

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192551** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.01.18

(51) Int. Cl. *A61K 51/08* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.19

(54) **СПОСОБЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКИХ**

(31) 19382195.6

(32) 2019.03.19

(33) EP

(86) PCT/EP2020/057585

(87) WO 2020/188023 2020.09.24

(71) Заявитель:

**ФУНДАСИО ПРИВАДА ИНСТИТУТ
Д'ИНВЕСТИГАСИО ОНКОЛОХИКА
ДЕ ВАЛЬ ЭБРОН; ИНСТИТУСИО
КАТАЛАНА ДЕ РЕСЕРКА
И ЭСТУДИС АВАНКАТС;
ПЕПТОМИК, С.Л. (ES)**

(72) Изобретатель:

Соусек Лаура, Болье Мари-Эв (ES)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к диагностическому применению конъюгата, включающего Ототус или его функционально эквивалентный вариант и детектируемую метку, для обнаружения рака легких путем внутрилегочного введения конъюгата. Изобретение также относится к способу обнаружения или визуализации рака легких с использованием указанных конъюгатов, наборов, включающих указанные конъюгаты, и конъюгатов, содержащих контрастное вещество или визуализирующее средство.

A1

202192551

202192551

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 570483EA/019

СПОСОБЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКИХ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области диагностики, более конкретно, к области диагностики рака легких *in vivo* при помощи отслеживаемого средства, которое специфически накапливается в пролиферативных клетках.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рак легких является одним из видов рака с высокой летальностью как во всем мире, так и внутри страны, и такая тенденция обусловлена отсутствием симптомов и методов ранней диагностики, обладающих высокой чувствительностью.

У большинства пациентов заболевание перешло в запущенную стадию еще до постановки диагноза, поэтому лечение на ранних стадиях не проводилось. Двумя распространенными видами рака легких являются мелкоклеточный рак легких (МРЛ) (16,8%) и немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) (80,4%). Немелкоклеточный рак легких в основном включает плоскоклеточную карциному, аденокарциному легких и крупноклеточный рак легких, среди которых аденокарцинома легких является наиболее распространенным видом рака легких (30%-65%). Патогенез рака легких до сих пор не известен.

Современные медицинские исследования направлены на диагностику и лечение рака легких на ранних стадиях. По статистике у пациентов с немелкоклеточным раком легких на ранней стадии 5-летняя выживаемость достигает 80%, в то время как общая 5-летняя выживаемость при немелкоклеточном раке легких составляет всего 15%. Таким образом, важно диагностировать и лечить рак легких на ранней стадии.

Современные методы диагностики рака легких включают цитологический анализ мокроты, исследование изображений, эндоскопию и биопсию. Чувствительность цитологического анализа мокроты низкая. Методы визуализации, обычно используемые при раке легких, включают рентгенографию, КТ, МРТ (магнитно-резонансную томографию), УЗИ, нуклидную визуализацию, ПЭТ-КТ (позитронно-эмиссионную томографию/компьютерную томографию) и тому подобное. Методы визуализации недостаточно чувствительны, и обычно можно увидеть лишь очаг поражения размером более 1 см. При эндоскопии опухоль видна только тогда, когда она находится в дыхательных путях, доступных для эндоскопа. Низкодозная КТ грудной клетки имеет ограниченную чувствительность, хотя и является наиболее признанным методом диагностики. Как и рентгеновское исследование, КТ включает применение ионизирующего излучения, которое само по себе может приводить к раку.

Частота диагностирования рака у пациентов на ранних стадиях заболевания, не имеющих типичных симптомов, составляет всего 15%. Традиционные методы скрининга рака легких не подходят для групп населения высокого риска из-за их ограниченной специфичности и чувствительности, обременительности и высокой стоимости. Эти

традиционные методы не позволяют существенно снизить смертность от рака легких. Таким образом, существует потребность в альтернативном или дополнительном способе скрининга рака легких для повышения частоты диагностирования раннего рака легких и уменьшения количества хирургических операций для снижения риска осложнений.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему:

i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и

ii) детектируемую метку,

для использования в способе диагностики «in vivo» рака легких у субъекта, который нуждается в этом, путем внутрилегочного введения конъюгата.

Во втором аспекте изобретение относится к способу обнаружения или визуализации клеток рака легких у субъекта, включающему:

i) интраназальное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку;

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки; и

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации.

В третьем аспекте изобретение относится к набору для диагностики рака легких, включающему:

i) конъюгат, включающий полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,

ii) устройство для назальной инстилляции или назальной ингаляции конъюгата по п. i); и

iii) средства для упаковки компонентов по пунктам i) и ii).

В четвертом аспекте изобретение относится к применению набора по третьему аспекту изобретения для диагностики рака легких или для мониторинга прогрессирования рака легких, или для мониторинга эффекта терапии.

В пятом аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему:

i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и

ii) детектируемую метку, выбранную из группы, состоящей из контрастного вещества или визуализирующего средства.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Ототус распределяется в легких в мышинной модели KRas^{G12D}-индуцируемой аденокарциномы легких при интраназальном введении. (A) Количество

Отомус-DFO-⁸⁹Zr, обнаруженное в легких здоровых мышей, в зависимости от времени представлено в виде % введенной дозы. Показано среднее значение, S.D. и количество животных. **(B)** Иммунофлуоресценция легочной ткани мышей, получавших минибелок Отомус. Специфическое анти-Отомус антитело подтверждает присутствие Отомус в легочных клетках через 4 ч после введения. Стрелки указывают на положительно окрашенные ядра. Масштабная линейка, 10 мкм. Большое увеличение области, окруженной белой пунктирной линией, показано на правой панели. Цифры соответствуют скорректированной общей флуоресценции клеток, рассчитанной с использованием ImageJ **(C)** трехмерного рендеринга микро-ПЭТ/КТ визуализации легких мыши с опухолью через 24 часа после интраназального введения 2,37 мг/кг Отомус-DFO-⁸⁹Zr. Данные КТ представлены в серой шкале, и данные Отомус-DFO-⁸⁹Zr микро-ПЭТ в цветной шкале (анализировали n=2 мыши). Цифры соответствуют % интраназальной дозы (ИД)/г для поглощения Отомус-DFO-⁸⁹Zr.

Фигура 2. Исследование биораспределения и фармакокинетики. 2 мг/кг Отомус-DFO-⁸⁹Zr вводили интраназально здоровым контрольным и несущим опухоль Kras^{G12D} мышам. **(A)** Изображение легких, полученное через 24 ч после интраназального введения несущим опухоль мышам. Цифры соответствуют %ИД/г для поглощения Отомус-DFO-⁸⁹Zr **(B)**. Изображение легких, полученное через 24 ч после интраназального введения здоровым контрольным животным. **(C)** Биораспределение на основании ex vivo количественной оценки радиоактивности от Отомус-DFO-⁸⁹Zr в каждой точке после интраназального введения мышам со сформировавшейся аденокарциномой легких.

Фигура 3. **(A)**. Ex vivo интенсивность флуоресценции легкого, подвергнутого воздействию ОтомусCPP-AF660, через 4 ч после интраназального введения (1,4 мг/кг в 30 мкл растворителя, 10 mM ацетата натрия, pH 6,5). Масштабная линейка, 1 см. **(B)**. Через 24 ч после однократного введения ОтомусCPP-AF660 полипептид поддается обнаружению в опухолях легких (ИФ, интенсивность флуоресценции). На нижней панели показаны те же легкие, в которых макроскопически видимые поверхностные опухоли обозначены кружками. Масштабная линейка, 1 см.

Фигура 4. Биораспределение на основании ex vivo количественной оценки радиоактивности через 72 часа после внутривенного введения 2,68 мг/кг Отомус-DFO-⁸⁹Zr. % введенной инъекцией дозы показан в расчете на грамм указанной ткани.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым средствам для диагностики и/или мониторинга рака легких.

Если не указано иначе, все технические термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение.

Все варианты осуществления, раскрытые в контексте одного аспекта изобретения, также применимы к другим аспектам изобретения.

Диагностическое применение конъюгатов по изобретению

Определения, приведенные в данном, и в каждом другом, аспекте изобретения, в равной степени применимы ко всему изобретению.

Как описано в примерах, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что конъюгат, включающий полипептид с SEQ ID NO: 1 и детектируемую метку, такую как флуоресцентная метка (AF660) или радиоизотопная метка (^{89}Zr), может быть использован в качестве изотопного индикатора опухоли легких при введении *in vivo* интраназальным путем введения, поскольку он специфически накапливается в раковых клетках, будучи способным различать здоровые и пролиферативные клетки. Удивительно, но конъюгат по изобретению накапливается в опухолях через 24 часа, при этом вымываясь из нормальной ткани.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему:

- i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и
 - ii) детектируемую метку,
- для использования в способе диагностики «*in vivo*» рака легких у субъекта, который нуждается в этом, путем внутрилегочного введения конъюгата.

В другом аспекте изобретение относится к применению конъюгата, включающего:

- i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и
 - ii) детектируемую метку,
- для диагностики или обнаружения рака легких у субъекта путем внутрилегочного введения конъюгата.

Используемый в настоящем документе термин «конъюгат» означает два или более соединений, которые связаны вместе таким образом, что функция каждого соединения в конъюгате сохраняется. Связь двух соединений может представлять собой физическое или химическое взаимодействие, предпочтительно химическое взаимодействие, более предпочтительно ионную или ковалентную связь; более предпочтительно ковалентную связь.

В настоящем документе термины «полипептид» и «пептид» использованы взаимозаменяемо для обозначения полимеров любой длины из аминокислот. Полипептид по изобретению может содержать модифицированные аминокислоты, среди которых могут находиться не являющиеся аминокислотами компоненты. В предпочтительном варианте осуществления полипептид состоит исключительно из аминокислот. Предпочтительно, полипептид по п. (i) конъюгата имеет длину от 80 до 500 аминокислот, более предпочтительно от 80 до 300 аминокислот, более предпочтительно от 80 до 250 аминокислот, более предпочтительно от 80 до 150, даже более предпочтительно от 80 до 130 аминокислот, предпочтительно от 90 до 130 аминокислот, предпочтительно не более 125 аминокислот, более предпочтительно не более 100 аминокислот. В предпочтительном варианте осуществления полипептид имеет длину от 90 до 98 аминокислот,

предпочтительно от 90 до 95 аминокислот, более предпочтительно 91 аминокислоту.

Термин «аминокислота» относится к природным аминокислотам и не природным (синтетическим) аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют как природные аминокислоты. Кроме того, термин «аминокислота» охватывает как D-, так и L-аминокислоты (стереоизомеры), предпочтительно L-аминокислоты.

Термин «природные аминокислоты», или «существующие в природе аминокислоты», охватывает 20 существующих в природе аминокислот; те аминокислоты, которые часто посттрансляционно модифицированы *in vivo*, включая, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; а также другие необычные аминокислоты, включая, но без ограничения, 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин.

Используемый в настоящем документе термин «неприродная аминокислота», или «синтетическая аминокислота», означает карбоновую кислоту, или ее производное, замещенную в положении «а» аминок группой и структурно родственную природной аминокислоте. Иллюстративные неограничивающие примеры модифицированных или необычных аминокислот включают 2-аминоадипиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, бета-аланин, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроевую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, 2,4-диаминомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин, аллогидроксизин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, аллоизолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, 6-N-метиллизин, N-метилвалин, норвалин, норлейцин, орнитин и так далее.

Полипептид по настоящему изобретению также может содержать не аминокислотные фрагменты, такие как, например, гидрофобные фрагменты (различные линейные, разветвленные, циклические, полициклические или гетероциклические углеводороды и производные углеводородов), связанные с пептидами; различные защитные группы, которые присоединены к концам соединения для уменьшения деградации. Соответствующие защитные функциональные группы описаны в сборнике Green and Wuts, «Protecting Groups in Organic Synthesis», John Wiley and Sons, главы 5 и 7, 1991 г.

Химические (не аминокислотные) группы, присутствующие в полипептиде, могут быть включены с целью улучшения различных физиологических свойств; уменьшения деградации или клиренса; уменьшения отталкивания различными клеточными насосами, упрощения разных способов введения, повышения специфичности, повышения аффинности, повышения стабильности, биодоступности, растворимости, уменьшения токсичности и тому подобного.

«Миметик» включает молекулы, которые имитируют химическую структуру пептидной структуры и сохраняют функциональные свойства пептидной структуры.

Подходы к разработке пептидных аналогов, производных и миметиков известны в данной области.

В одном из вариантов осуществления компонент (i) конъюгата представляет собой полипептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 1, или полипептид, состоящий из функционально эквивалентного варианта SEQ ID NO: 1, предпочтительно представляет собой полипептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 соответствует

TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKATAYIL
SVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCA (SEQ ID NO: 1)

Полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 1 соответствует белковой последовательности Омотус. Используемый в настоящем документе термин «Омотус» означает полипептид, который состоит из мутантного варианта домена bHLHZip белка Мус с мутациями E61T, E68I, R74Q и R75N (где нумерация положений мутаций приведена относительно последовательности области Мус, соответствующей аминокислотам 365-454 полипептида, имеющего регистрационный номер NP_002458 в базе данных NCBI выпуска 15 марта 2015 г.). Последовательность с-Мус, имеющая в базе данных NCBI регистрационный номер NP_002458, приведена ниже (SEQ ID NO: 2), где область, из которой происходит Омотус, подчеркнута:

1 MDFFRVVENQ QPPATMPLNV SFTNRNYDL D YDSVQPYFYC DEEENFYQQQ
QQSELQPPAP

61 SEDIWKKFEL LPTPPLSPSR RSGLCSPSYV AVTPFSLRGD NDGGGGSFST
ADQLEMVTEL

121 LGGDMVNQSF ICDPDETFI KNIIIQDCMW SGFSAAAKLV SEKLASYQAA
RKDSGSPNPA

181 RGHSV CSTSS LYLQDLSAAA SECIDPSVVF PYPLNDSSSP KSCASQDSSA
FSPSSDSL LS

241 STESSPQGSP EPLVLHEETP PTTSSDSEEE QEDEEEIDVV SVEKRQAPGK
RSESGSPSAG

301 GHSKPPHSPL VLKRCHVSTH QHNYAAPPST RKDYPAAKRV
KLDSVRVLRQ ISNNRKCTSP

361 RSSDTEENVK RRTHNVLERQ RRNELKRSFF ALRDQIPELE NNEKAPKVVI
LKKATAYILS

421 VQAEEQKLIS EEDLLRKRRE QLKHKLEQLR NSCA (SEQ ID NO: 2)

Омотус также содержит домен M2 из с-Мус, имеющий последовательность RQRRNELKRSF (SEQ ID NO: 3) (смотри Dang and Lee, Mol. Cell. Biol., 1988, 8:4048-4054) (подчеркнуто двойной чертой выше), и соответствующий сигналу ядерной локализации.

Омотус характеризуется тем, что он проявляет повышенную способность к димеризации со всеми тремя онкогенными белками Мус (с-Мус, N-Мус и L-Мус). Омотус может происходить из домена bHLHZip любого белка Мус, известного в данной области, при условии наличия мутаций, приводящих к эффекту супрессии опухолей.

Таким образом, Ототус, который может быть использован по настоящему изобретению, может происходить из белка любого вида млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, домашних и сельскохозяйственных животных (коров, лошадей, свиней, овец, коз, собак, кошек или грызунов), приматов и людей. Предпочтительно, белок Ототус происходит из белка Мус человека (регистрационный номер NP_002458, выпуск 12 марта 2019 г.).

Используемый в настоящем документе термин «Мус» относится к семейству факторов транскрипции, которое включает с-Мус, N-Мус и L-Мус. Белок Мус активирует экспрессию многих генов путем связывания с консенсусной последовательностью CACGTG (последовательности Enhancer-боксы или E-боксы) и рекрутинга гистон-ацетилтрансфераз, или НАТ). Однако Мус также может действовать в качестве репрессора транскрипции. Путем связывания фактора транскрипции Miz-1 и вытеснения коактиватора p300 он ингибирует экспрессию генов-мишеней Miz-1. Мус также играет непосредственную роль в контроле репликации ДНК.

Мус b-HLN-LZ, или основная область Мус - домен лейциновой застёжки со структурой спираль-петля-спираль, представляет собой область, которая определяет димеризацию Мус с белком Max и связывание с генами-мишенями Мус. Эта область соответствует аминокислотам 365-454 белка Мус человека и характеризуется наличием двух альфа-спиралей, связанных петлей (Nair, S. K., & Burley, S. K., 2003, Cell, 112: 193-205).

В предпочтительном варианте осуществления компонент (i) конъюгата представляет собой полипептид, который содержит, состоит из, или состоит в основном из SEQ ID NO: 4, приведенной ниже.

MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVLKKTAYI
LSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSCA (SEQ ID NO: 4)

В данном контексте «состоит в основном из» означает, что указанная молекула не содержит какие-либо дополнительные последовательности, которые изменяли бы активность SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно, полипептид состоит из SEQ ID NO: 4.

Термин «функционально эквивалентный вариант» относится к любому полипептиду, полученному в результате вставки или добавления одной или более аминокислот и/или в результате делеции одной или более аминокислот, и/или в результате консервативной замены одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1; и/или полученному в результате химической модификации полипептида с SEQ ID NO: 1, который по существу сохраняет способность к мечению опухоли, присущую SEQ ID NO: 1. Предпочтительно, термин «функционально эквивалентный вариант» относится к любому полипептиду, полученному в результате вставки или добавления одной или более аминокислот и/или в результате делеции одной или более аминокислот, и/или в результате консервативной замены одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1, который по существу сохраняет способность к мечению

опухоли, присущую SEQ ID NO: 1; более предпочтительно, полученному в результате вставки или добавления одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1.

Квалифицированный специалист понимает, что для сохранения способности к мечению опухоли необходимо, чтобы вариант был способен проникать в клетку. Таким образом, функционально эквивалентные варианты Отомус способны перемещаться через клеточную мембрану. Функционально эквивалентные варианты Отомус способны трансдуцировать клетки после контакта варианта с указанной клеткой. Следует понимать, что функционально эквивалентные варианты Отомус содержат трансдуцирующий домен белка, имеющийся у природного Отомус, или другой функциональный трансдуцирующий домен белка. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентные варианты Отомус способны перемещаться через клеточную мембрану.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, если он способен трансдуцировать клетку-мишень по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% так же эффективно, как SEQ ID NO: 1.

Подходящие анализы для определения того, является ли полипептид функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1 в отношении его способности перемещаться через клеточную мембрану, включают мечение клетки реагентом, специфическим для полипептида. Обнаружение полипептида по изобретению можно осуществлять методами конфокальной микроскопии, проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии с использованием специфических для Отомус антител или Отомус, меченого соответствующими флуорофорами. Обнаружение также можно проводить с помощью автордиографических анализов клеточных фракций для выявления радиоактивно меченого Отомус.

