

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292566 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.02

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.09

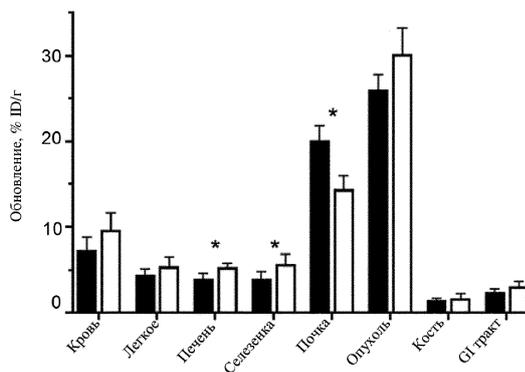
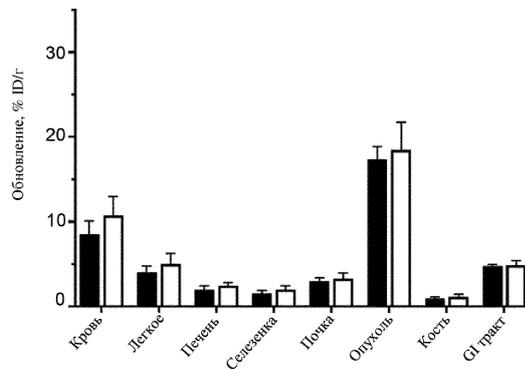
(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО, НАЦЕЛИВАЮЩЕЕСЯ НА HER2

(31) 20161922.8
(32) 2020.03.09
(33) EP
(86) PCT/EP2021/055925
(87) WO 2021/180727 2021.09.16
(71) Заявитель:
ХОБЕР БИОТЕК АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Хобер София, Вон Виттинг Эмма,
Гаруси Джавад, Толмачев Владимир
(SE)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предусмотрен терапевтический конъюгат, содержащий слитый белок и цитотоксический радионуклид, при этом цитотоксический радионуклид связан со слитым белком. Слитый белок содержит определенную HER2-связывающую область (HBR), определенную альбуминсвязывающую область (ABR) и спейсерную область.



A1

202292566

202292566

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО, НАЦЕЛИВАЮЩЕЕСЯ НА HER2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к области HER2-нацеливающейся терапии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Сконструированные каркасные белки (ESP) вызывают все больший интерес в качестве специфических нацеливающихся векторов в радионуклидной молекулярной визуализации (Krasniqi 2018). ESP обладают рядом привлекательных особенностей, таких как эффективное и недорогое продуцирование в прокариотических хозяевах или даже посредством синтеза пептидов. Более того, они демонстрируют высокую стабильность в широком диапазоне значений температуры и pH, что способствует применению широкого спектра способов мечения. Кроме того, их высокая стабильность и мутационная устойчивость облегчают конструирование мультимерных полиспецифических и полифункциональных конструкций. "ADAPT" представляет собой ESP, полученный из небольшого (46 аминокислот) альбуминсвязывающего домена (ABD) белка G (Nilvebrant Hober S 2013). Возможность применения ADAPT в качестве зондов для визуализации была продемонстрирована с применением ADAPT₆, который демонстрирует высокую аффинность к рецептору 2-го типа эпидермального фактора роста человека (HER2) (Garousi 2015). Тем не менее, применение радионуклидного средства терапии на основе ADAPT₆ было невозможно по причине высокой почечной реабсорбции после клиренса посредством клубочковой фильтрации. Степень реабсорбции нельзя снизить посредством совместной инъекции L-лизина или гелофузина (Lindbo 2016). Следовательно, необходимы другие стратегии, позволяющие терапевтическое применение.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что нековалентное связывание с сывороточным альбумином является возможной стратегией для продления периода полувыведения из кровотока, повышения биодоступности и снижения поглощения почками небольших терапевтических средств, подвергающихся почечному клиренсу.

[0004] Целью настоящего изобретения является получение терапевтического средства, нацеливающегося на HER2, которое устраняет по меньшей мере некоторые недостатки предшествующего уровня техники.

