозилирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента амидазой для **получения дегликозилированного антитела** или его антигенсвязывающего фрагмента,

и **приведение в контакт дегликозилированного антитела** или его антигенсвязывающего фрагмента с азидоамином, предпочтительно 3-азидопропиламином, в присутствии трансглутаминазы микроорганизмов.

Вариант осуществления 34 представляет собой комбинацию, набор, или композицию согласно любому из вариантов осуществления 33-33g, причем ион радиоактивного металла включает  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ .

Вариант осуществления 35 представляет собой комбинацию, набор, или композицию согласно варианту осуществления 34, причем хелатирующий агент содержит макроцикл, предпочтительно структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $C_1$ - $C_4$  алкил или ( $C_1$ - $C_2$  алкил) фенил, и

$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $C_1$ - $C_4$  алкил; и

$Z$  представляет собой  $(\text{CH}_2)_n\text{Y}$ , где

$n$  равен 1-10, и

$Y$  представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный с алкиновой группой;

альтернативно,  $Z$  представляет собой водород; и

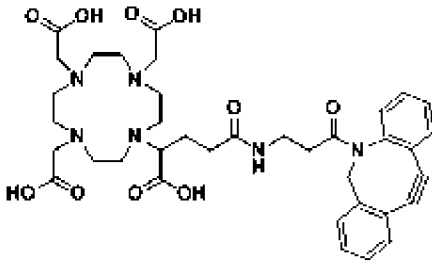
каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $C_1$ - $C_4$  алкил или ( $C_1$ - $C_2$  алкил) фенил, и

$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $C_1$ - $C_4$  алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный с алкиновой группой.

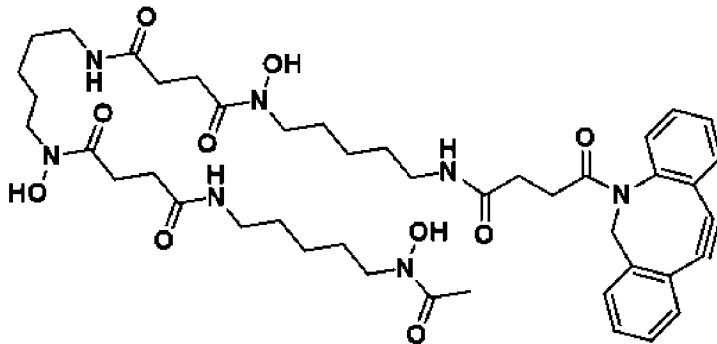
Вариант осуществления 36 представляет собой комбинацию, набор, или композицию согласно варианту осуществления 35, причем электрофильный или нуклеофильный фрагмент ковалентно связан с алкиновой группой через линкер.

Вариант осуществления 37 представляет собой комбинацию, набор или композицию согласно варианту осуществления 35 или 36, причем хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (II):



формула (II)

Вариант осуществления 37а представляет собой комбинацию, набор или композицию согласно варианту осуществления 34, в которых хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, имеющий лиганд с открытой цепью, предпочтительно хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (III):



формула (III).

Вариант осуществления 38 представляет собой комбинацию, набор или композицию согласно любому из вариантов осуществления 34-37, в которых полипептид ковалентно связан с азидом через линкер.

Вариант осуществления 39 представляет собой способ лечения или диагностики заболевания или расстройства, в частности неопластического заболевания или расстройства, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту тераностического агента согласно любому из вариантов осуществления 25-27d или комбинации согласно любому одному из вариантов 28 и 33-38.

Вариант осуществления 40 представляет собой способ лечения или диагностики заболевания или расстройства, в частности неопластического заболевания или расстройства, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту композиции согласно варианту осуществления 31 и композиции согласно варианту осуществления 32, причем полипептид предпочтительно представляет собой антитело.

### **ПРИМЕРЫ**

Для дополнительной иллюстрации характера данного изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие ниже примеры не ограничивают изобретение, и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

#### **Пример 1. Случайная конъюгация азидо/скобы с антителом**

**Моноклональные антитела (мкАт):** Антитело человеческого IgG4, которое

связывается с простатическим специфическим мембранным антигеном человека (PSMA), упоминаемым в данном документе как «анти-PSMA мкАт» с обозначением «PSMB127», имеет последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC) SEQ ID NO: 3, последовательность CDR2 HC SEQ ID NO: 4, последовательность CDR3 HC SEQ ID NO: 5, последовательность CDR1 легкой цепи (LC) SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2 LC SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 LC SEQ ID NO: 8, и имеет последовательность HC SEQ ID NO: 9 и последовательность LC SEQ ID NO: 10. Анти-PSMA мкАт экспрессировали и очищали с использованием стандартных методов хроматографии.

Изотипический контроль антитела человеческого IgG4 S228P/F234A/L235A (IgG4-РАА) для анти-PSMA мкАт, упоминаемый в данном документе как «контрольное мкАт», имеет последовательность HC SEQ ID NO: 1 и последовательность LC SEQ ID NO: 2. Коммерческие антитела трастузумаб (герцептин), цетуксимаб (эрбитукс), пертузумаб (перджета) и панитумумаб (вектибикс) были приобретены у компаний Roche, Lilly, Roche и Amgen, соответственно. Мышиное мкАт против человеческого Her2 было получено от BioXCell (каталожный № BE0277). Трастузумаб, пертузумаб и мкАт против человеческого Her2 связываются с человеческим Her2. Цетуксимаб и панитумумаб связываются с человеческим EGFR.

**Конъюгация:** Исходный раствор антитела (1-10 мг/мл) в 10 мМ ацетате натрия, pH 5,2, фосфатно-солевом буфере, pH 7 или другом совместимом буфере, смешивали с 20% (по объему) 1 М натрий-карбонатного буфера, pH 9 до конечного pH ~9. NHS-ПЭГ4-азид (Thermo, каталожный № 26130) растворяли в ДМСО до конечной концентрации 100 мМ, и добавляли 0,2% (об./об.) исходного вещества для получения молярного избытка ~3-10 относительно мкАт. Реакционную смесь инкубировали при 22°C в течение 10 минут, затем гасили добавлением 1 М трис pH 7,5 до конечной концентрации 50 мМ трис.

**Очистка:** Конъюгат азид-мкАт очищали и заменяли буфер на совместимый буфер (PBS; 20 мМ HEPES 150 мМ, NaCl pH 7,5; или 10 мМ ацетата натрия, pH 5,2), с использованием метода, такого как колонки для обессоливания Zeba с отсечением по молекулярной массе 7 кДа (Thermo), диализ; стандартная аффинная хроматография на основе связывания с белком А; или другой совместимый метод. После очистки конъюгат концентрировали до 10-20 мг/мл с использованием концентраторов Amicon с отсечением по молекулярной массе 50 кДа (Millipore).

**Анализ методом ЖХ/МС:** Соотношение хелатор: антитело (CAR) определяли при помощи анализа методом ЖХ/МС на приборе Agilent G6224 MS-TOF, оборудованном колонкой Agilent PLRP-S (300 ангстрем, 2,1×150 мм; каталожный № PL1912-3301) (таблица 1). Масс-спектр подвергали деконволюции с использованием алгоритма максимальной энтропии в диапазоне m/z 2000-3200 для масс 140-170 кДа.

**Аналитическая эксклюзионная хроматография (ЭХ):** Аналитическую ЭХ проводили для определения олигомерного состояния антител и конъюгатов антител и обеспечения того, чтобы процесс конъюгации не приводил к агрегации. Использовали систему ВЭЖХ Agilent серии 1200 с колонкой Tosoh TSKgel G3000SWxl (Tosoh

Bioscience, № 08541) размером 7,8 x 30 см; подвижная фаза 1X PBS; скорость потока 0,8 мл/мин; объем инъекции 15 мкл; концентрация белка 0,1-2 мг/мл.

**Таблица 1. Эффективность конъюгации**

Антитело	Изотип	CAR
анти-PSMA мкАт	Человеческий IgG4	2,4
контрольное мкАт	Человеческий IgG4	2,0
Трастузумаб	Гуманизированный IgG1	2,5
Цетуксимаб	Химерный человеческий/мышинный IgG1	3,6
Пертузумаб	Гуманизированный IgG1	2,3
Панитумумаб	Человеческий IgG2	3,0
Антитело против человеческого Her2	Мышиный IgG2A	3,1

**Пример 2. Случайная конъюгация азид/скобы с полипептидами, не являющимися антителами**

**Полипептиды, не являющиеся антителами:** Трансферрин, человеческий голотрансферрин, приобретали у компании R&D Systems (каталожный № 2914-НТ) и растворяли в воде до 10 мг/мл. EGF, эпидермальный фактор роста человека (EGF), приобретали у компании Sino Biological (каталожный № 10605-ННАЕ).

**Конъюгация:** Исходный раствор полипептидов (1-10 мг/мл) в 10 мМ ацетате натрия, рН 5,2, фосфатно-солевом буфере, рН 7 или другом совместимом буфере, смешивали с 20% (по объему) 1 М натрий-карбонатного буфера, рН 9 до конечного рН ~9. NHS-ПЭГ4-азид (Thermo, каталожный № 26130) растворяли в ДМСО до конечной концентрации 100 мМ, и добавляли 0,2% (об./об.) исходного вещества для получения молярного избытка ~3-10 относительно белка. Реакционную смесь инкубировали при 22°C в течение 10 минут, затем гасили 1 М трис рН 7,5 до конечной концентрации 50 мМ. Эффективность конъюгации приведена в таблице 2.