Кроме того, функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1 также могут быть способны перемещаться через ядерную оболочку. В одном из вариантов осуществления необходимо, чтобы функционально эквивалентный вариант Отомус был способен перемещаться через ядерную оболочку. В другом варианте осуществления нет необходимости в том, чтобы функционально эквивалентный вариант Отомус был способен перемещаться через ядерную оболочку.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1, если он способен перемещаться в ядро опухолевых клеток-мишеней по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% так же эффективно, как SEQ ID NO: 1.

Подходящие анализы для определения того, является ли полипептид функционально эквивалентным вариантом SEQ ID NO: 1 в отношении его способности перемещаться в ядро, включают двойное мечение клетки реагентом, специфическим для полипептида, как описано выше, и красителем, который специфически метит ядро клетки

(таким как DAPI или краситель Хехст). Обнаружение полипептида по изобретению можно осуществлять методами конфокальной микроскопии, проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии.

Для сохранения способности к мечению опухоли может быть необходимо, чтобы вариант мог димеризоваться с Мус и/или его обязательным партнером p21/p22Мах и ингибировать активность Мус. В одном из вариантов осуществления функционально эквивалентный вариант Отомус не обязательно должен димеризоваться с Мус и/или его обязательным партнером p21/p22 Мах и ингибировать активность Мус для сохранения способности к мечению опухоли. В другом варианте осуществления необходимо, чтобы функционально эквивалентный вариант Отомус мог димеризоваться с Мус и/или его обязательным партнером p21/p22Мах и ингибировать активность Мус.

В некоторых вариантах осуществления функционально эквивалентный вариант полипептида по изобретению гомодимеризуется в меньшей степени, чем Отомус, или не вынужден образовывать гомодимеры за счет образования дисульфидной связи.

Используемое в настоящем документе выражение «гомомеризация в меньшей степени» означает меньшую способность к образованию обязательных гомодимеров полипептида по изобретению, даже в восстанавливающих условиях. В предпочтительном варианте осуществления способность уменьшена на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% в сравнении со способностью Отомус к образованию гомодимеров. Используемый в настоящем документе термин «восстанавливающие условия» означают присутствие восстанавливающего агента, соединения, которое отдает электрон другому химическому соединению в окислительно-восстановительной химической реакции. Иллюстративными неограничивающими примерами восстанавливающих агентов являются ДТТ (дитиотреитол), β-меркаптоэтанол или ТСЕР (трис(2-карбоксиил)фосфин). Возможно, что количество гомодимеров *in vitro* является одинаковым, и что различие между функционально эквивалентным вариантом и Отомус имеет место только в клетках в присутствии партнеров по гетеродимеризации, когда отсутствие дисульфидной связи потенциально допускает в большей степени образование гетеродимеров.

Можно использовать несколько анализов для определения гомодимеризации пептида, в качестве иллюстративного неограничивающего примера можно назвать анализ тепловой денатурации, контролируемой с помощью кругового дихроизма, так что димеризацию можно обнаруживать за счет сворачивания и количественной оценки термостабильности.

Подходящие функционально эквивалентные варианты включают полипептиды, состоящие в основном из полипептида с SEQ ID NO: 1. В данном контексте «состоящие в

основном из» означает, что указанная молекула не содержит какие-либо дополнительные последовательности, которые изменяли бы активность SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептид, который получен в результате вставки или добавления одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления функционально эквивалентный вариант получен в результате вставки менее 10 аминокислот, более предпочтительно менее 5 аминокислот, более предпочтительно, получен в результате вставки одной аминокислоты. В предпочтительном варианте осуществления вариант получен в результате вставки одной аминокислоты, которая представляет собой метионин.

В другом варианте осуществления функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептид, который получен в результате делеции одной или более аминокислот относительно полипептида с SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления функционально эквивалентный вариант получен в результате делеции менее 10 аминокислот, более предпочтительно менее 5 аминокислот, более предпочтительно получен в результате делеции одной аминокислоты.

Подходящими функциональными вариантами нацеленного пептида являются такие, которые имеют степень идентичности с пептидом с SEQ ID NO: 1, превышающую 25% идентичности аминокислотной последовательности, например, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Степень идентичности между двумя полипептидами определяют с использованием компьютерных алгоритмов и способов, хорошо известных специалистам в данной области. Идентичность двух аминокислотных последовательностей предпочтительно определяют с использованием алгоритма BLASTP, описанного ранее [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 1990;215: 403-410]. В предпочтительном варианте осуществления идентичность последовательностей определяют по всей длине полипептида с SEQ ID NO: 1 или по всей длине варианта, или и того, и другого.

Функционально эквивалентные варианты полипептида по изобретению также могут включать посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, ацетилирование, изопренилирование, миристоилирование, протеолитический процессинг и так далее.

Подходящими функциональными вариантами нацеленного пептида являются такие, в которых одно или более положений в полипептиде по изобретению содержат аминокислоту, которая является консервативной заменой аминокислоты, присутствующей в последовательности, упомянутой выше. «Консервативные аминокислотные замены» представляют собой замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные структурные и/или химические свойства. Например, каждая из следующих шести групп включает аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), серин (S), треонин (T); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая

кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); и 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W). Выбор таких консервативных аминокислотных замен находится в пределах компетенции специалиста в данной области, и описан, например, в публикациях Dordo et al. (*J. Mol. Biol.*, 1999, 217:721-739) и Taylor et al. (*J. Theor. Biol.*, 1986, 119:205-218).

Следует понимать, что функционально эквивалентные варианты Отомус имеют мутации в положениях, соответствующих мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, имеющимся в Отомус, полученном из с-Мус человека. Положение, в котором указанные мутации должны находиться в функционально эквивалентном варианте, могут быть определены путем множественного выравнивания последовательностей для разных последовательностей Мус и идентифицированы путем выравнивания этих положений, соответствующих положениям 61, 68, 74 и 75 в последовательности Отомус, полученного из с-Мус человека. В одном из вариантов осуществления функционально эквивалентные варианты Отомус имеют мутации в положениях, соответствующих мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, имеющимся в Отомус, полученном из с-Мус человека.

В другом варианте осуществления функционально эквивалентные варианты Отомус имеют мутации в положениях, соответствующих E61, E68, R74 и R75 в последовательности Отомус, где E61 мутировал в E61A или E61S; E68 мутировал в E68L, E68M или E68V; R74 мутировал в R74N, и R75 мутировал в R75Q.

Множественное выравнивание последовательностей представляет собой расширенный вариант попарного выравнивания, включающий анализ более двух последовательностей одновременно. В способах множественного выравнивания выравнивают все последовательности в конкретном наборе запросов. Предпочтительной программой для множественного выравнивания последовательностей (и ее алгоритмом) является ClustalW, Clusal2W или ClustalW XXL (смотри Thompson et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680). После того, как последовательности с-Мус из разных организмов и варианта сравнены (выровнены), как описано в настоящем документе, квалифицированный специалист может с легкостью определять положения в каждой последовательности, соответствующие положениям E61T, E68I, R74Q и R75N, имеющимся в Отомус, и вносить в вариант Отомус мутации, соответствующие мутациям E61T, E68I, R74Q и R75N, имеющимся в Отомус, полученном из с-Мус человека.

В предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1 включает те последовательности, которые имеют один или более, предпочтительно все, из следующих признаков: способность к димеризации с Мус и ингибированию его активности, перемещению через клеточную мембрану, перемещению в ядро, неспособность к образованию гомодимеров или сниженная способность к образованию гомодимеров в сравнении с Отомус.

Соответствующие анализы для определения того, можно ли полипептид считать

функционально эквивалентным вариантом Omomus, включают, без ограничения:

- Анализы, в которых измеряют способность полипептида к образованию димерных комплексов с Мах и Мус, такие как анализы, основанные на экспрессии гена репортера, как описано в Soucek et al. (Oncogene, 1998, 17: 2463-2472), а также PLA (анализ лигирования белка) или совместной иммунопреципитации.

- Анализы, в которых измеряют способность полипептида к связыванию с сайтом узнавания Мус/Мах в ДНК (сайт CACGTG), такие как анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA), описанный в Soucek et al. (выше).

- Анализы, в которых измеряют способность к подавлению Мус-индуцированной трансактивации, такие как анализ, основанный на экспрессии гена репортера под контролем связывающих сайтов ДНК, специфических для Мус/Мах, как описано в Soucek et al. (выше).

- Анализы, основанные на способности полипептида к ингибированию роста клеток, экспрессирующих онкоген мус, как описано в Soucek et al. (выше).

- Анализы, в которых измеряют способность к усилению мус-индуцированного апоптоза, такие как анализы, описанные в Soucek et al. (Oncogene, 1998: 17, 2463-2472). Кроме того, можно использовать любой анализ, широко известный в данной области для оценки апоптоза, такой как окрашивание Хехст, йодидом пропидия (PI) или окрашивание аннексином V, метод с трипановым синим, метод ступенчатых полос/фрагментации ДНК и TUNEL.

- Анализы методом проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии с использованием специфических для Omomus антител или Omomus, меченого соответствующими флуорофорами.

- Авторадиографические анализы клеточных фракций для выявления радиоактивно меченого Omomus.

В предпочтительном варианте осуществления полипептид считают функционально эквивалентным вариантом Omomus, если он проявляет активность в одном или более из вышеуказанных анализов, которая составляет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% от активности природного Omomus.

В конкретном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант полипептида с SEQ ID NO: 1 представляет собой полипептид с SEQ ID NO: 1, где остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 не является цистеином. Предпочтительно, остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1 представляет собой алифатическую аминокислоту или серосодержащую аминокислоту, или дикарбоновую аминокислоту, или их амиды, или аминокислоту, имеющую две основные группы, или ароматическую аминокислоту, или циклическую аминокислоту, или гидроксильную аминокислоту. Более предпочтительно, он представляет собой аминокислоту, выбранную из серина, треонина и аланина, предпочтительно, выбранную из серина и аланина.

Подходящие функционально эквивалентные варианты SEQ ID NO: 1, имеющие остаток X в положении 89 в SEQ ID NO: 1, который не является цистеином, приведены в

следующей таблице.

SEQ ID NO	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
SEQ ID NO: 5	TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKA TAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (где X представляет собой любую ак, отличную от Cys)
SEQ ID NO: 6	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILK KATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSXA (где X представляет собой любую ак, отличную от Cys)
SEQ ID NO: 7	TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKA TAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA
SEQ ID NO: 8	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILK KATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA
SEQ ID NO: 9	TEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKA TAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA
SEQ ID NO: 10	MTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILK KATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKHKLEQLRNSSA

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления функционально эквивалентный вариант полипептида с SEQ ID NO: 1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В конкретном варианте осуществления конъюгат, используемый по изобретению, также содержит химический фрагмент, облегчающий поглощение клеткой полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1, или функционально эквивалентного варианта полипептида с SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления конъюгат, используемый по изобретению, не содержит химический фрагмент, который облегчает поглощение клеткой полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта.

Термин «химический фрагмент» означает любое химическое соединение, содержащее по меньшей мере один атом углерода. Примеры химических фрагментов включают, но без ограничения, любую пептидную цепь, обогащенную гидрофобными аминокислотами и гидрофобными химическими фрагментами.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты по изобретению содержат по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, или более, химических фрагментов, которые облегчают поглощение клеткой полипептида или функционально эквивалентного

варианта указанного полипептида.

В одном варианте осуществления химический фрагмент, который облегчает поглощение клеткой полипептида, представляет собой липид или жирную кислоту.

Жирная кислота, как правило, представляет собой молекулу, содержащую углеродную цепь с кислотным фрагментом (например, карбоновой кислотой) на конце цепи. Углеродная цепь жирной кислоты может иметь любую длину, однако предпочтительно, если длина углеродной цепи составляет по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более атомов углерода, и любой образуемый из них диапазон. В конкретных вариантах осуществления длина углеродной цепи составляет от 4 до 18 атомов углерода в части цепи жирной кислоты. В конкретных вариантах осуществления углеродная цепь жирной кислоты может содержать нечетное число атомов углерода, однако в конкретных вариантах осуществления может быть предпочтительным четное число атомов углерода в цепи. Жирную кислоту, содержащую в углеродной цепи только одинарные связи, называют насыщенной, жирную кислоту, содержащую в цепи хотя бы одну двойную связь, называют ненасыщенной. Жирная кислота может быть разветвленной, хотя в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения она является неразветвленной. Конкретные жирные кислоты включают, но без ограничения, линолевую кислоту, олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, линоленовую кислоту, стеариновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, арахидоновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту.

В предпочтительном варианте осуществления химический фрагмент, который облегчает поглощение клеткой полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1, или его функционально эквивалентного варианта, представляет собой последовательность проникающего в клетку пептида, в этом случае конъюгат будет представлять собой слитый белок, включающий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и последовательность проникающего в клетку пептида.

Термин «слитый белок» относится к белкам, созданным с помощью генной технологии, которые состоят из двух или более функциональных доменов, полученных из разных белков. Слитый белок может быть получен общепринятыми способами, например, путем экспрессии гена с нуклеотидной последовательностью, кодирующей указанный слитый белок, в соответствующей клетке. Следует понимать, что «проникающий в клетку пептид» означает проникающий в клетку пептид, который отличается от проникающего в клетку пептида, образующего часть полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1 или функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1.

Термин «последовательность проникающего в клетку пептида» используют в настоящей спецификации взаимозаменяемо с терминами «СРР», «трансдуцирующий домен белка» или «РТD». Он означает пептидную цепь разной длины, которая направляет транспорт белка внутрь клетки. Процесс доставки в клетку обычно происходит путем

эндоцитоза, но пептид также может быть интернализирован в клетку путем прямой транслокации через мембрану. CPP, как правило, имеют аминокислотный состав, в котором либо присутствует относительно большое количество положительно заряженных аминокислот, таких как лизин или аргинин, или присутствуют последовательности, которые содержат чередование полярных/заряженных аминокислот и неполярных гидрофобных аминокислот.

Примеры CPP, которые могут быть использованы по настоящему изобретению, включают, без ограничения, CPP в белке *Drosophila antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK, SEQ ID NO: 13), CPP в ДНК-связывающей белке VP22 вируса простого герпеса 1 (HSV-1) (DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE, SEQ ID NO: 14), CPP Vac-7 (RRIRPRPPRLPRPRPLPFPRPG; SEQ ID NO: 15), CPP в белке TAT HIV-1, состоящие из аминокислот 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 16), аминокислот 48-60 (GRKKRRQRRRTPQ, SEQ ID NO: 17), аминокислот 47-57 (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 18); CPP пептида S413-PV (ALWKTLLKVKLAPKKKRKV; SEQ ID NO: 19), CPP пенетратина (RQIKWFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 20), CPP SynB1 (RGGRLSYSRRRFSTSTGR; SEQ ID NO: 21), CPP SynB3 (RRLSYSRRRF; SEQ ID NO: 22), CPP PTD-4 (PIRRRKKLRRLK; SEQ ID NO: 23), CPP PTD-5 (RRQRRTSKLMKR; SEQ ID NO: 24), CPP FHV Coat-(35-49) (RRRRNRTRNRNRVR; SEQ ID NO: 25), CPP BMV Gag-(7-25) (KMTRAQRRAAARRNRWTAR; SEQ ID NO: 26), CPP HTLV-II Rex-(4-16) (TRRQRTRRRARRNR; SEQ ID NO: 27), CPP D-Tat (GRKKRRQRRRPPQ; SEQ ID NO: 28), CPP R9-Tat (GRRRRRRRRRPPQ; SEQ ID NO: 29), CPP MAP (KLALKLALKLALALKLA; SEQ ID NO: 30), CPP SBP (MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 31), CPP FBP (GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV; SEQ ID NO: 32), CPP MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 33), CPP MPG(ENLS) (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-суа; SEQ ID NO: 34), CPP Pep-1 (ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 35), CPP Pep-2 (ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-суа; SEQ ID NO: 36), полиаргининовую последовательность, имеющую структуру RN (где N составляет от 4 до 17), последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 37), последовательность RRRRRRLR (SEQ ID NO: 38), последовательность RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 39); транспортан GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 40); KALAWKAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO: 41); RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 42), последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 43); последовательность RKKRRQRR (SEQ ID NO: 44); последовательность YARAAARQARA (SEQ ID NO: 45); последовательность THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 46); последовательность GGRRARRRRRRR (SEQ ID NO: 47).

В предпочтительном варианте осуществления указанный проникающий в клетку пептид не является эндогенным, содержащимся в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления CPP представляет собой CPP белка TAT HIV-1, состоящий из аминокислот 49-57 (RKKRRQRRR, SEQ ID NO: 16). В другом

предпочтительном варианте осуществления CPP представляет собой последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 37) или RRRRRRLR (SEQ ID NO: 38). В другом варианте осуществления CPP представляет собой последовательность GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 37) или RRRRRRRR (SEQ ID NO: 65).

В некоторых вариантах осуществления CPP представляет собой CPP, описанный в WO2019/018898, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления последовательность проникающего в клетку пептида слита на N-конце полипептида по изобретению или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида. В другом варианте осуществления проникающий в клетку пептид слит на C-конце полипептида по изобретению или функционально эквивалентного варианта указанного полипептида.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты или слитые белки по изобретению включают, в дополнение к собственному проникающему в клетку пептиду, присутствующему в полипептиде с SEQ ID NO: 1 или функционально эквивалентном варианте указанного полипептида, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, или более, дополнительных проникающих в клетку пептидов.

Соответствующие слитые белки по изобретению включают полипептиды Omomyc*ТАТ и Omomyc*LZArg, приведенные ниже:

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
Omomyc*ТАТ	11	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNE KAPKVVILKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKH KLEQLRNSCAGRKKRRQRRR
Omomyc*LZArg	12	MTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNE KAPKVVILKKATAYILSVQAETQKLISEIDLLRKQNEQLKH KLEQLRNSCARRRRRLR

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления слитый белок представляет собой полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 11 и 12.

Подходящие анализы для определения того, сохраняет ли конъюгат способность к перемещению через клеточную мембрану, свойственную Omomyc, включают, без ограничения, анализы, в которых определяют способность конъюгата трансдуцировать клетки в культуре. Этот анализ включает создание контакта конъюгата с культурой клеток и обнаружение присутствия конъюгата во внутриклеточном пространстве.

В другом предпочтительном варианте осуществления конъюгат по изобретению также содержит дополнительный сигнал ядерной локализации.