[0005] Для достижения данной цели предусмотрен терапевтический конъюгат, содержащий слитый белок и цитотоксический радионуклид, при этом цитотоксический радионуклид связан со слитым белком, где:

– слитый белок содержит HER2-связывающую область (HBR), альбуминсвязывающую область (ABR) и спейсерную область;

– количество аминокислот в спейсерной области составляет по меньшей мере 7, например, 7-30;

– HBR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

i) $LAX_3AKX_6TX_8X_9YHLX_{13}X_{14}X_{15}GVX_{18}DX_{20}YKX_{23}LIDKX_{28}KTVEX_{33}VX_{35}AX_{37}YX_{39}X_{40}ILX_{43}ALP$ (SEQ ID NO:36),, где независимо друг от друга

X_3 выбран из A, G, P, S и V;

X_6 выбран из D и E;

X_8 выбран из A и V;

X_9 выбран из L и N;

X_{13} выбран из D и T;

X_{14} выбран из K и R;

X_{15} выбран из I, L, M, T и V;

X_{18} выбран из S и A;

X_{20} выбран из F, Y и A;

X_{23} выбран из D и R;

X_{28} выбран из A и V;

X_{33} выбран из G, S и D;

X_{35} выбран из K, M и R;

X_{37} выбран из L и R;

X_{39} выбран из A, F и L;

X_{40} выбран из A и E, и

X_{43} выбран из A, H, K, P, R, T, Q и Y,

и ii) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в i), и

– ABR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

a) LAX₃AKX₆X₇AX₉X₁₀ ELDX₁₄YGVSDX₂₀ YKX₂₃LIX₂₆X₂₇AKT VEGVX₃₅ALX₃₈X₃₉X₄₀
ILX₄₃X₄₄LP (SEQ ID NO:37), где независимо друг от друга

X₃ выбран из E, S, Q и C;

X₆ выбран из E, S, V и C;

X₇ выбран из A, L и S;

X₉ выбран из L и N;

X₁₀ выбран из A, S и R;

X₁₄ выбран из A, S, C и K;

X₂₀ выбран из Y и F;

X₂₃ выбран из N, D и R;

X₂₆ выбран из N, D и E;

X₂₇ выбран из N и K;

X₃₅ выбран из K и E;

X₃₈ выбран из I и K;

X₃₉ выбран из D, E и L;

X₄₀ выбран из A, E и H;

X₄₃ выбран из A и K;

X₄₄ выбран из A, S и E;

L в положении 45 присутствует или отсутствует, и

P в положении 46 присутствует или отсутствует,

и b) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в а).

[0006] В варианте осуществления цитотоксический радионуклид связан с концом (предпочтительно С-концом) слитого белка, как правило, посредством конъюгации с применением хелатора или ковалентной конъюгации.

[0007] В варианте осуществления спейсерная область соединяет С-конец HBR с N-концом ABR.

[0008] В варианте осуществления ABR содержит аминокислотную последовательность

LAX₃AKX₆X₇AX₉X₁₀ ELDX₁₄YGVSDX₂₀ YKX₂₃LIX₂₆X₂₇AKT VEGVX₃₅ALX₃₈X₃₉X₄₀
ILAALP (SEQ ID NO:38), где независимо друг от друга

X₃ выбран из E и S;

X₆ выбран из E и V;

X_7 выбран из A и L;
 X_9 выбран из L и N;
 X_{10} выбран из A и R;
 X_{14} выбран из A, S, C и K, предпочтительно из A, S и K;
 X_{20} выбран из Y и F;
 X_{23} выбран из N, D и R;
 X_{26} выбран из N и D;
 X_{27} выбран из N и K;
 X_{35} выбран из K и E;
 X_{38} выбран из I и K;
 X_{39} выбран из D и L;
 X_{40} выбран из A, E и H;
L в положении 45 присутствует или отсутствует, и
P в положении 46 присутствует или отсутствует.

[0009] В варианте осуществления ABR содержит аминокислотную последовательность
LAEAKX₆X₇ANX₁₀ELDX₁₄YGVSDFYKRLIX₂₆KAKTVEGVEALKX₃₉X₄₀ILAALP (SEQ ID NO:39), где независимо друг от друга

X_6 выбран из E и V;
 X_7 выбран из A и L;
 X_{10} выбран из A и R;
 X_{14} выбран из S и K;
 X_{26} выбран из N и D;
 X_{39} выбран из D и L, и
 X_{40} выбран из A и H.