**Таблица 2. Эффективность конъюгации**

Белок	Соотношение хелатор: белок
Трансферрин	3,6
EGF	1,1

**Пример 3. Сайт-специфическое включение азидосахаров в гликаны антител**

Гликаны антител подгоняли при помощи GlycINATOR (Genovis), бактериальной эндогликозидазы, специфической для  $\beta$ -1,4-связи между остатками корового GlcNAc в сайте(ах) гликозилирования Fc, оставляя внутреннюю часть GlcNAc интактной на Fc, которая затем может быть использована для сайт-специфического включения азидосахаров. Более конкретно, иммобилизованный GlycINATOR на агарозных гранулах, помещенные в колонку (Genovis), уравнивали в трис-буферном солевом растворе рН



7,4 (TBS). К смоле добавляли 1 мл мкАт в концентрации 5-10 мг/мл и инкубировали на качалке в течение 1 часа при комнатной температуре. мкАт элюировали вращением при 100×g в течение 1 минуты. Колонку элюировали еще 3 раза 0,5 мл TBS. Элюаты, содержащие подогащенное мкАт, объединяли и добавляли буферную добавку (Genovis) вместе с азидосахарным субстратом UDP-GalNaz и ферментом галактозилтрансферазой GalT. Смесь нагревали в течение ночи при 30 °С. Конечный азид-мкАт очищали с использованием колонки mAb Select (GE) на приборе АКТА Avant. Модификация азидом была подтверждена методом ЖХ-МС с определением CAR, равным точно 2.

**Пример 4. Сайт-специфическое включение 3-азидопропиламина с трансклутаминой микроорганизмов (MTG)**

Азидогруппы сайт-специфически вводили в антитело в положениях Gln295, по существу, как описано (Dennler et al. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. *Bioconj Chem* 2014 Mar 19;25(3): p. 569-78). Анти-PSMA мкАт дегликозилировали с помощью Rapid PNGase F (New England Biolabs), амидазы, которая расщепляет между остатками внутренним GlcNAc и аспарагином высокоманнозных, гибридных и сложных олигосахаридов и позволяет полностью дегликозировать и высвободить все N-гликаны, включая N-гликаны из обоих консервативных (например, Asn297 Fc) и неконсервативных (например, N-гликаны Fab) сайтов гликозилирования. 10 мл антитела в концентрации 1 мг/мл в натрий-ацетатном буфере с pH 5,2 инкубировали с 5 мкл PNGase F в течение ночи при 37 °С, а дегликозилирование подтверждали методом ЖХ-МС. PNGase F удаляли при помощи 4 циклов концентрирования и разведения с использованием устройства Amicon (порог отсечения 50 кДа). Для конъюгации 3-азидопропиламина (3-APA; Click Chemistry Tools), дегликозилированное мкАт (0,5-1 мг/мл) доводили до pH 7-7,5 путем добавления 2% (об./об.) 0,5 М HEPES pH 7,5. Добавляли 100 эквивалентов 3-APA вместе с 5-10% мас./об. трансклутамины Activa TI (Ajinomoto), MTG. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 1-4 часов с последующей очисткой модифицированного азидом мкАт на колонке mAbSelect Sure с использованием стандартных хроматографических методов. Конъюгат был охарактеризован с помощью ЖХ-МС, и было установлено, что CAR составляет 2.

**Пример 5. Хелатирование радиоактивного металла бифункциональным хелатором (BFC)**

**Синтез  $^{225}\text{Ac}$ -DOTA-GA-DBCO:**  $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$  приобретали у Окридской национальной лаборатории. 1,4,7,10-тетраазациклододецекан,1-(глутаровая кислота)-4,7,10-триуксусная кислота-(3-аминопропановая кислота)добензоциклооктин (DOTA-GA-DBCO) был синтезирован на заказ. Синтез выполняли согласно Bernhard et al. *Chem. фарм. J.* **2012**, 18, 7834-7841. DBCO-амин (3-амино-1-[(5-аза-3,4:7,8-добензоциклоокт-1-ин)-5-ил]-1-пропанон, Sigma) приводили в контакт с ангидридом DOTA-GA и продукт очищали при помощи ВЭЖХ с обращенной фазой.

Количественную оценку актиния-225 проводили с использованием дозкалибратора

Capintec CRC-55TW, посредством чего  $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$  растворяли в 0,1 н. HCl с получением раствора 10 мКи/мл. В пластиковую пробирку к раствору ацетата тетраметиламмония (1 М раствор, 7,5 мкл, 7,5 мкмоль), DOTA-GA-DBCO (1 мг/мл в воде, 2,5 мкл, 3,4 нмоль) и NaOH (0,1 н., 2,5 мкл, 0,25 мкмоль) добавляли  $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$  (10 мКи/мл в 0,1 н. HCl, 5 мкл, 50 мКи, 0,0038 нмоль). Было установлено, что pH смеси составляет  $\sim 6,5$  по лакмусовой бумаге для определения pH. Пробирку помещали на встряхивающий блок при 80 °C и 290 об/мин на 30 мин, и давали пробирке остыть до комнатной температуры.

**Синтез  $^{111}\text{In}$ -DOTA-GA-DBCO:**  $^{111}\text{InCl}_3$  в 0,05 М HCl приобретали у компании GE Healthcare. В пластиковую пробирку к раствору ацетата тетраметиламмония (1 М раствор, 7,5 мкл, 7,5 мкмоль), DOTA-GA-DBCO (1 мг/мл в воде, 2,5 мкл, 3,4 нмоль) и HCl (0,1 н., 5 мкл) добавляли  $^{111}\text{InCl}_3$  в 0,05 н. HCl (5 мкл, 104,3 мКи, измеренных в дозкалибраторе Capintec CRC-55TW, 0,0022 нмоль). Было установлено, что pH смеси составляет  $\sim 5,5$  по лакмусовой бумаге для определения pH. Пробирку помещали на встряхивающий блок при 60 °C и 290 об/мин на 30 мин, и давали пробирке остыть до комнатной температуры.

**Синтез  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-DBCO:**  $^{89}\text{Zr}$ -оксалат приобретали у компании 3D Imaging. DFO-DBCO приобретали у компании Macrocyclics (г. Плейно, штат Техас, каталожный № В-773), растворяли в ДМСО до 0,5 мг/мл и разбавляли в воде до 25 мкг/мл.

2 мКи Zr-89 переносили в безметалловую микроцентрифужную пробирку и добавляли 1 М щавелевую кислоту для достижения общего объема 80 мкл. Добавляли 12 мкл 2 М карбоната калия с шагом 2 мкл, и смесь перемешивали кончиком пипетки до прекращения образования пузырьков. Затем добавляли 120 мкл 1 М HEPES, а затем 300 мкл воды. pH раствора тестировали, и добавляли еще 2 М карбонат калия для повышения pH до 6-6,5, если это необходимо. Добавляли 136 мкл исходного раствора DFO-DBCO (3,4 мкг), а реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Хелат анализировали путем определения 0,5 мкл реакционной смеси на пластине TLC Green (Biodex) и элюирования 20% NaCl. После элюирования пластину сканировали с помощью фосфоресцирующей системы PerkinElmer Cyclone Plus, чтобы убедиться, что большая часть Zr-89 осталась на исходном уровне, что указывает на хелатирование DFO-DBCO.

**Синтез  $^{89}\text{Zr}$ -DOTA-GA-DBCO:** К сильному анионообменному картриджу Waters Sep-pak Light QMA (сополимер акриловая кислота/акриламид на диоксиде кремния, функциональные группы поверхности:  $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$ , размер пор 300 Å, размер частиц 37-55 мкм, ионообменная емкость 230 мэкв/г), добавляли MeCN (6 мл), а затем солевой раствор с концентрацией 0,9% (10 мл), затем воду (10 мл). Раствор  $^{89}\text{Zr}(\text{ox})_2$  в 1,0 М щавелевой кислоте (2 мкл, 290 мКи) добавляли в предварительно кондиционированный картридж. Картридж, в свою очередь, промывали деионизированной водой (20 мл) для удаления избытка щавелевой кислоты с последующим элюированием  $^{89}\text{ZrCl}_4$  с колонки 1,0 М HCl (водн.) (100 мкл каждый), чтобы получить общий объем 400 мкл с выходом 248 мКи (86%), причем большая часть активности приходится на 3-ю фракцию. Затем объединенные аликвоты выпаривали до

полного высыхания.

10 мкл DOTA-GA-DBCO (1,0 мг/мл в безметалловой воде, 10 мкг, 13,6 нмоль) добавляли к  $^{89}\text{ZrCl}_4$  (268 мкКи, 50 мкл). Раствор DOTA-GA-DBCO/ $^{89}\text{Zr}$  разводили в 150 мкл 1,0 М HEPES. pH смеси доводили до pH 7,5 (Pandya et al., Zirconium tetraazamacrocyclic complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development. Chem Sci. 2017 Mar 1;8(3): p. 2309-2314). Затем раствор инкубировали при 90 °С в течение 60 мин. Выход комплекса  $^{89}\text{Zr}$ -DOTA-GA-DBCO был определен как 98% по колонке SPC25 (Sigma Aldrich, номер по каталогу SPC25120-50G), элюированной 1% раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Нехелатированный  $^{89}\text{Zr}$  остается на колонке, а комплекс  $^{89}\text{Zr}$ -DOTA-GA-DBCO элюируется.