Используемый в настоящем документе термин «сигнал ядерной локализации», (NLS), означает аминокислотную последовательность длиной примерно 4-20

аминокислотных остатков, которая служит для направления белка в ядро. Как правило, последовательность ядерной локализации богата основными аминокислотами, и иллюстративные последовательности хорошо известны в данной области (Gorlich D. (1998) EMBO 5.17:2721-7). В некоторых вариантах осуществления NLS выбран из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 (PKKKRKV, SEQ ID NO: 48); NLS нуклеоплазмина (KRPAATKKAGQAKKKK, SEQ ID NO: 49); NLS CBP80 (RRRHSDENDGGQPHKRRK, SEQ ID NO: 50); NLS белка Rev HIV-1 (RQARRNRRRWE, SEQ ID NO: 51); HTLV-1 Rex (MPKTRRRPRRSQRKRPT, SEQ ID NO: 52); NLS hnRNP A (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFKPRNQGGY, SEQ ID NO: 53); NLS gpL23a (VHSHKKKKIRTSPFTTPKTLRLRRQPKYPRKSAPRRNKLDHY, SEQ ID NO: 54). В одном варианте осуществления изобретения сигнал ядерной локализации содержит мотив K (K/R) X (K/R) (SEQ ID NO: 55).

В другом предпочтительном варианте осуществления NLS может быть N-концевым или C-концевым для конъюгата или слитого белка, содержащего полипептид с SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентный вариант.

Квалифицированный специалист понимает, что может быть желательно, чтобы конъюгат, используемый по изобретению, дополнительно содержал один или более гибких пептидов, которые соединяют полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, последовательность проникающего в клетку пептида и/или NLS. Таким образом, в конкретном варианте осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, непосредственно связан с последовательностью проникающего в клетку пептида. В другом конкретном варианте осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, связан с последовательностью проникающего в клетку пептида через гибкий пептид. В одном из вариантов осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функциональный вариант, непосредственно связан с NLS. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, связан с NLS через гибкий пептид.

В конкретном варианте осуществления полипептид конъюгата, используемого по изобретению, непосредственно связан с последовательностью проникающего в клетку пептида и с NLS.

В одном варианте осуществления NLS представляет собой один из NLS, который эндогенно присутствует в последовательности Мус, такой как пептид M1 (PAAKRVKLD, SEQ ID NO: 56) или пептид M2 (RQRRNELKRSF, SEQ ID NO: 57).

В другом варианте осуществления дополнительный NLS представляет собой NLS, который отличается от эндогенного NLS, имеющегося в полипептиде, содержащем SEQ ID NO: 1, или в функционально эквивалентном варианте SEQ ID NO: 1.

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгаты или слитые белки, используемые по изобретению, содержат, в дополнение к эндогенному NLS, имеющемуся в полипептиде по изобретению или в его функционально эквивалентном варианте, по

меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 NLS.

В другом конкретном варианте осуществления полипептид конъюгата, используемого по изобретению, связан с последовательностью проникающего в клетку пептида через первый гибкий пептидный линкер и с NLS через второй гибкий пептидный линкер.

Используемый в настоящем документе термин «гибкий пептид», «пептидный спейсер» или «пептидный линкер» означает пептид, который ковалентно связывает два белка или фрагмента, но который не является частью ни одного из полипептидов, допускает движение одного из них относительно другого без оказания существенного разрушительного действия на функцию белка или фрагмента. Таким образом, гибкий линкер не влияет на способность к мечению опухоли последовательности полипептида, способность к проникновению в клетку проникающего в клетку пептида или на способность к ядерной локализации NLS.

Гибкий пептид содержит по меньшей мере одну аминокислоту, по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 12 аминокислот, по меньшей мере 14 аминокислот, по меньшей мере 16 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по меньшей мере 30 аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере 45 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 60 аминокислот, по меньшей мере 70 аминокислот, по меньшей мере 80 аминокислот, по меньшей мере 90 аминокислот или примерно 100 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления гибкий пептид допускает движение одного белка относительно другого для повышения растворимости белка и/или повышения его активности. Соответствующие области линкера включают полиглициновую область, последовательность GPRRRR (SEQ ID NO: 58) из сочетаний остатков глицина, пролина и аланина.

В еще более предпочтительном варианте осуществления сигнал ядерной локализации выбран из группы, состоящей из PKKKRKV (SEQ ID NO: 48), PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 56) и KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 49).

В конкретном варианте осуществления конъюгаты, используемые по изобретению, содержат метку, связанную с конъюгатом, либо с С-концевым или N-концевым доменом указанного полипептида или слитого белка, или его варианта. Указанная метка, как правило, представляет собой пептидную или аминокислотную последовательность, которая может быть использована при выделении или очистке указанного слитого белка. Так, указанная метка способна связываться с одним или более лигандами, например,

одним или более лигандами аффинной матрицы, такой как носитель или гранулы для хроматографии, с высокой аффинностью. Примером указанной метки является гистициновая метка (His-метка или НТ), например, метка, содержащая 6 остатков гистидина (His₆ или Н6), которая может связываться с никелевой (Ni²⁺) или кобальтовой (Co²⁺) колонкой с высокой аффинностью. His-метка имеет полезное свойство, заключающееся в том, что она может связывать свои лиганды в условиях, которые являются денатурирующими для большинства белков и разрушительными для большинства белок-белковых взаимодействий. Таким образом, ее можно использовать для удаления белка-приманки, меченого Н6, после нарушения белок-белковых взаимодействий, в которых участвовала приманка.

Дополнительны иллюстративные неограничивающие примеры меток, полезных для выделения или очистки конъюгата или полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1 или ее вариант, или слитого белка, включают Arg-метку, FLAG-метку (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 59), Strep-метку (WSHPQFEK, SEQ ID NO: 60), эпитоп, который может быть узнан антителом, например, с-мус-метку (узнаваемую анти-с-мус антителом), HA-метку (YPYDVPDYA, SEQ ID NO: 61), V5-метку (GKPIPNPLLGLDST, SEQ ID NO: 62), SBP-метку, S-метку, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлоза-связывающий домен, хитин-связывающий домен, глутатион-S-трансферазную метку, мальтоза-связывающий белок, NusA, TrxA, DsbA, Avi-метку и так далее (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 60:523-525), аминокислотную последовательность, такую как ANGHRP (SEQ ID NO: 63) или PINDHDNPHLVINSGMTCXXC (SEQ ID NO: 64), β-галактозидазу и тому подобное.

Метка может быть использована, при необходимости, для выделения или очистки указанного слитого белка.

В предпочтительном варианте осуществления конъюгат, используемый по изобретению, используют для диагностики рака легких, где рак легких представляет собой первичную опухоль, выбранную из мелкоклеточного рака легких (МРЛ) и немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), или представляет собой метастаз рака.

Полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, используют для получения диагностического средства путем конъюгации с детектируемой меткой.

В другом аспекте изобретение относится к применению конъюгата по первому аспекту изобретения для получения диагностического средства.

В контексте настоящего изобретения термин «диагностическое средство» означает средство, включающее полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, модифицированный таким образом, что он может быть обнаружен после введения индивидууму.

Термины «детектируемая метка», «средство визуализации», «соединение для визуализации» и «контрастное вещество» в настоящем документе используются взаимозаменяемо и означают биосовместимые соединения, которые могут быть

обнаружены либо непосредственно, либо опосредованно, использование которых облегчает дифференциацию различных частей изображения за счет усиления «контраста» между этими разными областями изображения. Термины относятся к атому, молекуле, соединению или другому веществу, которое полезно для диагностики, обнаружения или визуализации рака или других состояний, связанных с поглощением полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, при помощи *in vivo* способов, известных в данной области и описанных ниже.

В вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, детектируемые метки могут включать, но без ограничения, радиоактивные вещества (например, радиоактивные изотопы, радионуклиды, радиоактивные метки или радиоизотопные индикаторы), красители, контрастные вещества, флуоресцентные соединения или молекулы, биолюминесцентные соединения или молекулы, ферменты и усиливающие средства (например, парамагнитные ионы). Кроме того, следует отметить, что некоторые наночастицы, например, квантовые точки и металлические наночастицы (описанные ниже), также могут быть подходящими для использования в качестве средства обнаружения.

В предпочтительном варианте осуществления детектируемая метка представляет собой радиоактивное вещество, предпочтительно радиоизотоп.

Радиоактивные вещества, которые могут быть использованы в качестве детектируемых меток в соответствии с вариантами осуществления изобретения, включают, но без ограничения, ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , $^{154-1581}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra и ^{225}Ac . Парамагнитные ионы, которые могут быть использованы в качестве детектируемых меток в вариантах осуществления изобретения, включают, но без ограничения, ионы переходных и лантанидных металлов (например, металлов с атомными номерами 6-9, 21-29, 42, 43, 44 или 57-71). Эти металлы включают ионы Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb и Lu. В более предпочтительном варианте осуществления радиоактивное вещество или радиоизотоп представляет собой ^{89}Zr .

Если детектируемая метка представляет собой радиоактивный металл или парамагнитный ион, метка может вступать в реакцию с реагентом, имеющим длинный «хвост» с одной или более хелатообразующими группами, присоединенными к длинному «хвосту» для связывания этих ионов. В этом случае хелатообразующие группы могут быть ковалентно связаны с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 1 или ее функциональный эквивалент. Длинный «хвост» может представлять собой полимер, такой как полилизин, полисахарид, или другую дериватизированную или поддающуюся дериватизации цепь, имеющую боковые группы, с которыми может быть связана хелатообразующая группа для связывания ионов. Примеры хелатообразующих групп, которые могут быть использованы по изобретению, включают, но без ограничения,

этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), DOTA, NOTA, NETA, порфирины, полиамины, краун-эфир, бис-тиосемикарбазоны, полиоксимы, DFO (дефероксамин-малеинимид) и тому подобные группы. Те же хелаты, находящиеся в комплексе с нерадиоактивными металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, могут быть использованы для МРТ. Макроциклические хелаты, такие как NOTA, DOTA и TETA, используют с различными металлами и радиоактивными металлами, включая, но без ограничения, радиоактивные изотопы галлия, иттрия и меди, соответственно. Могут быть использованы и другие хелаты кольцевого типа, такие как макроциклические полиэфиры, представляющие интерес для стабильного связывания нуклидов, например, ^{223}Ra для RAIT. В конкретных вариантах осуществления хелатообразующие фрагменты могут быть использованы для присоединения средства для ПЭТ-визуализации, такого как комплекс $\text{Al-}^{18}\text{F}$ или $\text{DFO-}^{89}\text{Zr}$, к направляющей молекуле для использования в ПЭТ-анализе. В предпочтительном варианте осуществления хелатообразующая группа представляет собой DFO. В более предпочтительном варианте осуществления конъюгат представляет собой Омотус-DFO- ^{89}Zr .

Ферменты, которые могут быть использованы в качестве детектируемых меток в вариантах осуществления изобретения, включают, но без ограничения, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, кислую фосфатазу, оксидазу глюкозы, β -галактозидазу, β -глюкоронидазу или β -лактамазу. Такие ферменты могут быть использованы в сочетании с хромогеном, флуорогеном или люминогеном для генерирования детектируемого сигнала.

Таким образом, термин «контрастные вещества» охватывает средства, используемые для улучшения качества изображения, которое, тем не менее, может быть получено в отсутствие такого средства (как в случае, например, МРТ), а также средства, которые необходимы для получения изображения (как в случае, например, радионуклидной визуализации). Подходящие контрастные вещества включают, без ограничения, контрастные вещества для радионуклидной визуализации, для компьютерной томографии, для рамановской спектроскопии, для магнитно-резонансной визуализации (МРТ) и для оптической визуализации.

В контексте настоящего изобретения контрастное вещество может быть частью конъюгата по изобретению, или может быть введено совместно с конъюгатом по изобретению для получения ядерных медицинских изображений, которые могут быть наложены, например, на изображения, полученные с помощью компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ), с целью получения специальных изображений, такая практика известна как совмещение или корегистрация изображений. Эти изображения позволяют соотносить и интерпретировать информацию, полученную в ходе двух различных обследований, на одном изображении, что позволяет получать более точную информацию и ставить точный диагноз. В конкретном варианте осуществления обнаружение конъюгата, меченого радионуклидом, и получение эталонного изображения

тела, или участка, проводят одновременно в однофотонной эмиссионной компьютерной томографии/компьютерной томографии (ОФЭКТ/КТ) и позитронно-эмиссионной томографии/компьютерной томографии (ПЭТ/КТ) или даже ПЭТ/МРТ, которые способны выполнять оба визуализирующих исследования одновременно.

Контрастные вещества для радионуклидной визуализации включают радиофармацевтические препараты, обычно меченные позитронными излучателями, такими как ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{82}Rb , ^{62}Cu и ^{68}Ga . Радиофармацевтические препараты для ОФЭКТ обычно метят такими позитронными излучателями, как ^{94}mTc , ^{201}Tl и ^{67}Ga . Радионуклидные методы визуализации (позитронно-эмиссионная томография, (ПЭТ); однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ)) представляют собой диагностические методы визуализации поперечного сечения, которые позволяют определять местоположение и концентрацию меченных радионуклидами индикаторов. ПЭТ и ОФЭКТ можно использовать для локализации и определения характеристик радионуклида. В ПЭТ радиоактивный конъюгат, испускающий позитроны, можно отслеживать по мере перемещения вещества в теле. С ПЭТ тесно связана однофотонная эмиссионная компьютерная томография, или ОФЭКТ. Основное различие между этими двумя методами заключается в том, что вместо вещества, испускающего позитроны, в ОФЭКТ используют радиоактивный индикатор, испускающий низкоэнергетические фотоны.

Контрастные вещества для компьютерной томографии включают, например, йодированные или бромированные контрастные вещества. Примеры таких средств включают йоталамат, йогексил, диатризоат, йопамидол, этиодол и йопаноат. Известно, что гадолиниевые средства также используют в качестве контрастного вещества для КТ. Например, гадопентат был использован в качестве контрастного вещества для КТ. Компьютерная томография (КТ) предусмотрена в качестве средства визуализации в контексте настоящего изобретения. Получение серии рентгеновских снимков, иногда более тысячи, под разными углами, с последующим объединением их при помощи компьютера, в КТ позволяет создавать трехмерное изображение любой части тела. Компьютер запрограммирован на отображение двухмерных срезов под любым углом и на любой глубине. При КТ непроницаемое для радиоизлучения контрастное вещество, подобное описанному в настоящем документе, может помочь идентифицировать и очерчивать образования из мягких тканей, когда первоначальные КТ-сканирования не дают диагностических результатов.

Контрастные вещества для оптической визуализации включают, например, флуоресцеин, производное флуоресцеина, индоцианиновый зеленый, орегоновый зеленый, производное орегонового зеленого, родаминовый зеленый, производное родаминового зеленого, эозин, эритрозин, тexasский красный, производное тexasского красного, малахитовый зеленый, сульфосукцинимидиловый эфир нанозолота, каскадный синий, производное кумарина, нафталин, производное пиридиллоксазола, каскадный желтый краситель, краситель дапоксил и различные другие флуоресцентные соединения,

раскрытые в настоящем документе.

В предпочтительном варианте осуществления контрастное вещество представляет собой соединение, которое может быть визуализировано аппаратом магнитно-резонансной томографии. Контрастные вещества, которые могут быть визуализированы с помощью аппарата магнитно-резонансной томографии, отличаются от тех, которые используют в других методах визуализации. Их цель - помогать различать компоненты ткани с одинаковыми характеристиками сигнала и сокращать время релаксации (что приведет к появлению более сильного сигнала на T1-взвешенных МР-изображениях со спин-эхо и менее интенсивного сигнала на T2-взвешенных изображениях). Примеры контрастных веществ для МРТ включают хелаты гадолиния, хелаты марганца, хелаты хрома и частицы железа. В одном конкретном варианте осуществления контрастное вещество для МРТ представляет собой ^{19}F . Как КТ, так и МРТ, предоставляют анатомическую информацию, которая помогает различать границы тканей. В сравнении с КТ, недостатки МРТ включают более низкую переносимость пациентами, противопоказания для кардиостимуляторов и некоторых других имплантированных металлических устройств, а также артефакты, связанные с множеством причин, не последней из которых является движение; КТ, с другой стороны, является быстрой, хорошо переносимой и легкодоступной, но имеет более низкое контрастное разрешение, чем МРТ, и требует йодированного контраста и ионизирующего излучения. Недостатком как КТ, так и МРТ, является то, что ни один из методов визуализации не предоставляет функциональную информацию на клеточном уровне. Например, ни один из методов не дает информации о жизнеспособности клеток. Магнитно-резонансная томография (МРТ) представляет собой более новый, чем КТ, метод визуализации, в котором для получения изображений используется магнит высокой силы и радиочастотные сигналы. Наиболее распространенным видом молекул в биологических тканях является вода. Это квантово-механический «спин» протонных ядер воды в конечном итоге приводит к появлению сигнала в экспериментах по визуализации. При МРТ образец, подлежащий визуализации, помещают в сильное статическое магнитное поле (1-12 Тесла), и спины возбуждаются импульсом радиочастотного (РЧ) излучения, создавая суммарную намагниченность в образце. Затем различные градиенты магнитного поля и другие РЧ импульсы воздействуют на спины, кодируя пространственную информацию в записанных сигналах. Собирая и анализируя эти сигналы, можно рассчитывать трехмерное изображение, которое, как и изображение КТ, обычно отображается в виде двухмерных срезов.

Контрастные вещества для МРТ включают комплексы металлов, выбранных из группы, состоящей из хрома (III), марганца (II), железа (III), железа (II), кобальта (II), никеля (II), меди (II), неодима (III), самария (III), иттербия (III), гадолиния (III), ванадия (II), тербия (III), диспрозия (III), гольмия (III) и эрбия (III). В предпочтительном варианте осуществления соединение, которое может быть визуализировано аппаратом магнитно-резонансной томографии, представляет собой соединение на основе гадолиния.

В настоящем документе термин «соединение на основе гадолиния» означает, при

использовании применительно к визуализации легких, любое содержащее гадолиний вещество, вводимое субъекту, которое приводит к внутрисосудистому усилению. В другом варианте осуществления содержащее гадолиний контрастное вещество выбрано из группы, состоящей из гадолиния, пентата гадолиния и гадодиамида.

Существует несколько форм конъюгации детектируемой метки с полипептидом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант. В конкретном варианте осуществления конъюгация будет выполнена с использованием малеимид-опосредованной методологии, то есть посредством связывания малеимида-DFO (или других хелатообразующих групп) с Омотус, или малеинимида-AF660 (или других флуорофоров) с Омотус, и последующей реакции малеимида с уникальным остатком цистеина на С-конце Омотус. Эту реакцию сочетания проводят с использованием стандартных методов малеинимидного мечения.

Данный этап химического мечения также можно выполнять с использованием других химических реагентов, таких как средства, связывающие за счет NHS- (для мечения через свободные амины) или дисульфидных связей, например.

Определение наличия, отсутствия, концентрации, локализации или специфического распределения конъюгата, используемого по изобретению, выполняют с использованием способа визуализации *in vivo*, такого как магнитно-резонансная томография (МРТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или микроПЭТ, компьютерная томография (КТ), комбинированного устройства для ПЭТ/КТ, охлаждаемого прибора с зарядовой связью (ПЗС), камеры оптической визуализации, оптической визуализации и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

В еще более предпочтительном варианте осуществления обнаружение раковых клеток после введения конъюгата выполняют с использованием мПЭТ/мКТ или ПЭТ/КТ; предпочтительно мПЭТ/мКТ.