[0010] В варианте осуществления ABR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP (SEQ ID NO:1);
LAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (SEQ ID NO:2);
GLAEAKEAANAELDSYGVSDFYKRLIDKAKTVEGVEALKDAILAALP (SEQ ID NO:3);
LAEAKVLANRELDKYGVSDYKKNLNNAKTVEGVKALIDEILAALP (SEQ ID NO:4);
и

LAEAKVLALR ELDKYGVSDY YKDLIDKAKT VEGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:5),
или состоит из нее.

[0011] В варианте осуществления аминокислотной последовательности i):

X₃ выбран из A, G, P;

X₆ представляет собой E;

X₉ представляет собой L;

X₁₃ представляет собой D;

X₁₄ представляет собой R;

X₁₅ выбран из L и V;

X₁₈ выбран из S и A;

X₂₀ выбран из F, Y и A;

X₂₈ представляет собой A;

X₃₃ представляет собой G;

X₃₅ выбран из K и R;

X₃₇ представляет собой L;

X₃₉ выбран из F и L;

X₄₀ представляет собой E, и

X₄₃ выбран из H, P и R.

[0012] В варианте осуществления HBR содержит аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

LAAAKETALY HLDRLGVADA YKDLIDKAKT VEGVKARYFE ILHALP (SEQ ID NO:6);

LAAAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAKT VEGVRALYLE ILPALP (SEQ ID NO:7);

LAPAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILHALP (SEQ ID NO:8);

LAAAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVKALYFE ILHALP (SEQ ID NO:9);

LAPAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILKALP (SEQ ID NO:10);

LAGAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILTALP (SEQ ID NO:11);

LAPAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILRALP (SEQ ID NO:12);

LAGAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILRALP (SEQ ID NO:13);

LAAAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVMALYAE ILPALP (SEQ ID
NO:14);

LAGAKETALY HLDKTGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILQALP (SEQ ID NO:15);

LAAAKETALY HLTRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILYALP (SEQ ID NO:16);

и

LASAKDTALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRLYAE ILAALP (SEQ ID NO:17), или состоит из нее.

[0013] В варианте осуществления цитотоксический радионуклид выбран из группы, состоящей из ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{166}Ho , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{149}Tb , ^{161}Tb , ^{47}Sc ; ^{225}Ac ; ^{212}Pb ; ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{227}Th , ^{223}Ra ; $^{58\text{m}}\text{Co}$, ^{131}I , ^{76}As , ^{77}As и ^{211}At .

[0014] В варианте осуществления группа цитотоксических радионуклидов ограничена ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{131}I , ^{153}Sm , ^{225}Ac , ^{188}Re и ^{186}Re .

[0015] В варианте осуществления радионуклид представляет собой радиоактивный металл, и слитый белок конъюгирован с радиоактивным металлом с помощью хелатора, который ковалентно связан со слитым белком, предпочтительно с остатком цистеина (C) слитого белка. Соответственно, один вариант осуществления слитого белка дополнительно предусматривает наличие концевого остатка цистеина (C), предпочтительно C-концевого остатка цистеина (C). Концевой остаток цистеина (C) предпочтительно является единственным остатком цистеина (C) в слитом белке.

[0016] В варианте осуществления количество аминокислот в спейсерной области составляет по меньшей мере 8, например, 8-30, например, 8-20, предпочтительно 8-14, более предпочтительно 10-14.

[0017] В варианте осуществления спейсерная область содержит повтор аминокислотной последовательности SSSG.

[0018] В варианте осуществления терапевтический конъюгат содержит не более 150 аминокислотных остатков, например, не более 130 аминокислотных остатков.

[0019] В варианте осуществления слитый белок дополнительно содержит дополнительную область, содержащую аминокислотную последовательность DEAVDANS (SEQ ID NO:25). В таком варианте осуществления дополнительная область может выходить за пределы N-конца HBR.