#### **Пример 6. Синтез меченных при помощи клик-реакции радиоактивных конъюгатов анти-PSMA мкАТ**

Смотри на Фиг. 1 и 2 схему радиоактивного мечения антител в соответствии со способами согласно изобретению.

**Синтез анти-PSMA мкАТ-дибензо-[1,2,3]-триазолоазоцин-GA-DOTA-225Ac (сайт-специфический, CAR=2):** Антитело, случайным образом или сайт-специфически модифицированное азидом, (сайт-специфически, CAR=2 или случайным образом, среднее CAR между 1 и 4) в PBS или другом совместимом буфере (10-20 мг/мл) добавляли к раствору  $^{225}\text{Ac}$ -DOTA -GA-DBCO, полученному как описано. Конечный pH смеси составлял ~6,5 по лакмусовой бумаге для определения pH. Реакционный раствор осторожно перемешивали и оставляли при комнатной температуре в течение 3 часов перед очисткой колонкой PD-10 (GE Healthcare), предварительно кондиционированной 15 мл натрий-ацетатного буфера, 10 мМ, pH 6-6,5 или другим совместимым буфером. Реакционную смесь пипеткой переносили в резервуар предварительно кондиционированной колонки PD-10, и элюат собирали в пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали натрий-ацетатным буфером (0,2 мл × 3), промывки пипеткой переносили в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. Натрий-ацетатный буфер непрерывно добавляли в резервуар колонки PD-10, и элюат собирали в пластиковые пробирки, в каждую пробирку собирали ~1 мл элюата, пока не было собрано всего 10 мл элюата.

Чистоту каждой собранной фракции оценивали с помощью iTLC-SG (Agilent) с использованием раствора цитрат- $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH в качестве подвижной фазы. Чистые фракции объединяли, чтобы получить конечный продукт в 10 мМ натрий-ацетатном буфере. Раствор продукта анализировали с помощью ВЭЖХ на химическую и радиохимическую чистоту. Концентрацию антител в растворе продукта определяли по УФ-поглощению с использованием стандартной кривой. Активность раствора продукта, в свою очередь, количественно определяли с использованием дозкалибратора Capintec CRC-55TW.

**Контроль качества хелатирования Ac-225:** Тестирование на хелатирование осуществляли с использованием диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА) в

качестве контроля качества для очищенного продукта. 10 мМ водный раствор Na<sub>5</sub>DTPA добавляли к раствору образца, содержащему мкАт, меченному <sup>225</sup>Ас, до тех пор, пока отношение [DTPA]/[мкАт] не будет равно 500-1000. 50 мМ водный раствор Na<sub>5</sub>DTPA добавляли к аликвоте очищенного продукта в растворе, содержащем мкАт, меченное <sup>225</sup>Ас, до тех пор, пока отношение [DTPA]/[мкАт] не будет равно 50000-100000. Две смеси помещали на встряхивающий блок при комнатной температуре и 290 об/мин на 30 минут. Смесь наносили на iTLC-SG и добавляли раствор цитрат-Н<sub>2</sub>О-МеОН в качестве подвижной фазы. В этих условиях свободный <sup>225</sup>Ас мигрирует на фронт растворителя, а связанный <sup>225</sup>Ас-мкАт остается на базовой линии.

**Синтез анти-PSMA мкАт-добензо-[1,2,3]-триазолоазоцин-GA-DOТА-<sup>111</sup>In:** Анти-PSMA мкАт, случайным образом или сайт-специфически модифицированное азидом, в 10 мМ NaOAc (сайт-специфически, CAR=2 или случайным образом, среднее CAR между 1 и 4) добавляли к раствору <sup>111</sup>In-DOТА-GA-DBCO, полученному как описано. Реакционный раствор осторожно перемешивали и оставляли при комнатной температуре в течение 2 часов, после чего пропускали через колонку PD-10. Колонку PD-10 предварительно кондиционировали путем пропускания через колонку 15 мл натрий-ацетатного буфера, 10 мМ, pH 6-6,5, и промывки отбрасывали. Затем реакционную смесь пипеткой переносили в резервуар предварительно кондиционированной колонки PD-10, и элюат собирали в пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали натрий-ацетатным буфером (0,2 мл × 3), промывки пипеткой переносили в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. Натрий-ацетатный буфер непрерывно добавляли в резервуар колонки PD-10, и элюат собирали в пластиковые пробирки, в каждую пробирку собирали ~1 мл элюата, пока не было собрано всего 10 мл элюата.

Чистоту каждой собранной фракции оценивали с помощью iTLC-SG с использованием 10 мМ водного раствора ЭДТА (pH=5-6) в качестве подвижной фазы. Чистые фракции объединяли, чтобы получить конечный продукт в 10 мМ натрий-ацетатном буфере. Раствор продукта анализировали с помощью ВЭЖХ на химическую и радиохимическую чистоту. Концентрацию антител в растворе продукта определяли по УФ-поглощению с использованием стандартной кривой. Активность раствора продукта, в свою очередь, количественно определяли с использованием дозкалибратора Capintec CRC-55TW.

**Контроль качества хелатирования In-111:** Тестирование на хелатирование осуществляли с использованием DTPA в качестве контроля качества для очищенного продукта. 10 мМ водный раствор Na<sub>5</sub>DTPA добавляли к раствору образца, содержащему мкАт, меченному <sup>111</sup>In, до тех пор, пока [DTPA]/[мкАт] = 1000-10000. Смесь помещали на встряхивающий блок при комнатной температуре и 290 об/мин на 30 минут. Смесь наносили на iTLC-SG и добавляли 10 мМ водного раствора ЭДТА (pH 5-6) в качестве подвижной фазы. Свободный <sup>111</sup>In или слабосвязанный <sup>111</sup>In мигрирует на фронт растворителя, а сильносвязанный <sup>111</sup>In-мкАт остается на базовой линии.

**Синтез анти-PSMA мкАт-добензо-[1,2,3]-триазолоазоцин-DFO-Zr-89**

800 мкг анти-PSMA мкАт, случайным образом модифицированное азидом, (среднее CAR между 1 и 4; ту же процедуру можно проводить с сайт-специфическим азидо-мкАт) в 10 mM HEPES, 50 mM NaCl pH 7,5 или другой совместимый буфер добавляли к раствору  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-DBCO, полученному как описано, и инкубировали при 37°C в течение 1,5 часа до пропускания через колонку PD-10. Колонку PD-10 предварительно кондиционировали путем пропускания 15 мл изотонического солевого раствора через колонку и промывки отбрасывали. Затем реакционную смесь пипеткой переносили в резервуар предварительно кондиционированной колонки PD-10, и элюат собирали в пластиковые пробирки. Солевой раствор непрерывно добавляли в резервуар колонки PD-10, и элюат собирали в пластиковые пробирки, в каждой пробирке собирали 0,5 мл элюата, пока не было собрано всего 10 мл элюата. Активность каждой фракции и материала, оставшегося на колонке, определяли с помощью дозкалибратора. Пик продукта, как правило, фракции 4-7, объединяли, чтобы получить конечный продукт. Раствор продукта анализировали с помощью ВЭЖХ на химическую и радиохимическую чистоту. Концентрацию антител в растворе продукта определяли по УФ-поглощению с использованием стандартной кривой. Активность раствора продукта количественно определяли с использованием дозкалибратора.

#### **Синтез анти-PSMA мкАт-DOТА- $^{89}\text{Zr}$**

Конъюгат модифицированного азидом анти-PSMA мкАт (CAR=1-4), модифицированный случайной азидной конъюгацией, в 20 mM HEPES, 50 mM NaCl pH 7,5 (10,1 мг/мл, 200 мкл, ~13,5 нмоль) добавляли к раствору  $^{89}\text{Zr}$ -DOТА-GA-DBCO, полученному как описано выше. Конечный pH смеси доводили до 7,0. Реакционный раствор инкубировали при 37 °C в течение 2 часов с последующей очисткой на колонке PD-10 (GE Healthcare) или 0,9% солевым раствором, буфером HEPES, или PBS с получением продукта  $^{89}\text{Zr}$ -DOТА-мкАт в 64%.

**Контроль качества хелатирования Zr-89:** В отношении Zr-DFO-мкАт очищенные продукты анализировали только с помощью ВЭЖХ. Эти конъюгаты не сохраняли Zr-89 при тестировании DTPA или ЭДТА. Zr-DOТА-мкАт тестировали добавлением ЭДТА до 33 mM и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Конъюгаты анализировали после тестирования путем прогона через колонку PD-10 и обнаружили, что они сохраняют 80% радиоактивности.

#### **Пример 7. Аналитическая характеристика меченных при помощи клик-реакции радиоактивных конъюгатов**

##### **Определение радиохимической конверсии**

Радиохимическую конверсию (% RA конверсии; см. таблицы 3-5), определяли с помощью iTLC-SG (мгновенной тонкослойной хроматографии (iTLC) с использованием хроматографической бумаги без связующего вещества из стекловолокна, пропитанной силикагелем (SG)). % значения RA конверсии рассчитывают путем деления интегрального значения радиосигнала пика продукта (различного времени удерживания радиоактивного исходного материала и побочных продуктов) на значение, полученное при

интегрировании всех пиков радиосигнала, присутствующих между базовой линией и фронтом растворителя. Затем эту фракцию продукта выражают в процентах конверсии.