Изобретение также относится к способам мультимодальной визуализации. Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам визуализации субъекта, или зоны в теле субъекта, с использованием множественных методов визуализации, включающих измерение множественных сигналов. В конкретных вариантах осуществления множественные сигналы возникают от одной метки на, или в, клетке. Как указано выше, любое средство визуализации, известное специалистам в данной области, можно использовать в данных вариантах осуществления настоящих способов визуализации.

Способы визуализации используют в любое время во время или после введения конъюгата. Например, исследования визуализации можно проводить во время введения конъюгата по изобретению, то есть, для помощи в направлении доставки в определенное место, или в любое время после этого.

Дополнительные способы визуализации можно использовать одновременно с первым способом визуализации или в любое время после использования первого способа

визуализации. Например, дополнительные способы визуализации можно использовать через примерно 1 секунду, примерно 1 час, примерно 1 день или в течение любого более длительного периода времени после завершения использования первого способа визуализации, или в любое время между этими указанными периодами. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения несколько способов визуализации используют одновременно, так что их начинают использовать в одно и то же время после введения конъюгата. Специалист в данной области знаком с применением различных способов визуализации, предусмотренных по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов визуализации одно и то же устройство визуализации используют для первого способа визуализации и второго способа визуализации. В других вариантах осуществления разные устройства визуализации используют для разных способов визуализации. Специалист в данной области знаком с устройствами визуализации, которые доступны для применения способов визуализации, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение относится к способам визуализации клеток с использованием одного или более способов визуализации. В некоторых вариантах осуществления конъюгат, используемый по изобретению, имеет детектируемую метку более, чем одного, вида или имеет несколько, одинаковых или разных, детектируемых меток, связанных с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 1, или с его функционально эквивалентным вариантом. В другом варианте осуществления конъюгат связан с единственной детектируемой меткой. В конкретных вариантах осуществления единственная детектируемая метка представляет собой мультимодальную детектируемую метку.

В предпочтительном варианте осуществления детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{123}I , ^{124}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , 154 -, ^{1581}Gd , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{186}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{223}Ra и ^{225}Ac . В более предпочтительном варианте осуществления радиоактивное вещество или радиоизотоп представляет собой ^{89}Zr .

В одном из вариантов осуществления данного аспекта изобретения конъюгат не содержит последовательность проникающего в клетку пептида. В другом варианте осуществления конъюгат не содержит химический фрагмент, способствующий поглощению клеткой полипептида с SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта. В другом варианте осуществления конъюгата по изобретению конъюгат не содержит флуоресцентную метку или радиоизотоп, более предпочтительно, конъюгат не содержит флуоресцеин-малеинимид (FITC) или радиоизотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{125}I и ^{111}In . В другом варианте осуществления конъюгат по изобретению не содержит последовательность проникающего в клетку пептида, флуоресцентную метку или радиоизотоп, более предпочтительно, не содержит флуоресцеин-малеинимид (FITC) или радиоизотоп, выбранный из группы,

состоящей из ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{125}I и ^{111}In .

В другом варианте осуществления конъюгат по изобретению не содержит флуоресцентные группы, биотин, ПЭГ, аминокислотные аналоги, неприродные аминокислоты, фосфатные группы, гликозильные группы, радиоизотопные метки, другие метки, например, гистидиновую метку, Arg-метку, FLAG-метку, Strep-метку, эпитоп, узнаваемый антителом, например, с-тус-метку, HA-метку, V5-метку, SBP-метку, S-метку, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлоза-связывающий домен, хитин-связывающий домен, глутатион-S-трансферазную метку, мальтоза-связывающий белок, NusA, TrxA, DsbA, Avi-метку, аминокислотную последовательность, такую как ANGHRP (SEQ ID NO: 63) или PINDHDNPHLVINSGMTCXXC (SEQ ID NO: 64), или β -галактозидазу и тому подобное.

В настоящем документе термины «диагностика» или «обнаружение» используются взаимозаменяемо и означают определение наличия или характеристик патологического состояния. Используемый в настоящем документе термин «диагностика» означает как процесс попытки определения и/или идентификации возможного заболевания у субъекта, то есть, диагностическую процедуру, так и мнение, возникающее вследствие данного процесса, то есть, диагностическое мнение. Следовательно, его также можно рассматривать как попытку классификации состояния индивидуума на отдельные четкие категории, что позволяет принимать медицинские решения о лечении и прогнозе. Как понятно специалисту в данной области, такая диагностика может не быть на 100% точной для субъекта, для которого проводят диагностику, хотя предпочтительно она является точной. Термин, однако, требует, чтобы статистически значимую часть субъектов можно было идентифицировать как страдающих от заболевания, в частности, пролиферативного заболевания, в контексте изобретения. Квалифицированный специалист в данной области способен определять, является ли часть статистически значимой, с использованием разных хорошо известных инструментов статистической оценки, например, путем определения доверительных интервалов, определения р-значения, использования критерия Стьюдента, Манна-Уитни и так далее. Предпочтительные доверительные интервалы составляют по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. р-значения предпочтительно составляют 0,05, 0,025, 0,001 или ниже.

В одном из вариантов осуществления способ диагностики включает:

- а) внутрилегочное введение субъекту конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку, и
- б) обнаружение опухоли легких у указанного пациента путем наблюдения детектируемой метки.

Выражение «способ диагностики» по настоящему изобретению означает, что способ может в основном состоять из вышеуказанных этапов или может включать дополнительные этапы.

Используемое в настоящем документе выражение «in vivo диагностика» означает способ диагностики, используемый применительно к телу человека или животного.

Для целей настоящего изобретения диагностика предназначена для выявления наличия рака легких.

Термины «рак легких» или «опухоль легких» означают физиологическое состояние у млекопитающих, характеризующееся нерегулируемым ростом клеток в тканях легкого. Термин «рак легких» должен относиться к любому раку легких, и охватывает немелкоклеточную карциному легких и мелкоклеточную карциному легких. В одном из вариантов осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких (НМРЛ). В другом варианте осуществления рак легких представляет собой мелкоклеточный рак легких (МРЛ).

Используемый в настоящем документе термин «немелкоклеточный рак легких (НМРЛ)» относится к группе гетерогенных заболеваний, сгруппированных вместе, поскольку их прогноз и лечение примерно одинаковы, и охватывает, согласно гистологической классификации Всемирной организации здравоохранения/Международной ассоциации по изучению рака легких (Travis WD et al. *Histological typing of lung and pleural tumours*. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999) следующие виды:

(i) плоскоклеточная карцинома (ПКК), на долю которой приходится от 30% до 40% НМРЛ, начинается в крупных трахеях, но растет медленнее, это означает, что размер этих опухолей варьируется при диагностике;

(ii) аденокарцинома является наиболее распространенным подтипом НМРЛ, на долю которого приходится от 50% до 60% НМРЛ, она начинается вблизи газообменной поверхности легкого и включает подтип, бронхиолоальвеолярную карциному, которая может по-разному реагировать на лечение;

(iii) крупноклеточная карцинома представляет собой быстрорастущую форму, которая растет у поверхности легкого. В основном ее диагностируют методом исключения, и при проведении дополнительных исследований ее обычно переводят в категорию плоскоклеточной карциномы или аденокарциномы;

(iv) аденосквамозная карцинома представляет собой вид рака, который содержит два типа клеток: сквамозные клетки (тонкие, плоские клетки, выстилающие некоторые органы) и железистые клетки;

(v) карциномы с плеоморфными, саркоматоидными или саркоматозными элементами. Это группа редких опухолей, отражающая континуум в гистологической гетерогенности, а также эпителиальной и мезенхимальной дифференциации;

(vi) карциноидная опухоль представляет собой медленно растущую нейроэндокринную опухоль легкого, начинающуюся в клетках, способных выделять гормон в ответ на стимул, подаваемый нервной системой;

(vii) карциномы типа опухоли слюнных желез начинаются в клетках слюнных желез, расположенных внутри крупных дыхательных путей легкого;

(viii) неклассифицированные карциномы включают раковые опухоли, которые не подходят ни под одну из вышеупомянутых категорий рака легких.

Используемый в настоящем документе термин «субъект», или «пациент», относится ко всем животным, классифицируемым как млекопитающие, и охватывает, но не ограничивается ими, домашних и сельскохозяйственных животных, приматов и людей, например, людей, не являющихся людьми приматов, коров, лошадей, свиней, овец, коз, собак, кошек или грызунов. Предпочтительно, субъектом является человек - мужчина или женщина любого возраста или расы.

Используемый в настоящем документе термин «первичная опухоль» относится к опухоли, которая возникла в том участке тела или органе, в котором она находится, и не метастазировала в этот участок из другого участка.

В контексте настоящего изобретения «метастаз» означает распространение раковой опухоли из органа, где она возникла, в другой орган. Обычно это происходит через кровеносную или лимфатическую систему. Когда раковые клетки распространяются и образуют новую опухоль, последняя называется вторичной или метастатической. Раковые клетки, образующие вторичную опухоль, похожи на клетки первоначальной опухоли. Если, например, рак молочной железы распространяется (метастазирует) в легкое, вторичная опухоль формируется из злокачественных клеток рака молочной железы. Болезнь в легком представляет собой метастатический рак молочной железы, а не рак легкого.

В конкретном варианте осуществления НМРЛ выбран из плоскоклеточной карциномы легких, крупноклеточной карциномы легких и аденокарциномы легких.

В еще более предпочтительном варианте осуществления рак легких представляет собой аденокарциному.

В еще более предпочтительном варианте осуществления аденокарцинома легких представляет собой аденокарциному с мутацией KRAS.

«KRAS» означает белок-гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстен (KRAS). В случае НМРЛ мутации KRAS имеют место преимущественно (95%) в кодонах 12 (>80%) и 13. Наиболее часто встречающимся вариантом кодона, на долю которого приходится примерно 39% НМРЛ с мутациями KRAS, является мутация KRAS-G12C. Другие распространенные мутации включают варианты KRAS-G12V (18-21%) и KRAS-G12D (17-18%). Примечательно, что курильщики и никогда не курившие имеют различный спектр мутаций и вариантов кодонов в KRAS. Так, мутации транзиции (G > A) чаще встречаются у никогда не куривших, в то время как мутации трансверсии (G > C или G > T) чаще встречаются у бывших или актуальных курильщиков. В предпочтительном варианте осуществления аденокарцинома с мутациями KRAS имеет мутацию KRAS-G12D.

Используемый в настоящем документе термин «мелкоклеточный рак легких (МРЛ)» означает пролиферацию мелких клеток с уникальными и четкими морфологическими особенностями, содержащих плотные нейросекреторные гранулы,

которые придают этой опухоли характер эндокринного/паранеопластического синдрома. В большинстве случаев он возникает в крупных дыхательных путях (первичных и вторичных бронхах). Раковые опухоли этих видов быстро растут и распространяются на ранних стадиях заболевания.

В другом варианте осуществления рак, диагностируемый при помощи конъюгата, используемого по изобретению, представляет собой метастаз рака.

Введение конъюгата по изобретению представляет собой внутрилегочное введение.

Термин «внутрилегочное введение» относится к любому способу введения, который обеспечивает доставку фармацевтически активной субстанции к поверхности легких. Способы доставки могут включать, но без ограничения, доставку в виде жидкой суспензии, в виде сухой порошковой «пыли» или в виде аэрозоля.

Термин «транспорт через легочную поверхность» означает любой способ прохождения, при котором происходит проникновение или вхождение через внутреннюю легочную поверхность. Это включает прохождение через любую легочную поверхность, включая альвеолярные поверхности, бронхиолярные поверхности, а также прохождение между любыми из этих поверхностей. Предпочтительно, прохождение происходит через альвеолярные поверхности. Наиболее предпочтительно, прохождение происходит через клетки II типа на альвеолярных поверхностях. Прохождение может осуществляться либо непосредственно в легочные ткани для местного действия, либо через легочные ткани в кровеносную систему для системного действия.

В конкретном варианте осуществления конъюгат, используемый по изобретению, вводят интраназально.

В еще более предпочтительном варианте осуществления интраназальное введение происходит путем инстилляций.

В конкретном варианте осуществления конъюгат, используемый по изобретению, вводят путем назальной инстилляций, назальной ингаляции или пероральной ингаляции; предпочтительно путем назальной инстилляций или назальной ингаляции; более предпочтительно путем назальной инстилляций.

Термин «инстиляция» охватывает любую систему доставки, способную доставлять эффективное количество конъюгата, используемого по изобретению, в носовые ходы млекопитающих. Репрезентативные и неограничивающие форматы включают капли, спреи, порошки, аэрозоли, мелкодисперсные аэрозоли, катетеры, тубики, шприцы, аппликаторы для кремов, частицы, гранулы и тому подобное.

Изобретение можно осуществлять на практике с различными растворителями и/или носителями для назальной доставки. Такие растворители увеличивают период полураспада конъюгата в носовой полости после введения в носовую полость. К таким носителям относятся природные полимеры, полусинтетические полимеры, синтетические полимеры, липосомы и полутвердые лекарственные формы. К природным полимерам относятся, например, белки и полисахариды. Полусинтетические полимеры представляют собой модифицированные природные полимеры, такие как хитозан, который является

деацетилированной формой природного полисахарида хитина. Синтетические полимеры включают, например, дендримеры, полифосфоэферы, полиэтиленгликоль, поли(молочную кислоту), полистиролсульфонат (PSSA) и поли(лактид-когликолид). Полутвердые лекарственные формы включают, например, кремы, мази, гели и лосьоны. Эти носители также могут быть использованы для микроинкапсулирования конъюгата или быть ковалентно связаны с конъюгатом.

В одном варианте осуществления конъюгат, используемый по изобретению, включает, либо ковалентно или нековалентно связан с частицами-носителями, которые могут быть сформулированы в виде порошка, спрея, аэрозоля, крема, геля, и так далее, для нанесения на носовые ходы. В одном варианте осуществления конъюгат нанесен на ядро частицы-носителя в растворимой пленке, которая может включать мукоадгезив. Ядро частиц носителя может быть инертным или растворимым.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, используемый по изобретению, наряду с фармацевтически приемлемым носителем, который может представлять собой, например, порошок, крем или жидкость. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные жидкости, такие как вода, масла, включая нефтяное масло, животное масло, растительное масло, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Подходящие фармацевтические носители описаны в сборнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (56), который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Лекарственные формы композиций, предназначенные для интраназального и внутрилегочного введения, предпочтительно представляют собой жидкость, суспензию или твердое вещество. Суспензия представляет собой жидкий препарат, содержащий твердые частицы, диспергированные в жидкой среде. Лекарственные формы предпочтительно являются дозированными. Например, дозированные капли/спреи означают, что раздаточное устройство, заключающее в себе капли/спреи, доставляет капли/спреи, содержащие отмеренную дозу (заранее определенное количество) конъюгата, используемого по изобретению.

Одна предпочтительная лекарственная форма в контексте интраназального пути введения включает назальные капли. Капли оседают в основном в задней части носа и, таким образом, быстро поступают в носоглотку. При использовании капель часто возникает проблема точного контроля дозы лекарственного средства, что особенно важно при введении конъюгата.

Другой интраназальной лекарственной формой, с помощью которой можно вводить конъюгат, используемый по изобретению, являются назальные спреи. Назальные спреи обычно содержат конъюгат, растворенный или суспендированный в растворе или смеси эксципиентов (например, консервантов, модификаторов вязкости, эмульгаторов, буферных средств), в дозаторе под атмосферным давлением. Назальные спреи имеют ряд преимуществ, включая компактность устройства доставки, удобство, простоту использования и точность доставки доз от 25 до 200 пл. Дозы оседают в передней части

носа и медленно выводятся в носоглотку за счет мукоцилиарного клиренса. Назальный спрей, описанный в настоящем документе, может представлять собой жидкость или суспензию.

Другой интраназальной лекарственной формой является назальный аэрозоль. Назальные аэрозоли отличаются от назальных спреев методом дозирования конъюгата: в аэрозолях соединение дозируется за счет избыточного давления и выпускается через клапан. В спреях соединение дозируется за счет вытеснения микронасосом, в то время как давление во флаконе аналогично атмосферному. Аэрозоли имеют те же преимущества, что и спреи.

Альтернативно, конъюгат, используемый по изобретению, можно предпочтительно вводить в виде назальных эмульсий, мазей, гелей, паст или кремов. Они представляют собой высоковязкие растворы или суспензии, наносимые на слизистую оболочку носа.

Вследствие ограниченного объема композиции, который может быть эффективно доставлен на слизистую оболочку носа, жидкие интраназальные лекарственные формы, как правило, имеют более высокие концентрации, чем соответствующие внутривенные лекарственные формы. Когда вещества становятся плохо растворимыми или нестабильными в жидкой форме, для введения конъюгата по изобретению можно использовать порошки. Дополнительные преимущества порошков заключаются в том, что они не требуют консервантов и, как правило, обладают более высокой стабильностью в сравнении с жидкими препаратами. Основное ограничение для интраназального применения порошка связано с его раздражающим действием на слизистую оболочку носа.

Одной из лекарственных форм в контексте внутрилегочного введения является ингаляционный аэрозоль. Аэрозоли для ингаляций, как правило, упакованы под давлением и содержат конъюгат, используемый по изобретению, который высвобождается при активации клапанной системы в дыхательные пути, в частности, в легкие. Выпущенный аэрозоль представляет собой коллоид мелких твердых частиц (суспензия) или капель жидкости (раствор) в воздухе или другом газе. Соответственно, аэрозоль может представлять собой аэрозоль раствора или суспензии. Капли жидкости или твердые частицы предпочтительно имеют диаметр менее 100 мкм, более предпочтительно менее 10 мкм, наиболее предпочтительно менее 1 мкм.

Другой лекарственной формой в контексте внутрилегочного введения являются ингаляционные спреи. Ингаляционные спреи, как правило, имеют водную основу и не содержат пропеллент. Они доставляют конъюгат в легкие путем пероральной ингаляции.

Для доставки конъюгата внутрилегочным путем можно также использовать небулизированные ингаляционные растворы и суспензии. Небулизированные ингаляционные растворы и суспензии, как правило, представляют собой препараты на водной основе, содержащие конъюгат, используемый по изобретению. Небулизированные ингаляционные растворы и суспензии доставляют конъюгат в легкие путем пероральной ингаляции для системного воздействия и используются при помощи небулайзера.

Ингаляция сухого порошка является альтернативой аэрозольной ингаляции. Конъюгат, как правило, заключен в капсуле для ручной загрузки или в ингаляторе. Сухие порошки, как правило, доставляются ингалятором в легкие путем пероральной ингаляции. Сухие порошки, используемые по настоящему изобретению, могут быть сформулированы в чистом виде. Чистые препараты содержат исключительно, или почти исключительно, лекарственное средство, например, в виде высушенного порошка. Сухие порошки, используемые по настоящему изобретению, также могут быть сформулированы с носителем, таким как лактоза.