[0020] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую вышеупомянутый терапевтический конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель.

[0021] Настоящее изобретение также предусматривает терапевтический конъюгат согласно вышеизложенному для применения в способе лечения рака, как правило, рака со сверхэкспрессией HER2. По типу рак может представлять собой рак молочной железы или рак желудка/гастроэзофагеальный рак.

[0022] Терапевтический конъюгат по настоящему изобретению демонстрирует превосходное биораспределение, что означает, что побочные эффекты ограничены при лечении пациентов с HER2-экспрессирующими опухолями.

[0023] Как объяснено выше, терапевтический конъюгат по настоящему изобретению содержит слитый белок, содержащий альбуминсвязывающую область (ABR) и HER2-связывающую область (HBR), которые соединены друг с другом посредством спейсерной области. Функция спейсерной области заключается в обеспечении свободного рефолдинга и предотвращении стерических затруднений при связывании с альбумином и HER2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0024] На фигуре 1 проиллюстрированы два примера терапевтических конъюгатов согласно настоящему изобретению.

[0025] На фигуре 2 показаны хроматограммы аналитической HPLC, демонстрирующие степень чистоты различных вариантов белка. В правом столбце представлен неконъюгированный белок, предназначенный для мечения с помощью ^{125}I , и поэтому он проявляется в виде двух отдельных пиков, соответствующих мономеру и димеру, образованному свободным остатком цистеина в невозстанавливающих условиях. На хроматограммах на фигуре 2 по оси X представлено время [минуты], а по оси Y представлены mAU.

[0026] На фигуре 3 показаны CD-спектры белков, использованных в данном исследовании, демонстрирующие высокое содержание альфа-спиралей, а также способность к рефолдингу после термической денатурации. На спектрах на фигуре 3 по оси X представлена длина волны [нм], а по оси Y представлен круговой дихроизм [мград].

[0027] На фигуре 4 показаны SPR-сенсограммы нацеливающихся белков, связывающихся с HER2, человеческим сывороточным альбумином (HSA) и мышинным сывороточным альбумином (MSA), в зависимости от концентрации. В строках на фигуре 4b показано связывание в окружении насыщающих концентраций HSA (аналит, насыщенный 10-кратным избытком HSA). Следовательно, одновременное связывание слитых белков с HER2 и HSA продемонстрировано посредством проявления связывания с HER2 даже после насыщения HSA. Однако связывание с HSA и MSA соответственно при наличии насыщающих концентраций HSA в буфере невозможно по причине блокирования участка связывания. В левом столбце представлен MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC. В среднем столбце представлен MG-DEAVDANS-

ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC. В правом столбце представлен MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC. На графиках на фигуре 4 по оси X представлено время [с], а по оси Y представлены единицы ответа [RU].

[0028] На фигуре 5A показана SPR-сенсограмма нацеливающегося слитого белка (MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC), использованного для исследования средства терапии. На фигуре 5B показана SPR-сенсограмма ненацеливающегося контрольного слитого белка (MG-DEAVDANS-ADAPT_{neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC). Отсутствие искривления кривой при связывании на фигуре 5B подтверждает, что ADAPT_{neg} не связывает HER2. На графиках на фигуре 5 по оси X представлено время [с], а по оси Y представлены единицы ответа [RU].

[0029] На фигуре 6 показаны хроматограммы HPLC с радиометрическим выявлением MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC-HPeM-¹²⁵I (A), MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-HPeM-¹²⁵I (B) и MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I (C). На хроматограммах на фигуре 6 по оси X представлено время [минуты], а по оси Y представлены мВ.

[0030] На фигуре 7 показаны хроматограммы HPLC с радиометрическим выявлением MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (A), MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (B) и MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (C). На хроматограммах на фигуре 7 по оси X представлено время [минуты], а по оси Y представлены мВ.

[0031] На фигуре 8 показана клеточная обработка MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (первая строка), MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (вторая строка) и MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (третья строка) HER2-экспрессирующими линиями клеток SKOV-3 (левый столбец) и BT-474 (правый столбец). Данные нормализованы относительно максимальной средней ассоциированной с клетками активности для каждого конъюгата. Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями для трех чашек с клетками. На графиках на фигуре 8 по оси X представлено время [ч], а по оси Y представлена нормализованная ассоциированная с клетками радиоактивность (%).