Для продуктов с включенным Ac-225 растворы образцов, содержащие ~0,1-1 мкКи  $^{225}\text{Ac}$ , наносили на базовую линию пластины iTLC-SG примерно в 2 см от нижнего края. Пластину для iTLC-SG подготавливали с использованием подвижной фазы цитрат-вода-метанол (20 мл 0,4 М тринатрийцитрата/3 мл 2 н. HCl/2,3 мл MeOH), оставляли для высыхания при комнатной температуре и хранили в течение минимум 6 часов до анализа (до достижения радиоактивного равновесия  $^{225}\text{Ac}$  и всех дочерних нуклидов). iTLC-SG сканировали с использованием сканера для радио-TLC Bioscan AR2000 с настройкой на  $^{99\text{mTc}}$ .

Для хелатов In-111 растворы образцов, содержащие ~0,5-2,5 мкКи  $^{111}\text{In}$ , были нанесены на базовую линию пластины iTLC-SG, примерно в 2 см от нижнего края. Пластину для iTLC-SG подготавливали с использованием 10 мМ натрия ЭДТА, pH 5-6, в качестве подвижной фазы, а затем ей давали высохнуть при комнатной температуре. Высушенную iTLC-SG сканировали с использованием сканера для радио-TLC Bioscan AR2000 с настройкой на In-111.

Для хелатов Zr-89% RA конверсии определяли путем деления активности на пике продукта на общую активность, включая активность в колонке PD-10, определяемую путем измерения с помощью дозкалибратора.

#### **Определение радиохимической чистоты радиоактивно меченных белков**

Радиохимическую чистоту (% RA чистоты; см. таблицы 3-4) хелатов Ac-225 и In-111 определяли при помощи ЭХ-ВЭЖХ (экслюзионной ВЭЖХ). В случае Ac-225 использовали колонку Tosoh TSKgel (G3000SWx1 7,8мм x 30 см, 5 мкм); колонку элюировали буфером DPBS (1x, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; комнатная температура. После ВЭЖХ элюат собирали в предварительно пронумерованные пробирки, причем в каждую пробирку собирали 0,5 мин или 1 мин фракции элюата. Пробирки, содержащие элюат, оставляли при комнатной температуре в течение >6 часов, чтобы позволить  $^{225}\text{Ac}$  достичь радиоактивного равновесия с его дочерними нуклидами. Активность в каждой пробирке затем подсчитывали в лунке счетчика Capintec CRC-55TW. Радиохроматограмма была восстановлена на основе активности в пробирках.

В случае In-111 использовали колонку Tosoh TSKgel (G3000SWx1 7,8мм x 30 см, 5 мкм); колонку элюировали буфером DPBS (1x, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; комнатная температура. Обнаружение радиоактивности осуществляли с использованием вышеуказанной системы ВЭЖХ и проточного радиодетектора Perkin Elmer Radiomatic 625TR и оснащенного проточной кюветой объемом 0,5 мл с использованием настройки на In-111, и коктейлем Ultima FloTM M при скорости потока 1,4 мл/мин.

Для Zr-89 (см. таблицу 5) использовали колонку Tosoh TSKgel (G3000SWx1 7,8 мм x 30 см, 5 мкм). Колонку элюировали цитратно-солевым буфером; скорость потока: 1

мл/мин; время анализа - 20 мин; комнатная температура. Детекцию радиоактивности выполняли с использованием вышеуказанной системы ВЭЖХ и проточного детектора Beckman, соединенного с прибором Bioscan Flow Count.

**Таблица 3. Радиоактивное мечение белков актинием-225**

mAb	Стадия 1*	Стадия 2**					CAR
	% RA конверсии (iTLC)	% RA конверсии (iTLC)	% RA чистоты (ВЭЖХ)	Спец. конц. (мкКи/мл)	Удел. актив. (мкКи/мг)	Общая RA (мкКи)	
анти-PSMA мкАт (азид, случайным образом)	88%	73%	80%	17,2	74,9	17,2	3-4
анти-PSMA мкАт (гликан, сайт-специфически)	88%	77%	83%	7,2	102,8	7,2	2
анти-PSMA мкАт (MTG, сайт-специфически)	93%	70%	90%	31,3	74,2	31,3	2,0
контрольное мкАт (азид, случайным образом)	92%	68%	97%	28,1	56,1	28,1	2
Панитумумаб (азид, случайным образом)	87%	65%	95%	24,9	66,6	24,9	3,0
Цетуксимаб (азид, случайным образом)	91%	67%	98%	33,7	76,4	33,7	3,6
hEGF (азид, случайным образом)	92%	48%	100%	19,63	1091	19,63	1,1

Трансферрин (азид, случайным образом)	94%	57%	78%	24,1	83,7	24,1	3,6
Трастузумаб (азид, случайным образом)	94%	60%	97%	9,88	62,9	9,88	2,5
Пертузумаб (азид, случайным образом)	94%	63%	92%	16,75	49,9	16,75	2,3
Антитело против человеческого HER2 (азид, случайным образом)	85%	78%	94%	21,5	55,0	21,5	3,1

\* Стадия 1 представляет собой хелатирование актиния-225 DOTA-GA-DBCO

\*\* Стадия 2 представляет собой клик-реакцию бифункционального хелата с белком

**Таблица 4. Радиоактивное мечение белков индием-111**

mAb	Стадия 1*		Стадия 2**				CAR
	% RA конверсии (iTLC)	% RA конверсии (iTLC)	% RA чистоты (ВЭЖХ)	Спец. конц. (мкКи/мл)	Удел. актив. (мкКи/мг)	Общая РА (мкКи)	
анти-PSMA мкАт (азид, случайным образом)	81%	79%	98%	57,6	139,5	72	2,4
Трансферрин (азид, случайным образом)	79%	88%	90%	71,4	410,3	71,4	3,6
Панитумумаб (азид, случайным образом)	46%	79%	99%	82,0	279	82,0	3,0
Цетуксимаб (азид,	74%	75%	100%	51,3	290	51,3	3,6



случайным образом)							
--------------------	--	--	--	--	--	--	--

\* Стадия 1 представляет собой хелатирование индия-111 DOTA-GA-DBCO

\*\* Стадия 2 представляет собой клик-реакцию бифункционального хелата с белком

**Таблица 5. Радиоактивное мечение Zr-89 анти-PSMA мкАт с DFO-DBCO**

mAb	% RA конверсии	% RA чистоты (ВЭЖХ)	Спец. конц. (мкКи/мл)	Удел. актив. (мкКи/мг)	Общая RA (мкКи)	CAR
анти-PSMA мкАт (азид, случайным образом)	47%	100%	131	1171	262	2,4

**Пример 8. Клик-реакция модифицированного мкАт с DOTA-GA-DBCO**

Модифицированные случайным образом и сайт-специфически азидо-мкАт (анти-PSMA мкАт, цетуксимаб, панитумумаб, трастузумаб, пертузумаб) в количестве 1-10 мг/мл смешивали с 5х-20х избытком нехелатированного DOTA-GA-DBCO и инкубировали при комнатной температуре или 37 °С в течение 1-24 часов. мкАт обессоливали с помощью спин-колонок Zeba Desalt (Thermo) и концентрировали с помощью центрифужного концентратора Amicon (Millipore), повторно разбавляли буфером и снова концентрировали для удаления любого оставшегося DBCO-DOTA. Завершение клик-реакции всех свободных азидов с DBCO-DOTA было подтверждено методом ЖХ-МС.

**Пример 9. Клик-реакция модифицированного мкАт с DFO-DBCO**

Азидо-мкАт с модифицированными случайным образом и сайт-специфически мкАт в концентрации 1-10 мг/мл смешивали с 5-20-кратным избытком нехелатированного DOTA-GA-DFO и инкубировали при комнатной температуре или 37 °С в течение 1-24 часов. мкАт обессоливали с помощью спин-колонок Zeba Desalt (Thermo) и концентрировали с помощью центрифужного концентратора Amicon (Millipore), повторно разбавляли буфером и снова концентрировали для удаления любого оставшегося DBCO-DFO. Полная клик-реакция всех свободных азидов с DBCO-DFO была подтверждена методом ЖХ-МС.

**Пример 10. Клеточное связывание (FACS)**

Клеточное связывание модифицированных азидом антител, модифицированных DOTA-DBCO-азидом антител и модифицированных DFO-DBCO-азидом антител сравнивали с исходными мкАт для конъюгатов, описанных в таблице 1. Линии клеток, экспрессирующие мишень мкАт, обрабатывали антителом или конъюгатом в диапазоне концентраций, и при помощи проточной цитометрии измеряли связывание. Конъюгаты панитумумаба и цетуксимаба оценивали в отношении связывания с EGFR+ клетками A431. Герцептин и пертузумаб оценивали в отношении связывания с HER2+ клетками SK-BR-3. Анти-PSMA мкАт оценивали в отношении связывания с PSMA+ клетками C4-2b.