Внутрилегочные лекарственные формы предпочтительно являются дозированными, то есть, доставляются в легкие в заранее определенном количестве.

Дозы активных ингредиентов могут быть выражены либо в мг активного ингредиента на кг массы тела, либо в мг активного ингредиента на квадратный метр поверхности тела. В публикации Reagan-Shaw S. «Dose translation from animal to human studies revisited». FASEB J 2007, 22:659-661 приведены стандартные коэффициенты пересчета, используемые для перевода мг/кг в мг/м².

$$\text{Доза (мг/кг)} \times K_m = \text{Доза (мг/м}^2\text{)}$$

Данное преобразование является основой для преобразования дозы для первого вида животных в дозу для второго вида животных (аллометрический перевод дозы). Таким образом, доза для животных (AD) в мг/кг может быть преобразована в эквивалентную дозу для человека (HED) в мг/кг по следующей формуле:

$$\text{HED (мг/кг)} = \text{AD (мг/кг)} \times \frac{K_m \text{ животного}}{K_m \text{ человека}}$$

где K_m для каждого из видов приведены в Таблице 1.

Таблица 1 □ K_m фактор преобразования AD в HED		
Вид	K_m фактор	
Человек	Взрослый	37
	Ребенок	25
Бабуин		20
Собака		20
Обезьяна		12
Кролик		12
Морская свинка		8
Крыса		6
Хомяк		5
Мышь		3

В частности, дозы, упомянутые в настоящем документе, могут быть адаптированы

для любого млекопитающего в соответствии с рекомендациями FDA по пересчету доз на основании площади поверхности тела (Guidance for Industry, Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 2005, смотри Таблицу 1).

В предпочтительном варианте осуществления доза конъюгата, используемого по изобретению, находится в диапазоне от 0,5 до 10 мг/кг, более предпочтительно от 1 до 5 мг/кг, и более предпочтительно от 2 до 3 мг/кг. В предпочтительном варианте осуществления доза конъюгата составляет $2,37 \pm 0,5$ мг/кг, предпочтительно 2 мг/кг, более предпочтительно 2,37 мг/кг. В другом предпочтительном варианте осуществления доза конъюгата, используемого по изобретению, находится в диапазоне от 0,04 до 0,8 мг/кг, более предпочтительно от 0,08 до 0,4 мг/кг, и более предпочтительно от 0,16 до 0,24 мг/кг. В предпочтительном варианте осуществления доза конъюгата составляет $0,19 \pm 0,5$ мг/кг, предпочтительно 0,16 мг/кг, более предпочтительно 0,19 мг/кг. Альтернативно, доза конъюгата, используемого по изобретению, находится в диапазоне от 1,48 до 30 мг/м², более предпочтительно от 3 до 14,8 мг/м², и более предпочтительно от 5,9 до 8,8 мг/м². В предпочтительном варианте осуществления доза конъюгата составляет $7 \pm 0,5$ мг/м², предпочтительно 5,92 мг/м², более предпочтительно 7,03 мг/м².

В предпочтительном варианте осуществления обнаружение конъюгата проводят через период времени от 30 минут до 96 часов после введения конъюгата субъекту, который нуждается в этом, предпочтительно от 30 минут до 48 часов. В одном из вариантов осуществления обнаружение конъюгата проводят через по меньшей мере 30 минут, по меньшей мере 1 час, по меньшей мере 2 часа, по меньшей мере 3 часа, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 5 часов, по меньшей мере 6 часов, по меньшей мере 7 часов, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 9 часов, по меньшей мере 10 часов, по меньшей мере 11 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 13 часов, по меньшей мере 14 часов, по меньшей мере 15 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 17 часов, по меньшей мере 18 часов, по меньшей мере 19 часов, по меньшей мере 20 часов, по меньшей мере 21 час, по меньшей мере 22 часа, по меньшей мере 23 часа, по меньшей мере 24 часа, по меньшей мере 25 часов, по меньшей мере 26 часов, по меньшей мере 27 часов, по меньшей мере 28 часов, по меньшей мере 29 часов, по меньшей мере 30 часов, по меньшей мере 35 часов, по меньшей мере 40 часов, по меньшей мере 45 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 54 часа, по меньшей мере 60 часов, по меньшей мере 66 часов, по меньшей мере 72 часа, по меньшей мере 78 часов, по меньшей мере 84 часа, по меньшей мере 90 часов, по меньшей мере 96 часов после введения конъюгата субъекту, который нуждается в этом. В предпочтительном варианте осуществления обнаружение конъюгата проводят через период времени, выбранный из 30 минут, 1 часа, 4 часов, 24 часов и 48 часов после введения, предпочтительно после интраназального введения.

В предпочтительном варианте осуществления после этапа диагностики конъюгат

вводят по меньшей мере еще один раз для мониторинга прогрессирования рака легких или эффекта терапии, используемой для субъекта, страдающего от рака легких.

В контексте настоящего изобретения «мониторинг прогрессирования рака легких» означает определение уменьшения или увеличения размера и/или распространения рака легких в сравнении с предыдущим определением.

В контексте настоящего изобретения «мониторинг эффекта терапии, используемой для субъекта» означает выяснение того, привела ли терапия, используемая для субъекта, страдающего от рака легких, к уменьшению размера и/или распространения рака легких, и, следовательно, является ли она эффективной; или того, имеет ли место увеличение, или отсутствие уменьшения, размера и/или распространения рака легких, и, следовательно, является ли она неэффективной. Виды терапии, используемые для лечения рака легких, хорошо известны специалистам в данной области.

В другом аспекте изобретение относится к применению полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, для получения диагностического средства.

В другом аспекте изобретение относится к применению конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку, для получения диагностического средства.

Способы диагностики и обнаружения по изобретению

В другом аспекте изобретение относится к способу диагностики для обнаружения опухоли легких у субъекта, включающему:

- i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,
- ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки,
- iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации, и
- iv) определение наличия опухоли легких в случае обнаружения специфической метки.

В другом аспекте изобретение относится к способу диагностики и лечения субъекта, предположительно имеющего рак легких, включающему:

- i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,
- ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки,

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации, и

iv) определение наличия опухоли легких в случае обнаружения специфической метки, и

v) использование для субъекта, у которого обнаружен рак легких, лечения, выбранного из хирургического удаления опухоли легких и/или применения химиотерапии и/или лучевой терапии.

Используемый в настоящем документе термин «лечение», или «терапия», означает введение терапевтического средства для контроля прогрессирования заболевания до или после появления клинических признаков. Контроль прогрессирования заболевания понимают как благоприятные или желаемые клинические результаты, которые включают, но без ограничения, уменьшение симптомов, сокращение продолжительности заболевания, стабилизацию патологического состояния (в частности, предотвращение дополнительного ухудшения), задержку прогрессирования заболевания, улучшение патологического состояния и ремиссию (как частичную, так и полную). Контроль прогрессирования заболевания также подразумевает продление срока выживания в сравнении с ожидаемым сроком выживания без применения лечения.

Используемое в настоящем документе выражение «участок накопления конъюгата» означает участок, в котором Ототус, или его функционально эквивалентный вариант, находится после внутрилегочного введения. Визуализация участка накопления достигается с помощью метки, входящей в состав конъюгата.

Используемое в настоящем документе выражение «участок пролиферации» означает участок, где находится рак, то есть, участок, где находятся пролиферирующие клетки.

Используемое в настоящем документе выражение «хирургическое удаление» означает хирургическое удаление ткани рака легких и некоторого количества окружающей ткани. Легкое может быть полностью или частично удалено. Двумя распространенными подходами к удалению части легкого являются торакотомия и минимально инвазивная хирургическая операция. Примерами хирургического удаления легкого у пациентов, страдающих от рака, являются, без ограничения, лобэктомия, сегментэктомия, клиновидная резекция или пневмонэктомия.

Термин «химиотерапия» означает использование лекарственных средств для уничтожения раковых клеток. Лекарственные средства, как правило, вводят пероральным или внутривенным путем. Иногда химиотерапию используют совместно с лучевой терапией. Химиотерапия означает лечение антинеопластическим лекарственным средством, используемым для лечения рака, или сочетанием из более чем одного из этих лекарственных средств в стандартизированном режиме цитотоксического лечения. В контексте настоящего изобретения термин «химиотерапия» предполагает использование

любого антинеопластического средства, включая малые органические молекулы, пептиды, олигонуклеотиды и тому подобное, такие как те, которые используют для лечения рака легких, а также связанных процессов, таких как ангиогенез или метастазирование. Соответствующие химиотерапевтические средства включают, но не ограничиваются ими, алкилирующие средства [например, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, BBR3464, хлорамбуцил, хлорметин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, кармустин, фотемустин, ломустин, стрептозоцин, бусульфан, дакарбазин, мехлорэтамин, прокарбазин, темозоломид, тиоТПА, урамустин и так далее]; антиметаболиты [например, пуриновые (азатиоприн, меркаптопурин), пиримидиновые (капецитабин, цитарабин, флуороурацил, гемцитабин), фолиевую кислоту (метотрексат, пеметрексед, ралтитрексед) и так далее]; алкалоиды барвинка [например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин и так далее]; таксаны [например, паклитаксел, доцетаксел, BMS-247550 и так далее]; антрациклины [например, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон, вальрубицин, блеомицин, гидроксимочевину, митомицин и так далее]; ингибиторы топоизомеразы [например, топотекан, иринотекан, этопозид, тенипозид и так далее]; моноклональные антитела [например, алектумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, гемтузумаб, панитумумаб, ритуксимаб, трастузумаб и так далее]; фотосенсибилизаторы [например, аминолевулиновую кислоту, метиламинолевулинат, порфимер натрия, вертепорфин и так далее]; ингибиторы тирозинкиназы [например, иматиниб]; ингибиторы рецепторов эпидермального фактора роста [например, эрлотиниб, гефитиниб и так далее]; ингибиторы ФПТазы [например, FTI (RI 15777, SCH66336, L-778, 123) и так далее]; ингибиторы KDR [например, SU6668, PTK787 и так далее]; ингибиторы протеасомы [например, PS341 и так далее]; ингибиторы синтеза ТС/ДНК [например, ZD9331, ралтитрексед (ZD 1694, томудекс), ZD9331, 5-FU и так далее]; ингибиторы S-аденозил-метионин-декарбоксилазы [например, SAM468A и так далее]; средства, метилирующие ДНК [например, TMZ и так далее]; ДНК-связывающие средства [например, PZA и так далее]; средства, которые связывают и инактивируют O-6-алкилгуанин АГТ [например, BG]; с-га/-I антисмысловые олигодезоксинуклеотиды [например, ISIS-5132 (CGP-69846A)]; средства иммунотерапии опухолей; стероидные и/или нестероидные противовоспалительные средства [например, кортикостероиды, ингибиторы COX-2]; ингибиторы иммунных контрольных точек (ингибиторы PD-L1, такие как атезолизумаб или дурвалумаб; или ингибиторы PD-1, такие как ниволумаб, пембролизумаб; или ингибиторы CTLA-4, такие как ипилимумаб); или другие средства, такие как алитретиноин, альтретамин, амсакрин, анагрелид, триоксид мышьяка, аспарагиназа, бексаротин, бортезомиб, целекоксиб, дазатиниб, денилейкин дифтитокс, эстрамустин, гидроксикарбамид, иматиниб, пентостатин, мазопрокол, митоган, пегаспаргаза и третиноин.

Соединения на основе платины особенно подходят для лечения рака легких, включая, без ограничения, карбоплатин, цисплатин [цис-диамминдихлороплатин, (CDDP)], оксалиплатин, ипроплатин, недаплатин, триплатин тетранитрат, тетраплатин,

сатраплатин (JM216), JM118 [цис-амминдихлоро (II)], JM149 [цис-амминдихлоро(циклогексиламин) транс-дигидроксоплатину (IV)], JM335 [транс-амминдихлордигидроксоплатину (IV)], трансплатин, ZD0473, цис, транс, цис- $\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}_2)(\text{OOCCH}_2\text{CH}_2)_2\text{Cl}$, маланат-1,2-диаминоциклогексаноплатину (II), 5-сульфосалицилат-транс-(1,2-диаминоциклогексан)платину (II) (SSP), поли-[(транс-1,2-диаминоциклогексан)платина]-карбоксамилосу (POLY-PLAT) и 4-гидроксисульфонилфенилацетат(транс-1,2-диаминоциклогексан)платину (II) (SAP), и тому подобные. В конкретном варианте осуществления соединение на основе платины выбрано из карбоплатина, цисплатина и оксалиплатина; предпочтительно представляет собой цисплатин.

Соответствующие комбинации для лечения рака легких, в частности НМРЛ, могут представлять собой, без ограничения, соединение на основе платины и ингибитор митоза (например, цисплатин-паклитаксел, цисплатин-доцетаксел (режим CI-TA), карбоплатин-паклитаксел, карбоплатин-доцетаксел, оксалиплатин-паклитаксел, цисплатин-винорелбин, карбоплатин-винорелбин, цисплатин-виндезин, оксалиплатин-винорелбин); соединение на основе платины и антиметаболит (например, цисплатин-гемцитабин, карбоплатин-гемцитабин, оксалиплатин-гемцитабин); соединение на основе платины, ингибитор митоза и анти-VEGF лекарственное средство (например, цисплатин-доцетаксел-бевацизумаб); соединение на основе платины, антиметаболит и анти-VEGF лекарственное средство (например, цисплатин-гемцитабин-бевацизумаб). Другими подходящими комбинациями являются цисплатин-этопозид, карбоплатин-этопозид, цисплатин-тенипозид, цисплатин-виндезин, цисплатин-тирапазамин, ZD0473-винорелбин, ZD0473-паклитаксел, ZD0473-гемцитабин, цисплатин-этопозид-митомицин С, цисплатин-паклитаксел-гемцитабин, цисплатин-доксорубицин-5-фторурацил (AFP), цисплатин-циклофосфамид-блеомицин (CBP), цисплатин-виндезин-митомицин С (MVP), циклофосфамид-доксорубицин-цисплатин (CISCA), цисплатин-адриамицин (CA), цисплатин-фторурацил (CF), цисплатин-гемцитабин-винорелбин (режим CGV) и паклитаксел, затем цисплатин-гемцитабин-винорелбин (режим T-CGV).

В предпочтительном варианте осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой Омотус, в частности, представляет собой полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, предпочтительно, раскрытый в контексте первого аспекта изобретения или раскрытый в патентных заявках WO 2014/180889 A1 и WO 2018/011433 A1.

Термин «лучевая терапия» означает терапию, при которой используют излучение, способное разрушать быстро делящиеся клетки или облегчать симптомы. Для пациента можно использовать любой вид излучения при условии, что доза излучения переносится пациентом без неприемлемых негативных побочных эффектов. Подходящие виды лучевой терапии включают, например, ионизирующую (электромагнитную) лучевую терапию (например, рентгеновские или гамма-лучи) или лучевую терапию пучком частиц (например, излучение высокой линейной энергии).

В другом аспекте изобретение относится к способу обнаружения или визуализации клеток рака легких у субъекта, включающему:

i) интраназальное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки,

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации.

«Обнаружение» означает определение наличия, отсутствия или количества аналита в образце, и может включать количественное определение аналита в образце или в расчете на клетку в образце.

В другом аспекте изобретение относится к способу визуализации рака легких с использованием конъюгата, включающего:

i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и

ii) детектируемую метку,

где указанный конъюгат вводят внутрилегочным путем.

Все варианты осуществления, раскрытые в контексте диагностического применения по изобретению, также применимы к способам диагностики и обнаружения по изобретению.

Применение конъюгата по изобретению для мониторинга

В другом аспекте изобретение относится к способу мониторинга прогрессирования рака легких у субъекта, включающему:

i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку;

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки; и

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации;

iv) сравнение участка накопления, обнаруженного на этапе iii), с участком накопления, обнаруженным при предыдущем измерении,

где значительное уменьшение или отсутствие изменения участка накопления в сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что рак легких не прогрессирует, или

где значительное увеличение участка накопления в сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что рак легких прогрессирует.

Используемое в настоящем документе выражение «мониторинг прогрессирования рака легких» означает определение прогрессирования заболевания или предсказание вероятного течения и исхода клинического состояния или заболевания у пациента, у которого диагностирован рак легких (например, ухудшение, частичное выздоровление или полное выздоровление). Прогноз для пациента обычно определяют путем оценки факторов или симптомов заболевания, которые указывают на благоприятное или неблагоприятное течение, или исход, заболевания. Понятно, что термин «прогноз» не обязательно означает способность предсказывать течение, или исход, состояния с 100% точностью. Напротив, квалифицированный специалист понимает, что термин «прогноз» означает повышенную вероятность того, что определенное течение, или исход, будет иметь место. В контексте изобретения мониторинг прогрессирования рака легких означает использование визуализации для оценки того, уменьшается ли в размерах опухоль легких, или растет.

В данном аспекте участок накопления конъюгата по изобретению в первый период времени (первый образец от субъекта) и участок накопления во второй период времени (второй образец от субъекта) сравнивают, что позволяет проводить мониторинг прогрессирования рака легких. Второй образец от субъекта может быть получен от того же субъекта, имеющего рак легких, от которого был получен первый образец, во второй период времени, то есть, в любой момент времени после первого периода времени, например, через один день, одну неделю, один месяц, 2 месяца, 3 месяца, 1 год, 2 года, или более, после получения первого образца от субъекта.

В конкретном варианте осуществления первый образец от субъекта собирают до того, как субъект получает лечение, например, химиотерапию, лучевую терапию или хирургическую операцию, и второй образец от субъекта собирают после лечения. В другом конкретном варианте осуществления первый образец от субъекта собирают после того, как субъект начал/получил лечение, например, химиотерапию, лучевую терапию или хирургическую операцию, и второй образец от субъекта собирают позже, в разные периоды времени на протяжении курса лечения. Следовательно, если рак легких прогрессирует или имеет плохой прогноз, для лечения указанного заболевания у указанного субъекта должна быть разработана дополнительная терапия.

Способы получения изображения, позволяющего локализовать участок накопления конъюгата, и способы количественной оценки участка накопления или расчета размеров или массы опухоли, известны специалисту в данной области. Количество конъюгата, накопившегося в участке опухоли после внутривенного введения конъюгата, будет свидетельствовать о размере опухоли. Сравнение такого накопления с течением времени при последовательных сканированиях, проводимых для одного и того же пациента, коррелирует с прогрессированием заболевания.

После измерения участка накопления в образцах от субъекта в разные периоды

времени (первом и втором образцах от субъекта) необходимо определить, имеет ли место значительное увеличение, уменьшение или отсутствие изменения в участке накопления во втором образце от субъекта в сравнении с участком накопления в первом образце от субъекта. Это выполняют путем сравнения первого участка накопления и второго участка накопления.