[0032] На фигуре 9 показана клеточная обработка MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC-HPeM-¹²⁵I (первая строка), MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-HPeM-¹²⁵I (вторая строка) и MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I (третья строка) HER2-экспрессирующими линиями клеток SKOV-3 (левый столбец) и BT-

474 (правый столбец). Данные нормализованы относительно максимальной средней ассоциированной с клетками активности для каждого конъюгата. Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями для трех чашек с клетками. На графиках на фигуре 9 по оси X представлено время [ч], а по оси Y представлена нормализованная ассоциированная с клетками радиоактивность (%).

[0033] На фигуре 10 показана карта взаимодействий для связывания меченных радиоактивным изотопом конъюгатов с клетками SKOV-3. Мечеными радиоактивным изотопом конъюгатами являются MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC-HPeM-¹²⁵I (A), MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-HPeM-¹²⁵I (B), MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I (C), MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (D), MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (E) и MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (F).

[0034] На фигуре 11 показано влияние слияния ABD на биораспределение вариантов ADAPT, меченных с помощью ¹⁷⁷Lu. Биораспределение у мышей BALB/C nu/nu, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3, измеряли через 48 ч после инъекции. Данные выражены в виде %ID/г и представляют собой средние значения от 5 животных ± SD. Закрашенными/черными столбцами представлен уровень MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu, незакрашенными столбцами представлен уровень MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu, и серыми столбцами представлен уровень MG-DEAVDANS-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (эталон). Примечательно, что серый столбец достигает 200%ID/г в почке.

[0035] На фигуре 12 показаны результаты сравнения ¹²⁵I-меченных (A) и ¹⁷⁷Lu-меченных (B) слитых с ABD вариантов ADAPT. Биораспределение у мышей BALB/C nu/nu, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3, измеряли через 48 ч после инъекции. Данные выражены в виде %ID/г и представляют собой средние значения от 5 животных ± SD. Звездочкой отмечена значимая разница в поглощении. На фигуре 12A незакрашенными столбцами представлен уровень MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I, а закрашенными столбцами представлен уровень MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-HPeM-¹²⁵I. На фигуре 12B незакрашенными столбцами представлен уровень MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu, а закрашенными столбцами представлен уровень MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu.

[0036] На фигуре 13 показана специфичность поглощения опухолью MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I (A) и MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (B) *in vivo* через 48 ч после инъекции. Сравнивается поглощение в HER2-положительном SKOV-3 и HER2-отрицательном ксенотрансплантате Ramos. Данные выражены в виде %ID/г и представляют собой средние значения от 4 животных ± SD.

[0037] На фигуре 14 показано СPECT/CT-изображение распределения MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu у мыши, несущей ксенотрансплантат HER2-положительной опухоли SKOV-3, через 72 ч после инъекции. Стрелка на фигуре указывает на наиболее высокое поглощение, которое имеет место в опухоли.

[0038] На фигуре 15 показаны средние значения объема опухолей у мышей, обработанных с применением следующего: PBS; немеченого MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА; однократной инъекции 18 МБк MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu; двукратной инъекции 18 МБк MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu и однократной инъекции 18 МБк MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu.

[0039] На фигуре 16 показаны результаты терапии *in vivo*. Выживаемость бестимусных мышей BALB/c (n = 9-10), несущих HER2-экспрессирующие ксенотрансплантаты SKOV-3, после инъекции(инъекций) следующего: PBS; немеченого MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА; 18 МБк MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (однократная инъекция); 18 МБк MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (двукратная инъекция) и 18 МБк MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (однократная инъекция).

[0040] На фигуре 16А:
 MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (однократная инъекция) представлен пунктирной линией;
 MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (однократная инъекция) представлен точечной линией, и
 MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (двукратная инъекция) представлен сплошной линией.