**Линии клеток:** Клетки C4-2В, линию клеток аденокарциномы предстательной железы человека, получали от Janssen Oncology (г. Спринг-Хаус, штат Пенсильвания). Клетки A431, **линию клеток эпидермоидной карциномы человека, и клетки SK-BR-3**, линию клеток рака молочной железы человека, получали от Janssen BioTherapeutics (г. Спринг-Хаус, штат Пенсильвания) с клетками, первоначально полученными от ATCC (г. Манассас, штат Виргиния). Суспензию отрицательных в отношении рецептора EGFR клеток острого миелоидного лейкоза человека MOLM-13 поддерживали в RPMI1640+25 мМ Нерес (Gibco) с добавлением 20% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (Gibco). Клетки выращивали в RPMI 1640+25 мМ Нерес (Gibco, г. Уолтем, штат Массачусетс) с 10% FBS (Gibco, г. Уолтем, штат Массачусетс).

**Проточная цитометрия:** Клетки отделяли от колбы с использованием бесферментного буфера для диссоциации клеток (Gibco, г. Уолтем, штат Массачусетс) и фильтровали через 40-мкм фильтр (Falcon).  $5 \times 10^4$  клеток высевали на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Клетки инкубировали с конъюгированным антителом или исходным антителом, разведенным в буфере для окрашивания BSA (BD Bioscience, г. Сан-Хосе, штат Калифорния), в течение 1 часа при 4 °С. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания. Затем клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при 4 °С с меченым Alexa Fluor 647 вторичным антителом против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Вторичные антитела разводили 1:200 в буфере для окрашивания, содержащем 3% ослиной сыворотки (Rockland Immunochemicals). В течение последних 10 минут инкубации к клеткам добавляли SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain (ThermoFisher) в конечной концентрации 30 нМ. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания, затем ресуспендировали в конечном объеме 25 мкл/лунку в буфере для окрашивания и считывали на проточном цитометре iQue Screener (Intellicyt). Для анализа данных использовали программное обеспечение ForeCyt. Живые клетки определяли путем исключения событий с сильным окрашиванием нуклеиновых кислот. Среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) определяли на живых клетках и графически представляли в GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) в виде логарифма концентрации антител в сравнении в зависимости от СИФ. К данным добавляли аппроксимацию кривой нелинейной регрессии и рассчитывали значения  $EC_{50}$ .

Для всех протестированных мкАт и конъюгатов исходные мкАт и модифицированные мкАт продемонстрировали сходное клеточное связывание (таблица 6).

**Таблица 6.  $EC_{50}$  (нМ) связывания мкАт/конъюгатов с целевыми клетками**

	<b>mAb</b>	<b>мкАт-азид</b>	<b>мкАт-DOTA</b>	<b>мкАт-DFO</b>
Вектибикс	1,3	1,3	0,9	
Цетуксимаб	0,6	0,2	0,4	
Герцептин	2,0	0,9	3,1	
Пертузумаб	2,5	3,3	4,4	

анти-PSMA мкАт (азид, случайным образом)	5,5	4,7	5,4	4,6	
анти-PSMA мкАт (гликан)	0,7	0,5	0,7		
<b>Образцы MTG</b>					
	<b>mAb</b>	<b>Дегликозилир ованное</b>	<b>мкАт-азид</b>	<b>мкАт-DOТА</b>	<b>мкАт-DFO</b>
анти-PSMA мкАт (MTG)	4,1	3,4	5,0	6,7	4,5

### **Пример 11. Анализ клеточного связывания с помощью In-111**

Клеточное связывание измеряли с помощью радиометрического анализа с использованием радиоактивно меченных In-111 белков, описанных в таблице 4. Анти-PSMA мкАт и трансферрин тестировали на клетках C4-2B (PSMA+ и трансферрин+). Цетуксимаб и панитумумаб тестировали на клетках A431 (EGFR+) и клетках MOLM-13 (EGFR-).

Прикрепленные клетки отделяли с помощью бесферментного буфера для диссоциации клеток (Gibco). Отделенные прикрепленные клетки и собранные суспензионные клетки подсчитывали и промывали холодным буфером для окрашивания (BD Biosciences). Различные количества клеток в 200 мкл буфера для окрашивания добавляли в микроцентрифужные пробирки и помещали на лед. 0,5 мкКи белка, меченного In-111, добавляли в каждую пробирку и инкубировали в течение 1 часа на льду. Клетки промывали холодным PBS (Gibco) для удаления несвязанного антитела и ресуспендировали в 500 мкл холодного PBS. Образцы переносили в сцинтилляционные пробирки, и радиоактивность, связанную с клетками, определяли посредством гамма-радиометрии (автоматический счетчик гамма-излучения Hidex).

Число импульсов в минуту (имп/мин) из исследуемых образцов были преобразованы в мкКи In-111 с использованием значения имп/мин при помощи линейной регрессии, полученной с использованием известных количеств меченного In-111 белка. Связанные значения мкКи были преобразованы в связанные моли с использованием следующего расчета: (Связанные мкКи/удельная активность)/молекулярная масса мкАт или белка. Каждая точка данных представляет собой среднее значение для двух образцов.

Меченное при помощи клик-реакции In-111 анти-PSMA мкАт и In-111-трансферрин связывались с клетками C4-2B, причем количество связанной с клетками радиоактивности увеличивается с увеличением количества клеток (Фиг. 3А). Анти-EGFR антитела, меченные In-111 при помощи клик-реакции, панитумумаб и цетуксимаб, связываются с клетками A431, причем количество связанной с клетками радиоактивности увеличивается с увеличением количества клеток; специфического связывания меченных при помощи клик-реакции анти-EGFR антител с клетками MOLM-13 отрицательного контроля обнаружено не было (Фиг. 3В).

### **Пример 12. Анализ поглощения клетками индия**

В клетках C4-2B была определена кинетика интернализации меченного In-111

анти-PSMA мкАт.

Клетки высевали по  $3 \times 10^6$  клеток на чашку Петри диаметром 60 мм (Corning) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор с увлажнением при 37 °С на ночь. Питательные среды для посева удаляли и заменяли 2 мл холодного буфера для окрашивания (BD Biosciences). Чашки Петри затем помещали на лед. Антитело, меченное 0,5 мкКи In-111, добавляли в каждую чашку Петри и инкубировали в течение 1 часа на льду. Клетки промывали холодным PBS (Gibco) для удаления несвязанного антитела с поверхности клетки. В различные моменты времени клетки анализировали на радиоактивность, связанную с поверхностной мембраной, и на внутриклеточную радиоактивность, как описано ниже.

Радиоактивность, связанную с поверхностью, снимали с помощью процедуры кислотного отщпаривания: 1,5 мл буфера для отщпаривания мембран (50 мМ глицина, 150 мМ NaCl, pH 2,7 с пепсином (Amresco), добавленным до 25 мкг/мл) добавляли к клеткам и чашки Петри инкубировали на льду в течение 15 минут. Буфер для отщпаривания переносили в сцинтилляционные пробирки. Клетки промывали холодным PBS, а растворы для промывки переносили в сцинтилляционные пробирки. Радиоактивность определяли посредством гамма-радиометрии (автоматический счетчик гамма-излучения Hidex). Радиоактивность, связанную с поверхностной мембраной, определяли как сумму промывок буфером для отщпаривания+PBS.

Внутриклеточную радиоактивность анализировали путем получения клеточных лизатов. После того, как связанную с поверхностью радиоактивность отмывали буфером для отщпаривания, а клетки промывали, к клеткам добавляли 1,5 мл 1 М NaOH (Teknova), и чашки Петри инкубировали на льду в течение 5 минут. Лизаты клеток с отщпаренной поверхностью переносили в сцинтилляционные пробирки. Чашки Петри промывали холодным PBS, а промывочные растворы переносили в сцинтилляционные пробирки. Радиоактивность определяли посредством гамма-радиометрии (автоматический счетчик гамма-излучения Hidex). Внутриклеточную радиоактивность определяли как сумму промывочных растворов лизатов клеток с отщпаренной поверхностью+PBS

Для образцов для времени=0 клетки анализировали на радиоактивность, связанную с поверхностной мембраной, и внутриклеточную радиоактивность сразу же после первоначального связывания антител на льду. Для 10-минутных, 30-минутных, 1-часовых и 2-часовых образцов по 3 мл среды для культивирования клеток добавляли в каждую чашку Петри после первоначального связывания антител, и чашки Петри помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор с увлажнением при 37 °С. В каждую временную точку времени чашки Петри вынимали из инкубатора и помещали на лед. Среда для культивирования клеток переносили в сцинтилляционные пробирки и клетки промывали холодным PBS. Промывочные растворы PBS собирали в сцинтилляционные пробирки. Клетки анализировали на радиоактивность, связанную с поверхностной мембраной, и на внутриклеточную радиоактивность, как описано ниже. В каждой временной точке неотщпаренный образец, получали путем инкубации клеток с PBS вместо буфера для отщпаривания до лизиса клеток. Эти образцы были использованы для оценки

эффективности отщпаривания и сравнения результатов с отщпаренными образцами.

Число импульсов в минуту из исследуемых образцов были преобразованы в мкКи In-111 с использованием значения имп/мин из линейной регрессии, полученной с использованием известных количеств меченного In-111 мкАт. Процент локализации In-111 мкАт на поверхностной мембране клеток (отщпаренные образцы) и внутри клеток (лизированные образцы) определяли по следующей формуле: % локализованный=100 \* (мкКи образца/среднее общее мкКи), где общее мкКи относится к суммированию всех собранных образцов, включая среды для инкубации, промывочных растворов PBS, промывочных растворов глицина и лизированных клеток. Каждая точка данных представляет собой среднее значение для двух образцов.