В контексте настоящего изобретения уменьшение участка накопления во втором образце от субъекта, для которого проводят исследование, считают значительным уменьшением относительно участка накопления в первом образце от субъекта, если участок накопления во втором образце от субъекта уменьшается относительно первого образца от субъекта на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 100% (то есть, отсутствует).

В контексте настоящего изобретения увеличение участка накопления во втором образце от субъекта, для которого проводят исследование, считают значительным увеличением относительно участка накопления в первом образце от субъекта, если участок накопления во втором образце от субъекта увеличивается относительно первого образца от субъекта на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 130%, по меньшей мере 140%, по меньшей мере 150% или более.

Аналогично, считают, что имеет место отсутствие изменения участка накопления во втором образце от субъекта, для которого проводят исследование, относительно первого образца от субъекта, если участок накопления во втором образце от субъекта указывает на то, что участок накопления остается практически постоянным между двумя измерениями. В качестве примера, накопление является постоянным, если результат первого измерения составляет не более 105%, не более 104%, не более 103%, не более 102%, не более 101%, не менее 99%, не менее 98%, не менее 97%, не менее 97%, не менее 96% или не менее 95%.

Таким образом, значительное увеличение во втором образце от субъекта относительно первого образца от субъекта указывает на то, что рак легких прогрессирует (то есть, он имеет плохой прогноз); следовательно, терапия, используемая для субъекта, для которого проводят исследование, должна быть изменена, и должна быть разработана новая терапия для лечения рака легких у указанного субъекта. Напротив, если отсутствует

значительное увеличение во втором образце от субъекта относительно первого образца от субъекта, или даже если достигнуто значительное уменьшение во втором образце от субъекта относительно первого образца от субъекта, то рак легких не прогрессирует (то есть, прогноз не является плохим).

В другом аспекте изобретение относится к способу мониторинга ответа на терапию у субъекта, страдающего от рака легких, включающему:

i) внутривнегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку;

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки; и

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации;

iv) сравнение участка накопления, обнаруженного на этапе iii), с участком накопления, обнаруженным при предыдущем измерении перед применением терапии,

где значительное уменьшение или отсутствие изменения участка накопления в сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что терапия для субъекта является эффективной, или

где значительное увеличение участка накопления в сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что терапия для субъекта является неэффективной.

Используемое в настоящем документе выражение «мониторинг ответа на терапию» означает возможность определения ответа субъекта, страдающего от рака легких, на терапию, используемую для указанного субъекта. При лечении рака легких могут быть использованы различные методы лечения в попытке устранить или сдержать рак. Лечение рака легких может включать активное наблюдение, хирургическое удаление, химиотерапию, лучевую терапию или некоторую комбинацию. Какой из вариантов является лучшим, зависит от многих факторов. Поскольку все методы лечения могут иметь значительные побочные эффекты, обсуждение лечения часто сосредоточено на балансе между целями терапии и рисками изменения образа жизни.

Таким образом, в данном аспекте первый образец от субъекта собирают до применения терапии, и второй образец от субъекта собирают после того, как субъект начинает/получает лечение, например, химиотерапию, хирургическую операцию или лучевую терапию. Данный способ позволяет оценивать конкретное лечение для конкретного субъекта, у которого ранее был диагностирован рак легких. Следовательно, если терапия является неэффективной для лечения рака легких у указанного субъекта (состояние пациента не улучшается), то указанная терапия должна быть изменена, и должна быть разработана новая терапия для лечения рака легких у указанного субъекта. За курсом нового лечения с легкостью можно следить данными способами. Напротив,

если состояние пациента улучшается, можно продолжать применять текущую терапию.

Выражения «значительное уменьшение», «значительное увеличение» или «отсутствие изменения» участка накопления были объяснены ранее.

В контексте настоящего изобретения терапия, используемая для субъекта, является эффективной, если она приводит к уменьшению накопления конъюгата по изобретению в легких субъекта, страдающего от рака легких и получающего указанную терапию, то есть, если после введения имеет место уменьшение или устранение всех поддающихся измерению очагов поражения. В идеале, при каждом исследовании следует измерять все очаги поражения, которые могут быть измерены в одном и двух измерениях. В предпочтительном варианте осуществления пациент может демонстрировать полный ответ или частичный ответ.

В одном из вариантов осуществления полный ответ означает полное исчезновение всех клинически выявляемых злокачественных заболеваний, при определении в двух отдельных исследованиях.

В другом варианте осуществления частичный ответ означает уменьшение относительно исходного уровня суммы произведений самых длинных перпендикулярных диаметров всех измеряемых очагов заболевания, без прогрессирования оцениваемого заболевания и без признаков каких-либо новых очагов поражения, при определении в двух последовательных исследованиях. В одном из вариантов осуществления частичный ответ может представлять собой уменьшение на по меньшей мере 5%. Более предпочтительно, частичный ответ означает уменьшение на 50% или более.

В контексте настоящего изобретения терапия для субъекта является неэффективной, если она не способствует уменьшению накопления конъюгата по изобретению в легких субъекта, страдающего от рака легких и получающего указанную терапию, то есть, если после введения имеет место увеличение всех поддающихся измерению очагов поражения.

В другом аспекте изобретение относится к применению конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку, в способе мониторинга прогрессирования рака легких или мониторинга ответа на терапию у субъекта, страдающего от рака легких. В конкретном варианте осуществления конъюгат вводят в легкие.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от рака легких, включающему использование лечения, выбранного из хирургического удаления опухоли легких и/или применения химиотерапии и/или лучевой терапии, где субъект идентифицирован способом диагностики, обнаружения или визуализации, описанным в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от рака легких, включающему использование лечения, выбранного из хирургического удаления опухоли легких и/или применения химиотерапии и/или лучевой

терапии, где прогрессирование рака легких у субъекта оценивают способом мониторинга, описанным в настоящем документе.

Наборы по изобретению

В другом аспекте изобретение относится к набору для диагностики рака легких, включающему:

- i) конъюгат, включающий полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,
- ii) устройство для назальной инстилляции или назальной ингаляции конъюгата по п. i); и
- iii) средства для упаковки компонентов по пунктам i) и ii).

В другом аспекте изобретение относится к применению набора по изобретению для диагностики рака легких или для мониторинга прогрессирования рака легких, или для мониторинга эффекта терапии.

По изобретению также предусмотрены наборы, включающие композицию, содержащую конъюгат, используемый по изобретению, в сочетании с соответствующим устройством доставки или аппликатором для композиции, например: катетерами, пробирками, распылителями, шприцами, пульверизаторами или другими аппликаторами для кремов, частиц, гранул, порошков, жидкостей, гелей и тому подобного.

Устройства для интраназальной доставки в контексте настоящего изобретения включают системы распылительных насосов, пипетки для подачи капель, дозированные распылительные насосы, назальные аэрозольные дозированные ингаляторы, системы распыления порошка, активируемые вдохом порошковые ингаляторы и назальные порошковые инсуффляторы. Устройство для интраназальной доставки может быть заполнено количеством, соответствующим одной дозе или множеству доз интраназального препарата.

При внутрилегочном способе введения конъюгат можно вводить с помощью дозированного ингалятора. Дозированный ингалятор (MDI) обеспечивает образование мелкой дисперсии конъюгата, как правило, с аэродинамическим размером частиц менее 5 мкм.

Альтернативно, для внутрилегочной доставки конъюгата можно использовать ингаляторы сухого порошка. Ингаляторы сухого порошка содержат порошки в количестве одной дозы или множества доз.

Другим устройством для внутрилегочной доставки является небулайзер, включая ультразвуковые и воздушно-струйные небулайзеры. В ультразвуковых небулайзерах ультразвуковые волны создаются в камере ультразвукового распылителя керамическим пьезоэлектрическим кристаллом, который вибрирует при электрическом возбуждении. В результате на поверхности раствора образуется облако аэрозоля. Аэрозоль, создаваемый воздушно-струйным небулайзером, образуется при прохождении сжатого воздуха через отверстие. Жидкость может выводиться из перпендикулярного сопла (эффект Бернулли), смешиваясь с воздушной струей, которая распыляется с помощью перегородок для

облегчения образования облака аэрозоля.

Все варианты осуществления, раскрытые в контексте предшествующих аспектов изобретения, также применимы к наборам по изобретению.

Конъюгат по изобретению

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату, включающему:

- i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и
- ii) детектируемую метку, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из контрастного вещества или визуализирующего средства.

В предпочтительном варианте осуществления данного аспекта изобретения конъюгат не содержит последовательность проникающего в клетку пептида. В другом предпочтительном варианте осуществления конъюгат не содержит химический фрагмент, способствующий поглощению клеткой полипептида с SEQ ID NO: 1 или его функционально эквивалентного варианта. В другом предпочтительном варианте осуществления конъюгата по изобретению конъюгат не содержит флуоресцентную метку или радиоизотоп, более предпочтительно, конъюгат не содержит флуоресцеин-малеинимид (FITC) или радиоизотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{125}I и ^{111}In . В предпочтительном варианте осуществления конъюгат по изобретению не содержит последовательность проникающего в клетку пептида, флуоресцентную метку или радиоизотоп, более предпочтительно, не содержит флуоресцеин-малеинимид (FITC) или радиоизотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{125}I и ^{111}In .

В другом варианте осуществления конъюгат по изобретению не содержит флуоресцентные группы, биотин, ПЭГ, аминокислотные аналоги, неприродные аминокислоты, фосфатные группы, гликозильные группы, радиоизотопные метки, другие метки, например, гистидиновую метку, Arg-метку, FLAG-метку, Strep-метку, эпитоп, узнаваемый антителом, например, с-тус-метку, HA-метку, V5-метку, SBP-метку, S-метку, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлоза-связывающий домен, хитин-связывающий домен, глутатион-S-трансферазную метку, мальтоза-связывающий белок, NusA, TrxA, DsbA, Avi-метку, аминокислотную последовательность, такую как ANGHRP (SEQ ID NO: 63) или PINHDHNPRLVIHSGMTCXXC (SEQ ID NO: 64), или β -галактозидазу и тому подобное.

В предпочтительном варианте осуществления контрастное вещество или визуализирующее средство выбрано из группы, состоящей из ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{123}I , ^{124}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , $^{154-1581}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{186}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{223}Ra и ^{225}Ac . В более предпочтительном варианте осуществления радиоактивное вещество или радиоизотоп представляет собой ^{89}Zr .

Все варианты осуществления, раскрытые в контексте предшествующих аспектов

изобретения, также применимы к конъюгатам по изобретению.

Все используемые в настоящем документе термины, если нет иных указаний, имеют их обычное значение, известное в данной области. Другие, более конкретные определения определенных терминов, используемых в настоящей заявке, являются такими, как указано ниже, и предназначены для единообразного применения во всем описании и формуле изобретения, если иное явно изложенное определение не используется в более широком смысле. Во всем тексте описания и формулы изобретения слово «включает» и его вариации не предназначены для исключения других технических признаков, добавок, компонентов или этапов. Более того, слово «включает» охватывает вариант «состоит из». Дополнительные объекты, преимущества и признаки изобретения станут понятными специалистам в данной области при изучении описания, или могут стать понятными при осуществлении на практике изобретения. Кроме того, настоящее изобретение охватывает все возможные сочетания особых и конкретных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе.

В настоящей спецификации и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа терминов включает соответствующую форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Термин «один из», а также термины «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящем документе могут быть использованы взаимозаменяемо. Кроме того, при использовании в настоящем документе «и/или» следует воспринимать как конкретное описание каждого из двух конкретных признаков или компонентов с другим или без другого. Таким образом, в настоящем документе термин «и/или» при использовании в таком выражении, как «А и/или В», должен включать «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» при использовании в таком выражении, как «А, В и/или С» должен включать каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно). Термин «примерно», используемый в сочетании с числовым значением в тексте спецификации и формулы изобретения, обозначает интервал точности, знакомый и приемлемый для специалиста в данной области. Как правило, такой интервал точности составляет $\pm 15\%$. Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Единицы, префиксы и символы приведены в форме, принятой для них в *Système International de Unites* (системе СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если нет иных указаний, аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от amino- к карбоксильному концу. Заголовки, приведенные в настоящем документе, не ограничивают различные аспекты изобретения, которые могут быть поняты при обращении к спецификации в целом. Соответственно, более полное определение терминов, приведенных непосредственно ниже, можно получить при обращении к полному изложению спецификации.

Изобретение далее описано с помощью следующих примеров, которые следует рассматривать исключительно как иллюстративные и не ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Методология

Получение, очистка и мечение Omomyc

Последовательность пептида Omomyc (SEQ ID NO: 1) обратно транскрибировали, кодон-оптимизировали для экспрессии в *E. coli*, добавляя метионин на N-конце, клонировали в экспрессионный вектор pET3a (Novagen) и очищали из арабинозаиндуцируемого (Invitrogen®) бактериального штамма BL21 (DE3) с использованием протоколов, адаптированных из протокола очистки Max, описанного в публикациях J.-F. Naud et al. 2003. *J Mol Biol*, 326:1577-1595; F.-O. и Mcduff et al. 2009. *J Mol Recognit*, 22:261-269). Полученная очищенная конструкция представляла собой полипептид с SEQ ID NO: 4. Подлинность каждой очищенной конструкции подтверждали масс-спектрометрией и вестерн-блот анализом. Конъюгацию при помощи малеинимида фрагментов AlexaFluor® 660 (Invitrogen) или дефероксамина (Macrocyclics) к уникальному C-концевому остатку цистеина в Omomyc проводили в соответствии с инструкциями производителя. Ковалентно модифицированные пептиды очищали от свободного маркирующего средства катионообменной, а затем эксклюзионной хроматографией, и полноту мечения и чистоту подтверждали методами масс-спектрометрии, SDS-ПААГ и УФ-спектроскопии. Для *in vivo* введений выполняли дополнительный этап очистки с целью удаления эндотоксинов с использованием набора для удаления эндотоксина ToxinEraser™ (Genscript). Концентрацию эндотоксина определяли с использованием набора Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantification Kit (Thermo Scientific). Замену буфера производили в ячейке Amicon Ultra-15 (MerckMillipore) с пределом исключения 3 кДа.

Для радиоактивного мечения Omomyc-DFO ^{89}Zr ($T_{1/2}=78,4$ ч $\beta^+=22,6\%$; $\sim 2,7$ ГБк/мл в 1 М щавелевой кислоте) получали от компании BV Cyclotron VU (Amsterdam, The Netherlands). Необходимый объем раствора ^{89}Zr в щавелевой кислоте, соответствующий 74 МБк, доводили до общего объема 200 мкл 1 М щавелевой кислотой; добавляли 90 мкл 2 М Na_2CO_3 и инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре. Добавляли один мл 0,5 М HEPES и 710 мкл Omomyc-DFO (2,17 мг/мл), и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин на вращающемся шейкере; проверенный уровень pH составлял 7,0-7,5. Реакционную смесь наносили на предварительно уравновешенную колонку PD-10 и элюировали фосфатно-солевым буфером (PBS) на фракции по 500 мкл. Собранные фракции измеряли в калибраторе дозы (IBC, Veenstra Instruments). Контроль качества выполняли методом мгновенной тонкослойной хроматографии (ITLC) на полосках для ITLC (модель 150-771, Biodex), используя в качестве элюэнта смесь 0,02 М цитратный буфер (pH 5,0): ацетонитрил (9:1). Стабильность Omomyc-DFO- ^{89}Zr тестировали путем инкубации в человеческой сыворотке (HS), PBS и DTPA (50 мМ) в

течение 24 ч при 37°C. Радиохимическую чистоту определяли методом ITLC, как описано выше. Радиохимический выход, чистота и удельная активность Oromuc-DFO-⁸⁹Zr, используемого в данном исследовании, составляли >98%, >99% и 34 МБк/мг соответственно, что предполагает практически полное извлечение конъюгатов Oromuc-DFO-⁸⁹Zr после эксклюзионной хроматографии; таким образом, соединение использовали без дальнейшей очистки. Исследования стабильности в HS и PBS при 37°C показали, что более 99% радиоизотопного индикатора оставалось интактным через 24 ч, в то время как в ДТРА более 96% радиоизотопного индикатора оставалось интактным через 24 ч при 37°C, свидетельствуя о том, что Oromuc-DFO-⁸⁹Zr является подходящим зондом для in vivo исследований.

Исследование фармакокинетики и биораспределения

Для исследований фармакокинетики и биораспределения методом микроПЭТ/КТ самок мышей FVB/NRj в возрасте 8 недель приобретали у компании JANVIER LABS. Эксперименты проводили в соответствии с государственной директивой по защите животных и с одобрения регионального комитета по содержанию лабораторных животных и этического комитета по защите животных СИЕМАТ. Мыши размещали в помещении для содержания животных в СИЕМАТ.

Для исследований с и/н введением одну группу из 5 мышей, получивших анестезию изофлураном, извлекали из индукционной камеры и немедленно проводили и/н введение, внося пипеткой 30 мкл Oromuc-DFO-⁸⁹Zr (2,9±0,4 МБк, 2,37±0,5 мг Oromuc-DFO/кг массы тела) на наружный край носовых ходов. Мышей умерщвляли через 48 ч после введения путем цервикальной дислокации под анестезией изофлураном в O₂, и кровь немедленно собирали путем пункции сердца. Для исследований биораспределения мышей визуализировали в указанных временных точках методом ПЭТ/мКТ-визуализации, как описано ниже. Для исследований биораспределения ткани органов вырезали, взвешивали в сыром виде и проводили подсчет радиоактивности в гамма-счетчике (2470 Wizard², PerkinElmer), наряду со стандартным образцом введенной дозы. Использовали тест Граббса для выявления одного животного с отклоняющимися данными в глобальном наборе данных, и данные этого животного отбрасывали.

Для исследований с в/в введением одной группе из 5 «голых» мышей Balb/c со сформировавшимися подкожными ксенотрансплантатами из клеток H1975 (средний размер 430 мм³) вводили Oromuc-DFO-⁸⁹Zr (3,2±0,1 МБк, 2,62±0,3 мг Oromuc-DFO/кг массы тела) в хвостовую вену. Мышей умерщвляли через 72 ч после инъекции путем цервикальной дислокации под анестезией изофлураном в O₂, и кровь немедленно собирали путем пункции сердца. Для исследований биораспределения мышей визуализировали в указанных временных точках методом ПЭТ/мКТ-визуализации, как описано ниже. После завершения исследования ткани органов вырезали, взвешивали в сыром виде и проводили подсчет радиоактивности в гамма-счетчике (2470 Wizard², PerkinElmer), наряду со стандартным образцом введенной дозы, через 48 ч после введения.