[0041] На фигуре 16B:

MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu (однократная инъекция) представлен точечной линией;

MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA (немеченый) представлен точечной линией, и

PBS представлен сплошной линией.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0042] ADAPT₆ продемонстрировал большие перспективы как в доклиническом, так и в клиническом применении для визуализации, главным образом благодаря его небольшому размеру и быстрому клиренсу из крови. Однако небольшой размер и, как следствие, значительное поглощение почками также препятствует дальнейшему терапевтическому применению. В настоящем изобретении была использована стратегия продления периода полувыведения, при которой представляющий интерес белок сливают с последовательностью на основе альбуминсвязывающего домена (ABD) белка G, чтобы получить преимущество длительного периода полувыведения собственного сывороточного альбумина пациента.

[0043] Молекулярное конструирование слитых белков на основе HBR-ABR, осуществленное авторами настоящего изобретения, позволяет получать зонды, способные к корректному фолдингу и высокоаффинному связыванию как с альбумином, так и с HER2 (таблица 1). Способность слитых белков к рефолдингу после термической денатурации позволила использовать высокие температуры для мечения, например, с помощью ¹⁷⁷Lu, что должно обеспечить высокую стабильность связывания (Price 2014). Действительно, метка была стабильной при контроле с большим молярным избытком EDTA, и специфичность и аффинность связывания ¹⁷⁷Lu-меченных слитых белков не снижались (таблица 4). Результаты исследования клеточной обработки с применением метки ¹⁷⁷Lu, остающейся в лизосомах после расщепления связанного с ней белка, свидетельствовали о том, что как MG-DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT₆-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu, так и MG-DEAVDANS-ADAPT₆-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu медленно подвергались интернализации в той же степени, что и неслитый ADAPT₆ (фигура 8). Это может указывать на то, что свойства метки, позволяющие ей оставаться в лизосомах после расщепления связанного с ней белка, менее важны для удержания метки раковыми клетками. Поэтому при оценке также были включены варианты с меткой ¹²⁵I-NPEM, не остающейся в лизосомах после расщепления связанного с ней белка, MG-

DEAVDANS-ABD₀₃₅-(SSSG)₃-ADAPT6-GSSC-HPeM-¹²⁵I и MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I. Как это принято в данной области техники, в качестве заменителя для ¹³¹I, который используют в клинической практике, использовали ¹²⁵I.

[0044] Результаты эксперимента по нацеливанию *in vivo* (фигура 11) демонстрировали заметно повышенное сохранение активности ABD-слитых ADAPT в крови и снижение их поглощения в почках по сравнению с неслитым ADAPT. Следует отметить, что хотя слияние нацеливающихся белков с ABD уже применялось ранее, степень такого эффекта непредсказуема по причине сложности взаимодействий всех составляющих конструкции *in vivo*. Например, слияние ABD с полипептидными токсинами, нацеливающимися на ADAPT6, приводило к гораздо более умеренному влиянию на удержание в крови и поглощение в почках (Liu 2019).

[0045] Неожиданно в настоящем изобретении продемонстрировано, что эффект обеспечивало относительное расположение ABD₀₃₅ (ABR) и ADAPT6 (HBR), в частности в случае применения ¹⁷⁷Lu в качестве цитотоксического радионуклида. Соединение ABR с C-концом HBR приводило не только к значительно более высокому поглощению опухолью, но и к значительно более низкому поглощению почками. Тот факт, что абсорбируемая почками доза может иметь дозозависимый характер, подчеркивает важность этих результатов.

[0046] Представленные в данном документе данные демонстрируют, что как метка ¹⁷⁷Lu, так и метка ¹²⁵I доставлялись в опухоль, и что доставка была более эффективной в случае ¹⁷⁷Lu-меченного слитого белка. Накопление как ¹⁷⁷Lu-, так и ¹²⁵I-меченного ADAPT6-ABD₀₃₅ в опухолях было, судя по всему, зависимым от экспрессии HER2 (фигура 13). Посредством СПЕКТ/СТ-визуализации подтверждали, что через 72 ч после инъекции поглощение в опухоли было намного выше, чем в любых других тканях (фигура 14). Дозиметрический расчет свидетельствовал о том, что абсорбированная опухолью доза должна составлять 67 Гр при сохранении пределов дозы 2 Гр в случае крови и 20 Гр в случае почек.