Связанный с поверхностью In-111 быстро исчез с поверхности клетки и был перераспределен внутриклеточно. Методика отщпаривания высвобождает ~ 80% связанной с поверхностью клетки радиоактивности в момент времени 0; к концу инкубации только 20% высвобождалось при отщпаривании, и более 60% радиоактивности приходилось на клеточный лизат (Фиг. 4).

### **Пример 13. Эффективность в мышинной модели ксенотрансплантации опухоли**

**Исследование с целью определения оптимальной дозы анти-PSMA мкАт-ДОТА-Ас -225:** Самцам мышей линии NSG (N=8 на группу) подкожно имплантировали  $10^6$  клеток LNCaP, и опухоли росли до 100-150 мм<sup>3</sup>. Мышам внутривенно вводили однократную дозу анти-PSMA мкАт-азид-ДОТА-<sup>225</sup>Ас или изотипического контроля, контрольного мкАт-азид-ДОТА-<sup>225</sup>Ас в диапазоне активностей (10 нКи, 25 нКи, 70 нКи, 200 нКи). Вводимая доза на мышь была доведена до 10 мкг белка с холодowymi антителами. Два раза в неделю измеряли размер опухоли и массу тела. Животных умерщвляли, когда размер опухоли превышал 1500 мм<sup>3</sup> или потеря массы тела превышала 20%.

Анти-PSMA мкАт-ДОТА-Ас-225 демонстрирует ингибирование роста опухоли после однократной дозы, особенно при более высоких радиоактивных дозах, и превосходит изотипический контроль при всех дозах (Фиг. 5А). Все дозы контрольного радиоактивного конъюгата мкАт имели сходные кривые выживаемости с контролем носителем (Фиг. 5В; таблица 7); конъюгат анти-PSMA мкАт продемонстрировал четкий дозозависимый эффект в отношении увеличения выживаемости при увеличении радиоактивной дозы (Фиг. 5С; таблица 7). исследование было прекращено через 209 суток, при этом осталось 3 мыши, все из группы анти-PSMA мкАт 200 нКи, и исследование не выявило обнаруживаемых опухолей.

**Таблица 7. Медиана выживаемости**

Доза	анти-PSMA мкАт	Контроль изотипа
10 нКи	61 сут	46 сут
25 нКи	82 сут	48 сут
70 нКи	92,5 сут	50 сут

200 нКи	126,5 сут	39,5 сут
Несущая среда	46	

Предполагается, что варианты осуществления изобретения являются только иллюстративными и специалистам в данной области будет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретным процедурам согласно изобретению. Подразумевается, что все такие эквиваленты включены в объем данного изобретения и охватываются прилагаемой формулой изобретения.

Все ссылки (включая заявки на патенты, патенты и публикации), приведенные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, или патент, или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ мечения полипептида ионом радиоактивного металла, включающий:
  - a. обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции;
  - b. обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции; и
  - c. приведение в контакт модифицированного полипептида с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции реагировать со вторым партнером по клик-реакции, чтобы таким образом пометить полипептид ионом радиоактивного металла.
2. Способ по п. 1, в котором один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкиновую группу, а другой партнер по клик-реакции содержит азид, или в котором один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкеновую группу, а другой партнер по клик-реакции содержит диен.
3. Способ по п. 1 или п. 2, в котором полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
4. Способ по п. 3, в котором антитело представляет собой моноклональное анти-PSMA антитело.
5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором ион радиоактивного металла представляет собой  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ .
6. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий взаимодействие электрофила на боковой цепи с сульфгидрильной группой, ковалентно связанной с первым партнером по клик-реакции, для получения модифицированного полипептида.
7. Способ по любому из пп. 1-5, в котором модифицированный полипептид представляет собой модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученный путем сайт-специфического включения первого партнера по клик-реакции.
8. Способ по п. 7, в котором модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают при помощи способа, включающего подгонку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента бактериальной эндогликозидазой, специфической для  $\beta$ -1,4-связи между остатком корового GlcNac в **сайте гликозилирования Fc антитела для получения подогнутого антитела** или его антигенсвязывающего фрагмента, **и взаимодействие подогнутого антитела** или его антигенсвязывающего фрагмента с меченым азидом сахаром в присутствии гликотрансферазы, такой как галактозилтрансфераза GalT или GalNac-трансфераза, чтобы таким образом получить модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
9. Способ по п. 8, в котором меченный азидом сахар представляет собой UDP-N-азидоацетилгалактозамин (UDP-GalNaz) или UDP-6-азидо-6-дезоксигалактозамин (UDP-6-азидо-6-дезоксигалNac).
10. Способ по п. 8, в котором гликозилтрансфераза представляет собой

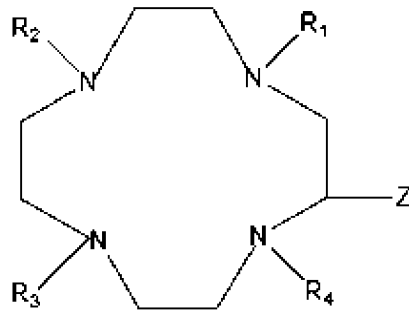
галактозилтрансферазу GalT или GalNAc-трансферазу.

11. Способ по п. 7, в котором модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают при помощи способа, включающего дегликозилирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента амидазой для **получения дегликозилированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и взаимодействие дегликозилированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с азидоамином** в присутствии трансклутаминазы микроорганизмов, чтобы таким образом получить модифицированный полипептид.

12. Способ по п. 11, в котором азидоамин выбран из 3-азидопропиламина, 6-азидогексиламина, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)тетраэтиленгликоля, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)пентаэтиленгликоля и O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоля.

13. Способ по п. 1, в котором модифицированный полипептид содержит полипептид, ковалентно связанный, напрямую или через линкер, с азидной, тетразиновой или тетразольной группой.

14. Способ по п. 1, в котором хелатирующий агент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $C_1$ - $C_4$  алкил или ( $C_1$ - $C_2$  алкил) фенил, и

$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $C_1$ - $C_4$  алкил; и

$Z$  представляет собой  $(\text{CH}_2)_n\text{Y}$ , где

$n$  равен 1-10, и

$Y$  представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

альтернативно,  $Z$  представляет собой водород; и

каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{X}$ , где

$Q$  независимо представляет собой водород,  $C_1$ - $C_4$  алкил или ( $C_1$ - $C_2$  алкил) фенил, и

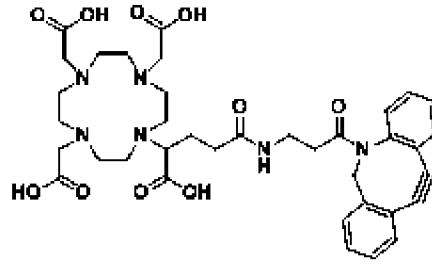
$X$  независимо представляет собой водород, бензил,  $C_1$ - $C_4$  алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

альтернативно, хелатирующий агент содержит лиганд с открытой цепью.

15. Способ по п. 1, в котором хелатирующий фрагмент содержит структуру

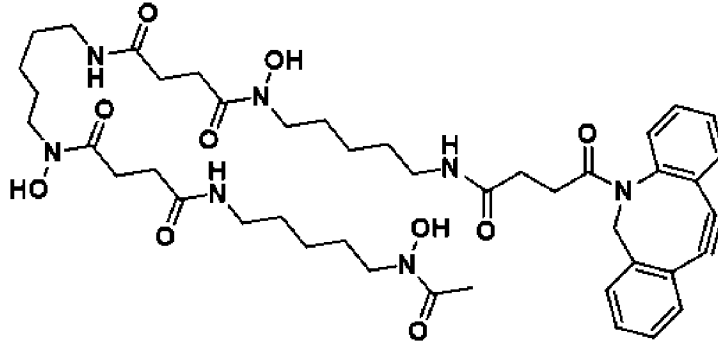


формулы (II):



формула (II).

или структуру формулы (III):



формула (III).

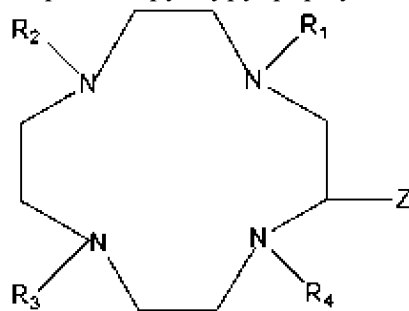
16. Способ мечения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ , включающий:

a. обеспечение модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной, тетразиновой или тетразольной группой;

b. обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  or  $^{89}\text{Zr}$ , связанного с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с алкиновой или алкеновой группой; и

c. приведение в контакт модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих азидной, тетразиновой или тетразольной группе реагировать с алкиновой или алкеновой группой, чтобы таким образом пометить антитело или его антигенсвязывающий фрагмент  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{89}\text{Zr}$ ,

где хелатирующий агент содержит структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{X}$ , где

Q независимо представляет собой водород, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> алкил) фенил, и

X независимо представляет собой водород, бензил, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил; и

Z представляет собой (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Y, где

n равен 1-10, и

Y представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный с алкиновой группой;

альтернативно, Z представляет собой водород; и

каждый из R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляет собой CHQCO<sub>2</sub>X, где

Q независимо представляет собой водород, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> алкил) фенил, и

X независимо представляет собой водород, бензил, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или электрофильный, или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный с алкиновой группой,

или, альтернативно, хелатирующий агент содержит лиганд с открытой цепью.