Для исследований биораспределения и лечения аденокарциномы легких использовали минимум 5 мышей на временную точку, их распределяли в группы случайным образом, и лечение начинали через 16 недель после инфицирования Adeno-Cre. Животных анестезировали ингаляцией изофлурана (AbbVie Farmaceutica S.L.U.) и интраназально вводили одну дозу 1,4 мг/кг ОмотусСРР-AF660 или растворитель (10 мМ ацетат натрия, рН 6,5) в общем объеме 30 мкл, а затем умерщвляли в указанных временных точках. Ткани собирали, немедленно проводили визуализацию флуоресценции при помощи IVIS[®] Spectrum imaging, используя длины волн 663 нм и 690 нм для возбуждения и эмиссии, соответственно. Флуоресцентные сигналы регистрировали и анализировали с использованием программы Living Image[®] 4.3.1 (PerkinElmer).

МикроПЭТ/КТ-визуализация

После и/н инстиляции немедленно проводили сканирование мышей, используя ПЭТ-КТ сканер Argus для мелких животных (SEDECAL, Madrid, Spain). Исследования ПЭТ (энергетическое окно 400-700 КэВ и 20 минут статической регистрации) и КТ (напряжение 45 кВ, ток 150 мкА, 8 снимков, 360 проекций и стандартное разрешение) проводили в различных временных точках после инъекции (30 минут, 4, 24 и 48 часов) для мышей, анестезированных ингаляцией 2-2,5% изофлурана. ПЭТ-изображения реконструировали с помощью алгоритма 2D-OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization) (16 подмножеств и две итерации), с коррекцией случайности и рассеяния. Калибровочный коэффициент, определенный путем сканирования цилиндрического фантома, содержащего известную активность ⁸⁹Zr, использовали для преобразования количества импульсов на пиксель/сек в кБк/см³. Очерченные вручную представляющие интерес области (ROI) на ПЭТ-изображениях (интраназальная доставка, полость рта и ротоглоточная область, пищевод и кишечник) или ROI, выбранные из ПЭТ-изображений с использованием анатомических ориентиров КТ (для легких, печени и почек), использовали для определения среднего накопления радиоактивного индикатора в единицах %ИД/г ткани (распад с поправкой на время введения) путем деления полученной средней концентрации радиоактивного индикатора (кБк/см³) в области на общую ИД (кБк). Процент введенной дозы в ROI рассчитывали путем умножения полученной средней концентрации радиоактивного индикатора (кБк/см³) на объем ROI (см³). Отдельные коэффициенты калибровки изображения также определяли для легких, почек и печени путем сравнения конечных сканов (48 ч) с непосредственными результатами анализов органов, проведенных после эвтаназии животных. Эти калибровочные коэффициенты использовали для нормализации значений %ИД/г, полученных при ПЭТ-визуализации, к концентрациям активности в различных временных точках после инъекции. Изображения анализировали с использованием программного обеспечения для анализа изображений ИТК-SNAP (www.itksnap.org).

Иммуногистохимия

Мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации. Легкие вырезали и перфузировали через трахею PBS, а затем 3,7% PFA, фиксировали в течение ночи,

переносили в 70% этанол и заливали парафином. Нарезали срезы толщиной 4 микрометра и окрашивали H&E для патологического исследования. Для иммуногистохимического исследования с анти-Отомус проводили извлечение антигена путем нагревания в течение 20 мин при 400 Вт в микроволновой печи в 0,01 М цитратном буфере, pH 6,0. После блокирования в течение 45 минут в 3% БСА и промывания в PBS срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными кроличьими поликлональными анти-Отомус антителами (аффинно очищенными и отобранными на основании узнавания эпитопа MYC) в конечной концентрации 0,02 мг/мл. После промывания в PBS срезы инкубировали с конъюгатом козьих антител против IgG кролика (H+L) с AlexaFluor[®]488 (Thermo Fisher Scientific A-11008) в разведении 1/200 и окрашивали DAPI (Life Technologies D1306) в разведении 1/10000, промывали один раз водой и заливали заливочной средой для измерения флуоресценции (Dako S3023).

Мыши

Мышей KRas^{LSL-G12D/+} генотипировали в Transnetyx, и создание опухолей легких у самцов и самок проводили, как описано ранее (E.L. Jackson. 2001. Genes & Development, 15:3243-3248). У животных поддерживали смешанный генетический фон C57BL/6J x FVBN. Использовали минимум 5 мышей на временную точку, их распределяли в группы случайным образом, и лечение начинали через 16 недель после инфицирования Adeno-Cre (выполняли две биологические реплики эксперимента). Животных анестезировали ингаляцией изофлурана (AbbVie Farmaceutica S.L.U.) и и/н вводили либо Отомус, либо растворитель (10 мМ ацетат натрия, pH 6,5) в общем объеме 30 мкл.

Статистический анализ

Для всех анализов и построения графиков использовали программу GraphPad Prism 5. Нормальное распределение данных оценивали для каждой группы с использованием критерия Д'Агостино-Пирсона. Различия в средних значениях образцов анализировали с использованием t-критерия Стьюдента или ANOVA (параметрического) для нормально распределенных данных, либо критерия Манна-Уитни или критерия Крускала-Уоллиса в иных случаях. F-критерий использовали для расчета разницы в вариациях групп.

Пример 1: Минибелок Отомус локализуется в основном в опухолях легких после прямого внутрилегочного введения в мышинной модели аденокарциномы легких.

Для оценки потенциальной диагностической применимости минибелка Отомус *in vivo* авторы изобретения сначала проанализировали его распределение в тканях после интраназального (и/н) введения, способа, который, как показано ранее, обеспечивает непосредственную доставку в легкие макромолекулярных препаратов у мышей. Авторы изобретения сначала ковалентно присоединили дефероксамин-малеинимидную (DFO) группу к Отомус, и радиоактивно поместили это соединение ⁸⁹Zr, затем определили биораспределение и фармакокинетические свойства у здоровых мышей путем *ex vivo* подсчета радиоактивности (Фиг. 1А). В среднем, 8% дозы Отомус-DFO-⁸⁹Zr (2,37 мг/кг) легко (в течение 30 минут) достигало легких после и/н введения и оставалось в них в

течение более 48 часов (Фиг. 1А). Иммунофлуоресцентные исследования с использованием специфического анти-Отомус антитела подтвердили нахождение (и частичную ядерную локализацию) немеченого минибелка Отомус в легочном эпителии получивших препарат мышей через 4 часа после и/н инстилляций (Фиг. 1В). Для подтверждения того, что данный способ применим к мышам с аденокарциномой легких, авторы изобретения повторили процедуру с использованием хорошо охарактеризованной мышинной модели KRas^{LSL-G12D/+}-индуцированной аденокарциномы легких (E.L. Jackson. 2001. Genes & Development, 15:3243-3248). Результаты мПЭТ/мКТ-визуализации мышей показали, что через 24 часа после и/н инстилляций Отомус-DFO-⁸⁹Zr локализовался в основном в опухолях легких (Фиг. 1С). Хотя точная причина такого преимущественного присутствия в опухоли неизвестна, она может быть связана с измененной сосудистой сетью или метаболизмом опухоли, как правило, наблюдаемыми при раке.

В следующем эксперименте 2 мг/кг Отомус-DFO-⁸⁹Zr вводили интраназально мышам Kras^{G12D} с опухолями через 18 недель после индукции AdCre. Изображения получали через 24 часа после интраназального введения (Фигура 2А), на них можно видеть, что пептид, присутствующий через 24 часа у несущих опухоли мышей, локализуется в опухолях (Фигура 2А), в то время как у мышей без опухолей в той же временной точке распределение в легких является более диффузным по всем легким (Фигура 2В). Цифры на Фигуре 2А показывают концентрацию Отомус-DFO-⁸⁹Zr, при этом более высокие значения соответствуют более высокой концентрации конъюгата. На Фигуре 2В показано переэкспонированное изображение диффузного и неспецифического мечения легких у здоровых контрольных животных, вследствие этого, количественная оценка не представлена. Кроме того, общее количество, распределенное по легким у мышей с опухолями, выше, чем у здоровых мышей, хотя наблюдается высокая вариабельность между особями (Фигура 2С).

Такой же эксперимент проводили с иной меткой (в этот раз использовали флуоресцентный зонд AF660 вместо радиоактивной метки), которая позволяет осуществлять *ex vivo* визуализацию по технологии IVIS[®]. Через 4 ч (Фиг. 3А) после однократного введения 1,4 мг/кг ОтомусСРР-AF660 флуоресцентный сигнал был обнаружен в легких мышей. Через 24 ч после интраназального введения, при том, что большинство ОтомусСРР-AF660 было вымыто из нормальных тканей, его можно было обнаружить специфически в опухолях легких (Фиг. 3В). Опять-таки, флуоресцентный сигнал локализуется в опухолях после интраназального введения мышам (Фигура 3).

Пример 2. Биораспределение после внутривенного введения Отомус мышам с опухолями легких.

Пяти несущим опухоли мышам внутривенно вводили 29,1 мг/кг Отомус-DFO, и через 72 ч после инъекции проводили ПЭТ/КТ-визуализацию. Как показано на Фигуре 4, отсутствует существенное увеличение поглощения Отомус в легких в сравнении с другими группами. Этот результат демонстрирует специфичность Отомус в качестве изотопного индикатора опухолей легких при введении непосредственно в легкие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, включающий:

i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и

ii) детектируемую метку,

для применения в способе диагностики «in vivo» рака легких у субъекта, который нуждается в этом, путем внутрилегочного введения конъюгата.

2. Конъюгат для применения по п. 1, где функционально эквивалентный вариант SEQ ID NO: 1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

3. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-2, где детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{123}I , ^{124}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , $^{154-1581}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{186}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{223}Ra и ^{225}Ac , и ^{89}Zr .

4. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-3, где обнаружение раковых клеток после введения конъюгата проводят путем мПЭТ/мКТ-визуализации.

5. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-4, где рак легких представляет собой первичную опухоль, выбранную из мелкоклеточного рака легких (МРЛ) и немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), или представляет собой метастаз рака.

6. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-5, где рак легких представляет собой аденокарциному.

7. Конъюгат для применения по п. 6, где аденокарцинома легких представляет собой аденокарциному с мутацией KRAS.

8. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-7, где обнаружение конъюгата проводят через период времени от 30 минут до 96 часов после введения конъюгата субъекту, который нуждается в этом.

9. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-8, где внутрилегочное введение выполняют путем назальной инстилляцией, назальной ингаляцией или пероральной ингаляцией.

10. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-9, где доза конъюгата находится в диапазоне от 0,04 до 0,8 мг/кг, или от 1,48 до 30 мг/м², более предпочтительно 0,19 мг/кг или 7 мг/м².

11. Конъюгат для применения по любому из пунктов 1-10, где после этапа диагностики конъюгат вводят по меньшей мере еще один раз для мониторинга прогрессирования рака легких или эффекта терапии, используемой для субъекта, страдающего от рака легких.

12. Способ обнаружения или визуализации клеток рака легких у субъекта, включающий:

i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий

последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку;

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки; и

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации.

13. Набор для диагностики рака легких, включающий:

i) конъюгат, включающий полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,

ii) устройство для внутрилегочного введения конъюгата по п. i); и

iii) средства для упаковки компонентов по пунктам i) и ii).

14. Применение набора по п. 13 для диагностики рака легких или для мониторинга прогрессирования рака легких, или для мониторинга эффекта терапии.

15. Конъюгат, включающий:

i) полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и

ii) детектируемую метку, выбранную из группы, состоящей из контрастного вещества или визуализирующего средства.

16. Способ диагностики для обнаружения опухоли легких у субъекта, включающий:

i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки,

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации, и

iv) определение наличия опухоли легких в случае обнаружения специфической метки.

17. Способ диагностики и лечения субъекта, предположительно имеющего рак легких, включающий:

i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку,

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки,

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации,

iv) определение наличия рака легких в случае обнаружения специфической метки, и

v) использование для субъекта, у которого обнаружен рак легких, лечения, выбранного из хирургического удаления опухоли легких и/или применения химиотерапии и/или лучевой терапии.

18. Способ мониторинга прогрессирования рака легких у субъекта, включающий:

i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку;

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки; и

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации,

iv) сравнение участка накопления, обнаруженного на этапе iii), с участком накопления, обнаруженным при предыдущем измерении,

где значительное уменьшение или отсутствие изменения участка накопления в сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что рак легких не прогрессирует, или

где значительное увеличение участка накопления в сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что рак легких прогрессирует.

19. Способ мониторинга ответа на терапию у субъекта, страдающего от рака легких, включающий:

i) внутрилегочное введение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку;

ii) ожидание в течение времени, достаточного для проникновения конъюгата в пролиферирующие легочные клетки; и

iii) обнаружение пролиферирующих легочных клеток путем использования для субъекта метода визуализации с целью обнаружения участка накопления конъюгата в организме субъекта, и за счет этого обнаружение или визуализацию участка пролиферации,

iv) сравнение участка накопления, обнаруженного на этапе iii), с участком накопления, обнаруженным при предыдущем измерении до использования терапии,

где значительное уменьшение или отсутствие изменения участка накопления в

сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что терапия для субъекта является эффективной, или

где значительное увеличение участка накопления в сравнении с предыдущим измерением указывает на то, что терапия для субъекта является неэффективной.

20. Применение конъюгата, включающего полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1 или ее функционально эквивалентный вариант, и детектируемую метку, в способе мониторинга прогрессирования рака легких или мониторинга ответа на терапию у субъекта, страдающего от рака легких.

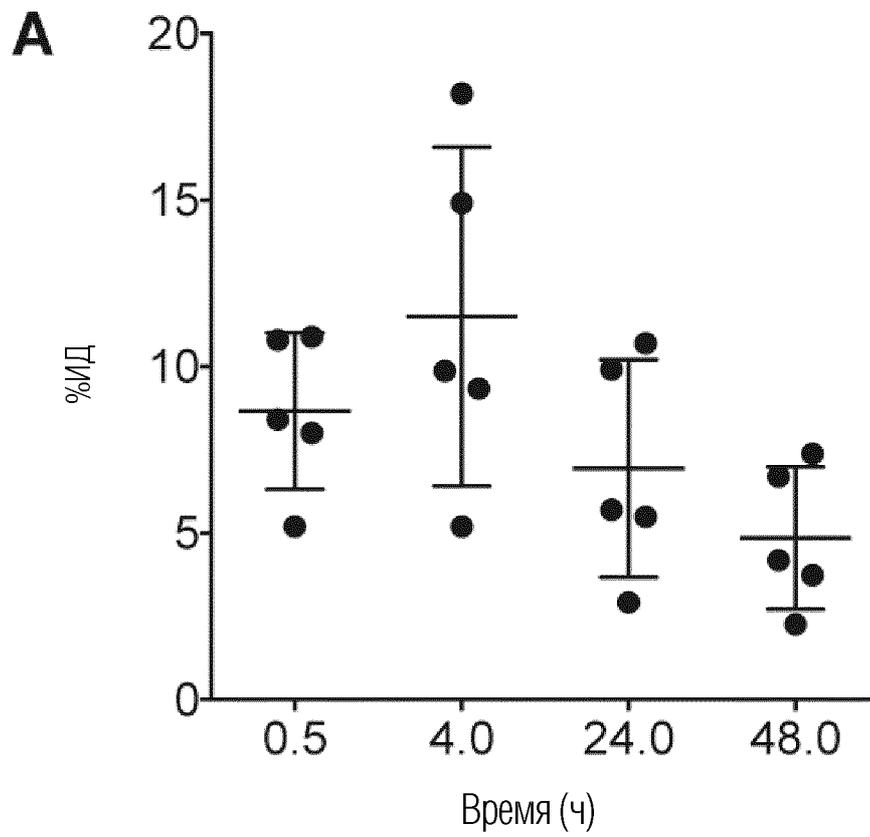
21. Применение п. 20, где конъюгат вводят в легкие.

22. Способ лечения субъекта, страдающего от рака легких, включающий использование лечения, выбранного из хирургического удаления опухоли легких и/или применения химиотерапии и/или лучевой терапии, где субъект идентифицирован способом диагностики по п. 16, либо способом обнаружения или визуализации по п. 12.

23. Способ лечения субъекта, страдающего от рака легких, включающий использование лечения, выбранного из хирургического удаления опухоли легких и/или применения химиотерапии и/или лучевой терапии, где прогрессирование рака легких у субъекта оценивают способом мониторинга по п. 18 или 19.