[0047] Результаты экспериментальной терапии подтверждали данные дозиметрии. В данном документе показано, что у контрольных групп мышей, обработанных только с помощью PBS или немеченого HBR-ABR (т. е. слитого белка без цитотоксического радионуклида), медианная выживаемость составляла 25 дней. Обработка вариантом слитого белка, меченным радионуклидом, который был модифицирован с удалением способности связываться с HER2, вызывала небольшое, но значимое повышение

медианной выживаемости (31 день) (фигура 16B), скорее всего вследствие активности белка, циркулирующего в крови или поглощаемого опухолями благодаря влиянию EPR. При применении интактной версии HBR влияние на рост опухоли (фигуры 15 и 16A) значительным образом различалось. Рост опухоли подавлялся дозозависимым образом, и медианная выживаемость повышалась более чем в два раза (70 дней) даже в случае однократной инъекции. Важно, что данная обработка не была ассоциирована с какой-либо наблюдаемой токсичностью. Например, средний вес животных значимо не различался между группами обработки и контрольными группами. Гистопатологические исследования образцов почек и печени, полученных хирургическим путем в конце обработки, демонстрировали лишь незначительные изменения в гепатоцитах (округлые цитоплазматические вакуоли и повышенная вариативность размера и формы клеточного ядра) и клетках почечных канальцев (увеличенный размер клеточного ядра и окаймление хроматина). Однако данные изменения были обратимыми.

[0048] В настоящее время существует несколько вариантов лечения пациентов с видами диссеминированного HER2-экспрессирующего рака молочной железы, например, лечение с применением таких моноклональных антител, как трастузумаб и пертузумаб, или такого конъюгата антитело-лекарственное средство, как трастузумаб-DM1. Данные терапевтические средства значительно улучшили выживаемость пациентов с раком молочной железы. К сожалению, со временем у опухолей развивается устойчивость к таким средствам терапии. Примечательно, что устойчивые опухоли сохраняют высокий уровень экспрессии HER2. Терапия с применением терапевтического конъюгата по настоящему изобретению является дополнительным вариантом для таких пациентов.

[0049] Настоящее изобретение предусматривает терапевтический конъюгат, содержащий слитый белок и цитотоксический радионуклид. Цитотоксический радионуклид связан со слитым белком.

[0050] В предпочтительном варианте осуществления цитотоксический радионуклид связан с концом слитого белка. Такое связывание обычно достигается посредством конъюгации с применением хелатора или ковалентной конъюгации (дополнительно обсуждено ниже). В особенно предпочтительном варианте осуществления цитотоксический радионуклид связан с С-концом слитого белка.

[0051] Слитый белок содержит HER2-связывающую область (HBR), альбуминсвязывающую область (ABR) и спейсерную область. Предпочтительно

спейсерная область соединяет С-конец HBR с N-концом ABR. Его преимущества описаны ниже в разделе "Примеры".

[0052] Количество аминокислот в спейсерной области составляет по меньшей мере 7, например, 7-30. Предпочтительной является спейсерная область, которая является относительно короткой, но все же допускает свободный рефолдинг и предотвращает стерические затруднения при связывании с альбумином и HER2. Соответственно, количество аминокислот в спейсерной области может составлять 8-30, например, 8-20, предпочтительно 8-14, более предпочтительно 10-14.

[0053] В качестве примера, спейсерная область может содержать повтор аминокислотной последовательности SSSG или состоять из него. Следовательно, спейсерная область может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SSSGSSSG ((SSSG)₂, SEQ ID NO:31), SSSGSSSGSSSG ((SSSG)₃, SEQ ID NO:32), SSSGSSSGSSSGSSSG ((SSSG)₄, SEQ ID NO:33), SSSGSSSGSSSGSSSGSSSG ((SSSG)₅, SEQ ID NO:34) и SSSGSSSGSSSGSSSGSSSGSSSG ((SSSG)₆, SEQ ID NO:35), или состоять из нее. Предпочтительно, группа состоит из (SSSG)₂, (SSSG)₃ и (SSSG)₄.