17. Способ по п. 16, дополнительно включающий взаимодействие электрофила на боковой цепи с сульфгидрильной группой, ковалентно связанной с азидной, тетразиновой или тетразольной группой, для получения модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

18. Способ по п. 16, в котором модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают путем сайт-специфического включения первого партнера по клик-реакции.

19. Способ по п. 18, в котором модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают при помощи способа, включающего подгонку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента бактериальной эндогликозидазой, специфической для β-1,4-связи между остатком корового GlcNac **в сайте гликозилирования Fc антитела для получения подогнутого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и взаимодействие подогнутого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с меченым азидом сахаром в присутствии гликотрансферазы, чтобы таким образом получить модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.**

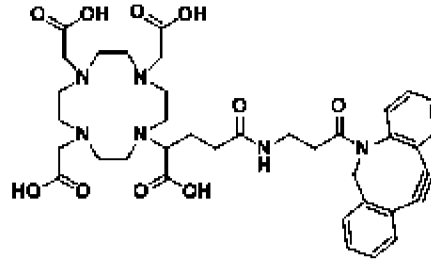
20. Способ по п. 19, в котором меченный азидом сахар представляет собой UDP-N-азидоацетилгалактозамин (UDP-GalNaz) или UDP-6-азидо-6-дезоксигалактозамин (UDP-6-azido-6-deoxy GalNac).

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что гликозилтрансфераза выбрана из галактозилтрансферазы GalT или GalNac-трансферазы.

22. Способ по п. 16, в котором модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают при помощи способа, включающего дегликозилирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента амидазой для **получения дегликозилированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и взаимодействие дегликозилированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с азидоамином, в присутствии трансклутаминазы микроорганизмов, чтобы таким образом получить модифицированный полипептид.**

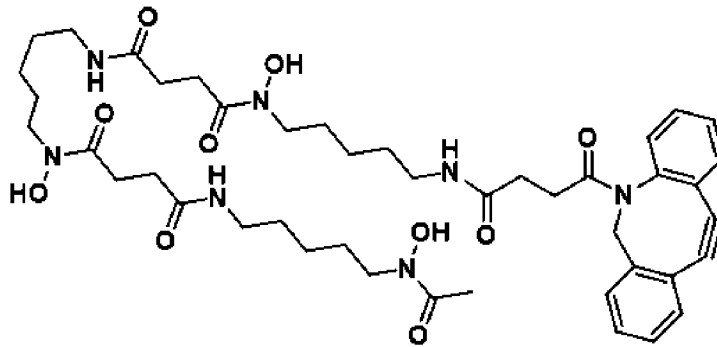
23. Способ по п. 22, в котором азидоамин выбран из 3-азидопропиламина, 6-азидогексиламина, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)тетраэтиленгликоля, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)пентаэтиленгликоля и O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоля.

24. Способ по п. 16, в котором хелатирующий фрагмент содержит структуру формулы (II):



формула (II)

или структуру формулы (III):



формула (III).

25. Способ двойного мечения полипептида ионами двух радиоактивных металлов, включающий:

a. обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции и вторым партнером по клик-реакции;

b. обеспечение первого радиоактивного комплекса, содержащего ион первого радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с третьим партнером по клик-реакции; и

c. обеспечение второго радиоактивного комплекса, содержащего ион второго радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный с четвертым партнером по клик-реакции; и

d. приведение в контакт модифицированного полипептида с радиоактивными комплексами в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции реагировать с третьим партнером по клик-реакции, а второму партнеру по клик-реакции реагировать с четвертым партнером по клик-реакции, чтобы таким образом пометить полипептид

ионами первого и второго радиоактивных металлов.

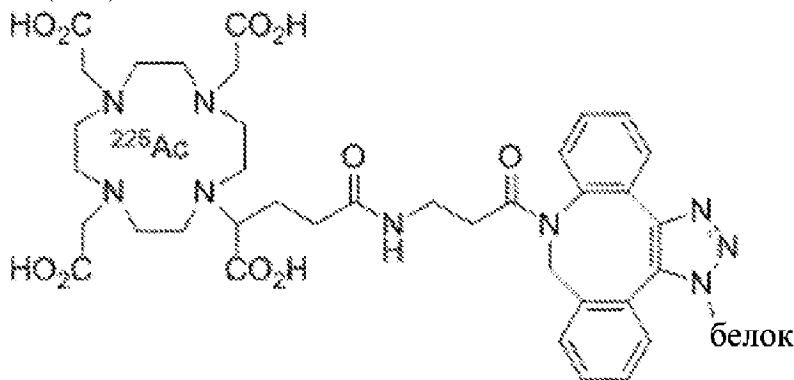
26. Способ по п. 25, в котором один из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит алкиновую группу, а другой из первого и второго партнеров по клик-реакции содержит азид, и в котором один из третьего и четвертого партнеров по клик-реакции содержит алкеновую группу, а другой из третьего и четвертого партнера по клик-реакции содержит диен, и в котором ион первого или второго радиоактивного металла представляет собой диагностический излучатель, а другой представляет собой терапевтический излучатель, или где ионы и первого и второго радиоактивного металла представляют собой терапевтические излучатели.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая радиоактивно меченный полипептид, полученный способом по п. 1 или п. 16, и фармацевтически приемлемый носитель.

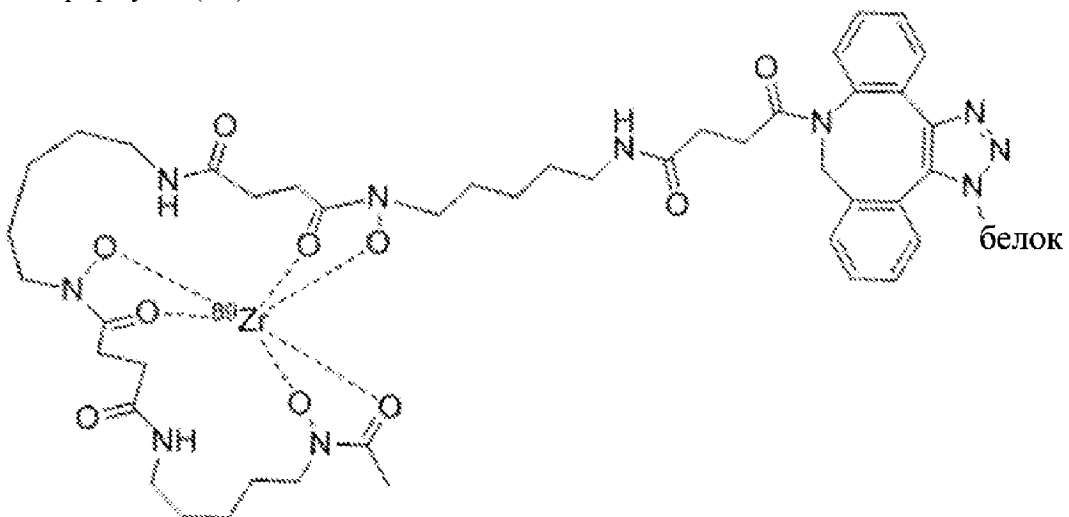
28. Способ лечения неопластического заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 27.

29. Тераностический агент, содержащий радиоактивно меченное антитело, полученное способом по п. 1 или п. 16, и фармацевтически приемлемый носитель, в котором сохранены иммунологические свойства радиоактивно меченного антитела.

30. Тераностический агент, полученный способом по п. 1, имеющий структуру формулы (VIII):



или формулы (IX):



31. Тераностический агент по п. 29, в котором ион радиоактивного металла выбран из  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{194}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{255}\text{Fm}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  или  $^{111}\text{In}$ .

32. Комбинация, содержащая:

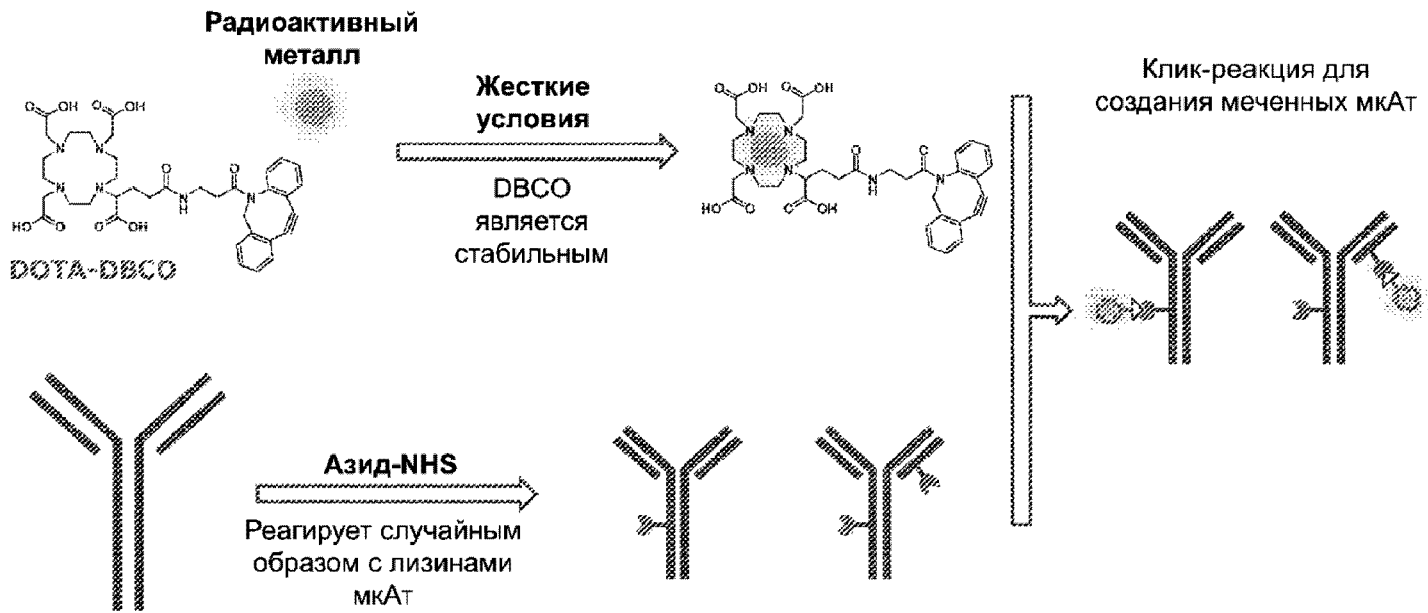
а. модифицированный полипептид, содержащий полипептид, ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции; и