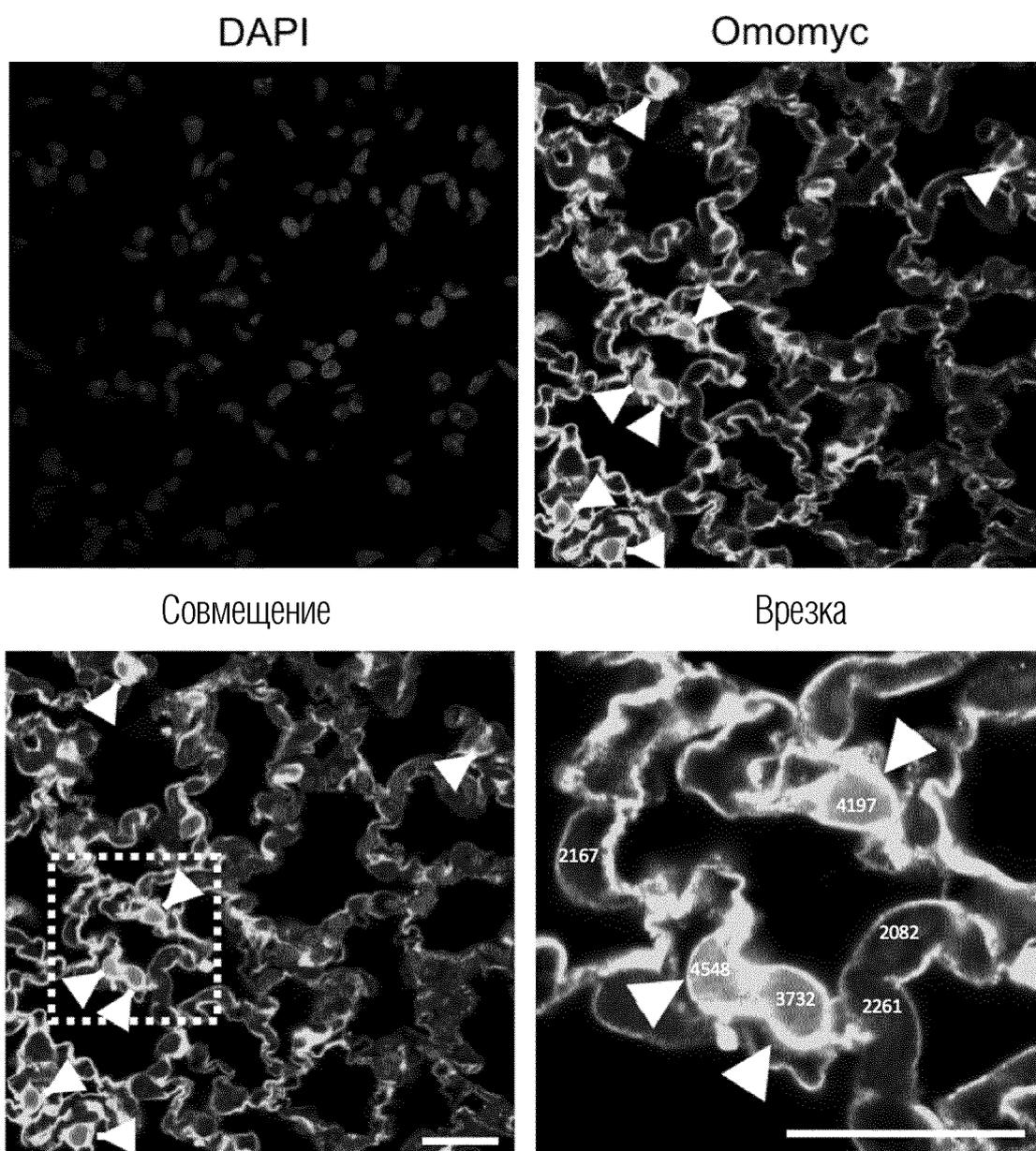
По доверенности

1/8



ФИГ. 1

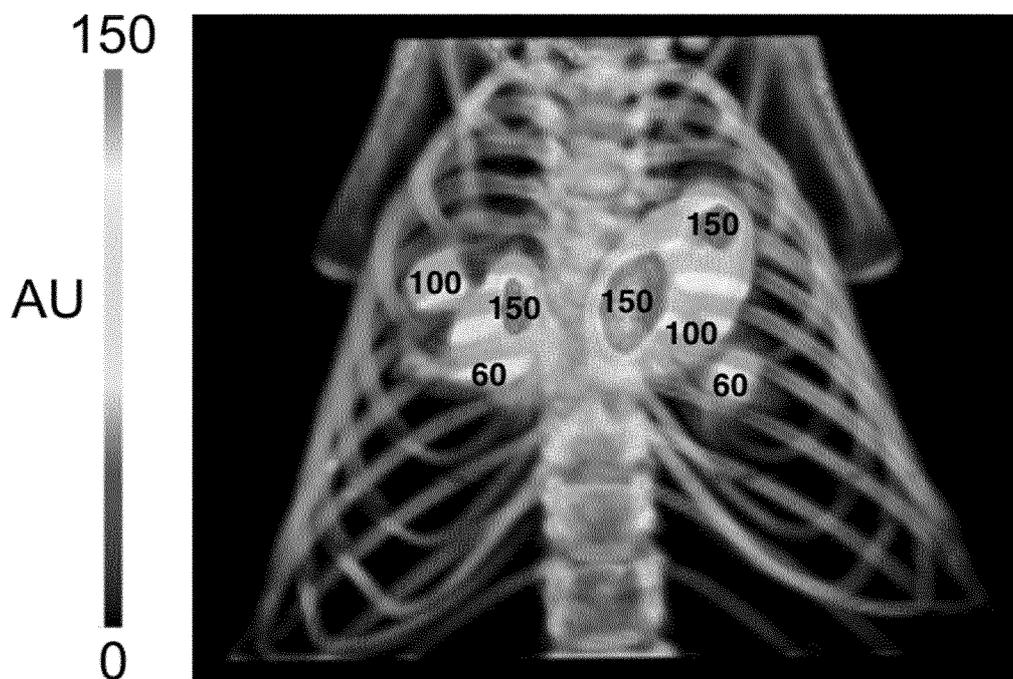
B



ФИГ. 1(продолжение)

C

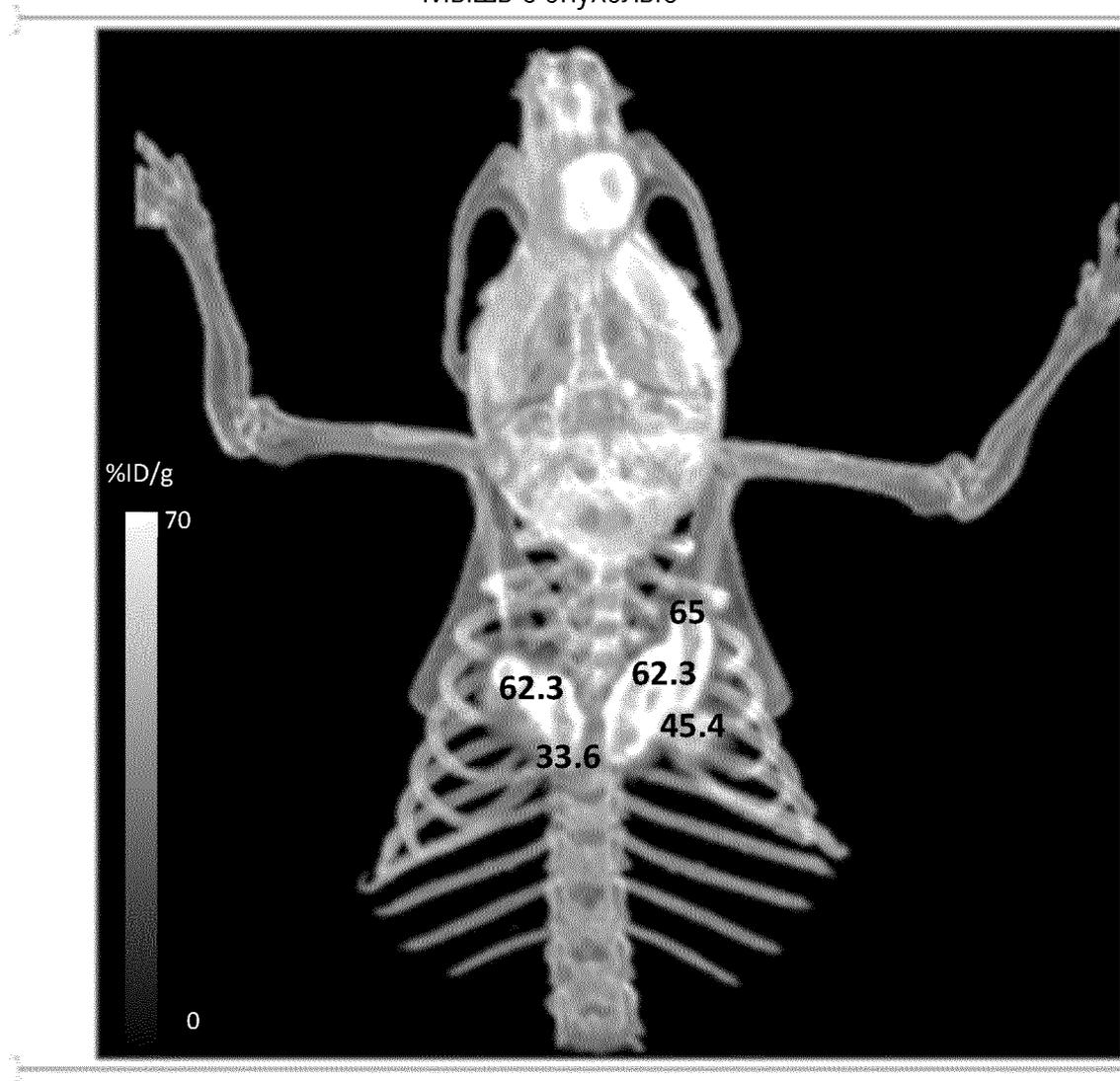
Омомус-DFO-⁸⁹Zr



ФИГ. 1(продолжение)

A

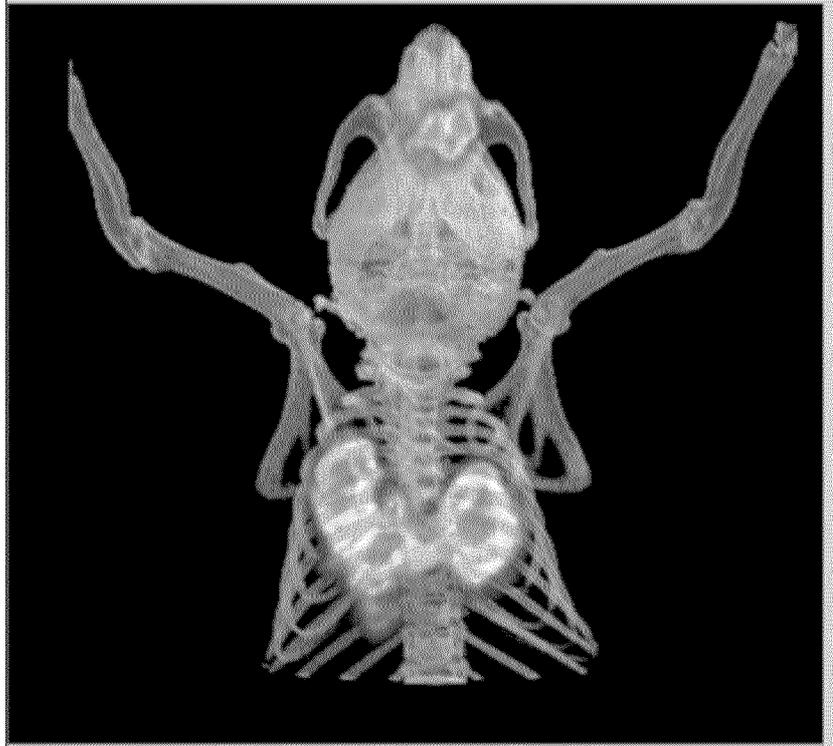
через 24 ч после и/н введения
Мышь с опухолью



ФИГ. 2

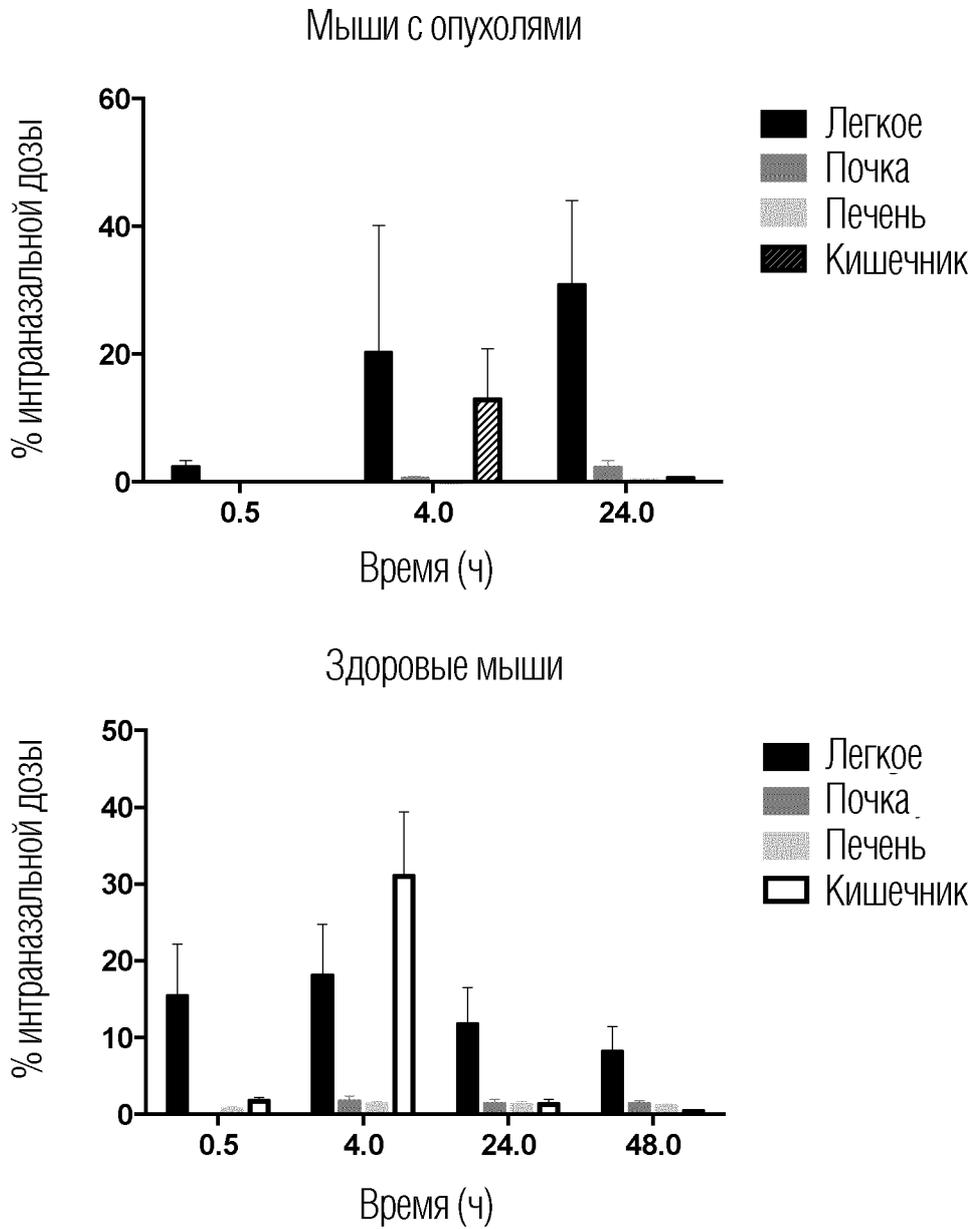
В

через 24 ч после и/н введения
Здоровая контрольная мышь

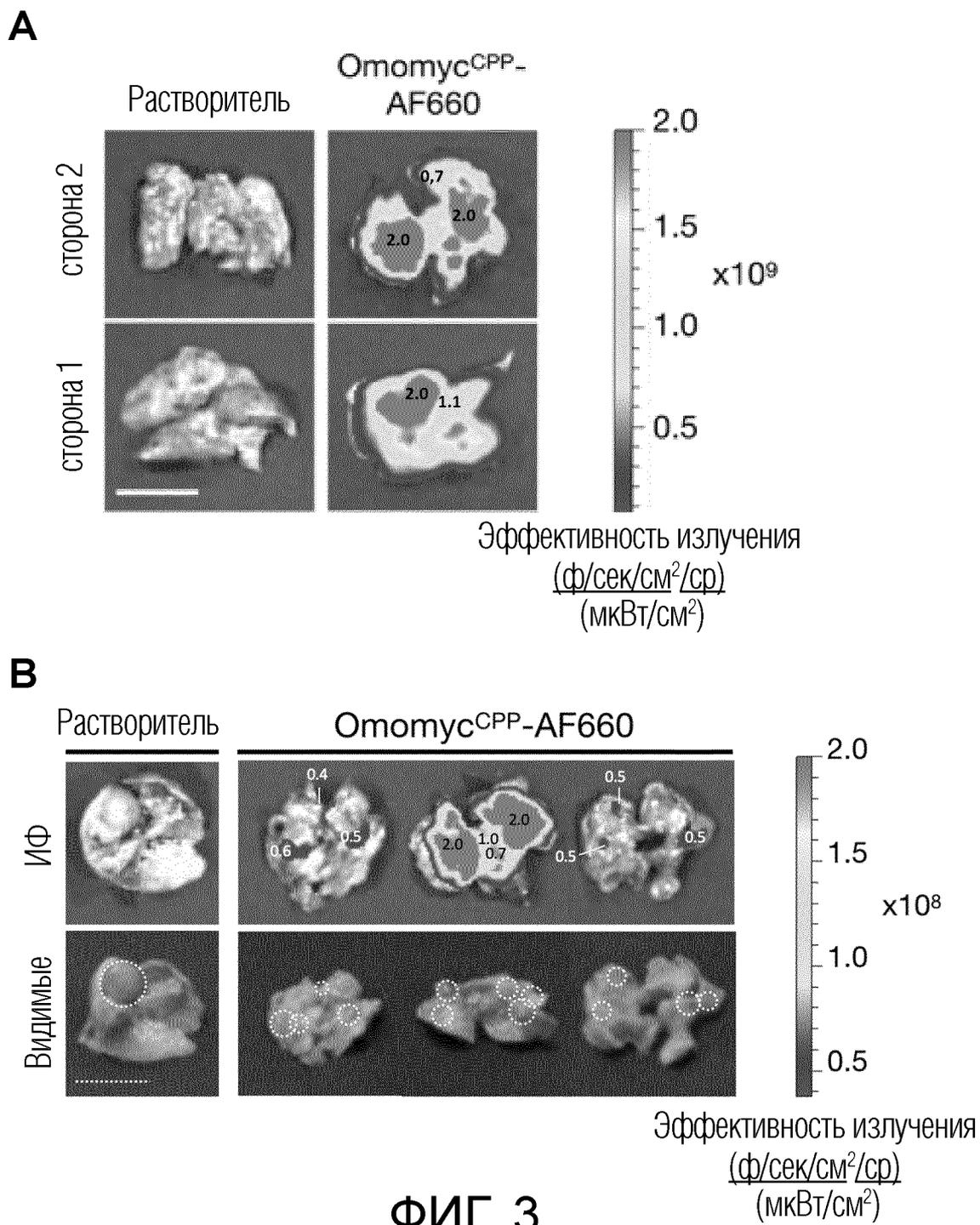


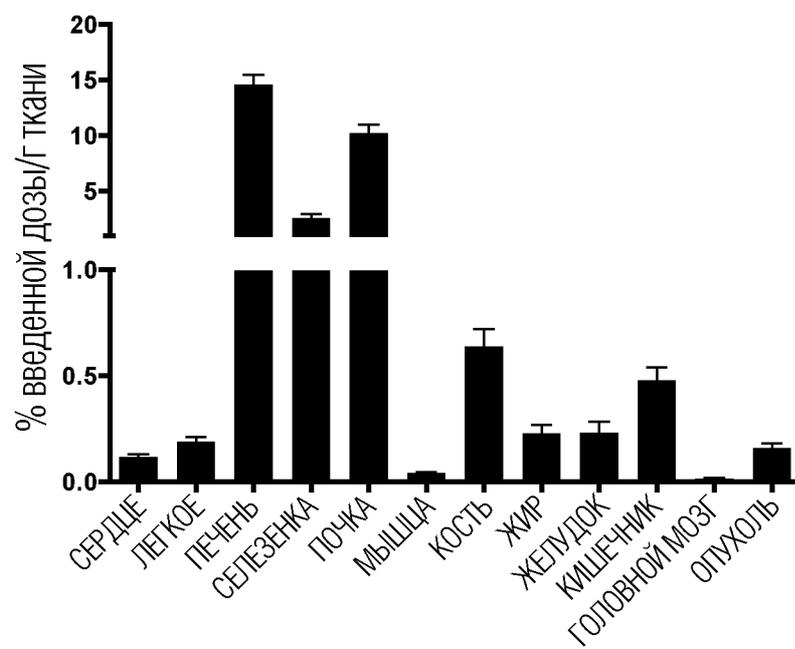
ФИГ. 2 (продолжение)

С



ФИГ. 2 (продолжение)





ФИГ. 4