б. радиоактивный комплекс, содержащий ион радиоактивного металла, связанный с хелатирующим фрагментом, где хелатирующий фрагмент содержит хелатирующий агент, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции;

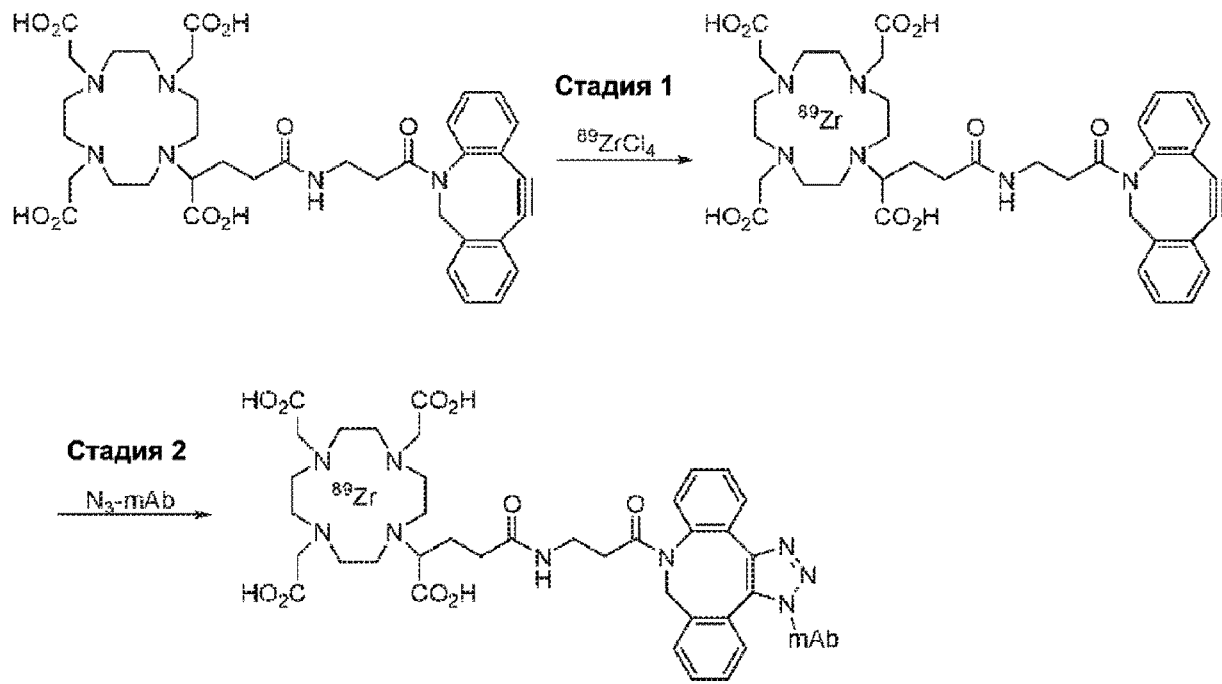
причем комбинация предназначена для применения для мечения полипептида ионом радиоактивного металла.

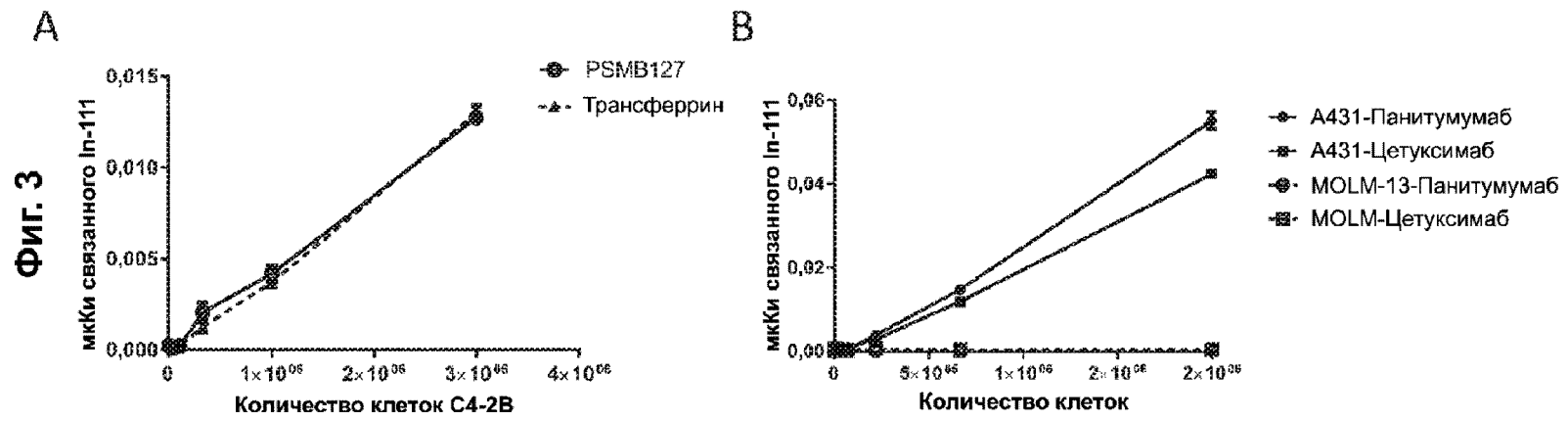
По доверенности

Фиг. 1



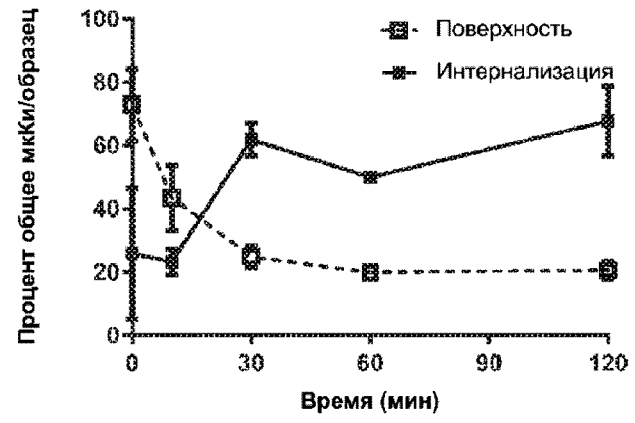
ФИГ. 2





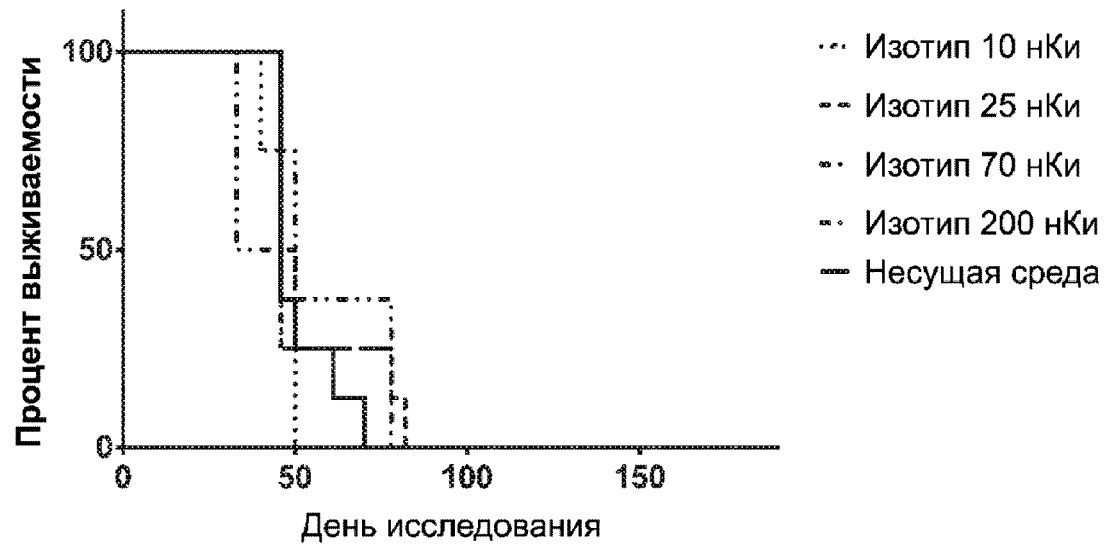


ФИГ. 4





Фиг. 5В



Фиг. 5С