[0054] HBR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из
 i) LAX₃AKX₆TX₈X₉YHLX₁₃X₁₄X₁₅GVX₁₈DX₂₀YKX₂₃LIDKX₂₈KT VEX₃₃VX₃₅AX₃₇YX₃₉X₄₀ILX₄₃ALP, где независимо друг от друга

X₃ выбран из A, G, P, S и V, предпочтительно A, G и P;

X₆ выбран из D и E, предпочтительно E;

X₈ выбран из A и V;

X₉ выбран из L и N, предпочтительно L;

X₁₃ выбран из D и T, предпочтительно D;

X₁₄ выбран из K и R, предпочтительно R;

X₁₅ выбран из I, L, M, T и V, предпочтительно L и V;

X₁₈ выбран из S и A;

X₂₀ выбран из F, Y и A;

X₂₃ выбран из D и R;

X₂₈ выбран из A и V, предпочтительно A;

X₃₃ выбран из G, S и D, предпочтительно G;

X₃₅ выбран из K, M и R, предпочтительно K и R;

X₃₇ выбран из L и R, предпочтительно L;

X₃₉ выбран из A, F и L, предпочтительно F и L;

X₄₀ выбран из A и E, предпочтительно E, и

X₄₃ выбран из A, H, K, P, R, T, Q и Y, предпочтительно H, P и R,

и ii) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в i).

[0055] Данные, демонстрирующие активность связывания i) и ii) с HER2, представлены в WO2014076179, Nilvebrant 2014 и в разделе "Примеры" ниже.

[0056] В предпочтительном варианте осуществления аминокислотной последовательности i)

X₃ выбран из A, G, P, предпочтительно A и G;

X₆ представляет собой E;

X₈ представляет собой A и V;

X₉ представляет собой L;

X₁₃ представляет собой D;

X₁₄ представляет собой R;

X₁₅ выбран из L и V;

X₁₈ выбран из S и A;

X₂₀ выбран из F, Y и A;

X₂₃ выбран из D и R;

X₂₈ представляет собой A;

X₃₃ представляет собой G;

X₃₅ выбран из K и R;

X₃₇ представляет собой L;

X₃₉ выбран из F и L;

X₄₀ представляет собой E, и

X₄₃ выбран из H, P и R.

[0057] В другом предпочтительном варианте осуществления HBR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

LAAAKETALY HLDRLGVADA YKDLIDKAKT VEGVKARYFE ILHALP (SEQ ID NO:6);

LAAAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAKT VEGVRALYLE ILPALP (SEQ ID NO:7);

LAPAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILHALP (SEQ ID NO:8);

LAAAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGKALYFE ILHALP (SEQ ID NO:9);

LAPAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILKALP (SEQ ID NO:10);

LAGAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILTALP (SEQ ID NO:11);
 LAPAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILRALP (SEQ ID NO:12);
 LAGAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILRALP (SEQ ID NO:13);
 LAAAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVMALYAE ILPALP (SEQ ID
 NO:14);

LAGAKETALY HLDKTGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILQALP (SEQ ID NO:15);
 LAAAKETALY HLTRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILYALP (SEQ ID NO:16);

и

LASAKDTALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYAE ILAALP (SEQ ID NO:17).

[0058] Особенно предпочтительная группа состоит из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:13. В разделе "Примеры" ниже используется SEQ ID NO:6. SEQ ID NO:9 и 13 были идентифицированы как посредством фагового дисплея, так и посредством FACS, в Nilvebrant 2014, что авторы настоящего изобретения считают полезным.

[0059] ABR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из
 а) $LAX_3AKX_6X_7AX_9X_{10}ELDX_{14}YGVSDX_{20}YKX_{23}LIX_{26}X_{27}AKTVEGVX_{35}ALX_{38}X_{39}X_{40}ILX_{43}X_{44}LP$, где независимо друг от друга

X_3 выбран из E, S, Q и C, предпочтительно E, S и Q;

X_6 выбран из E, S, V и C, предпочтительно E, S и V;

X_7 выбран из A, L и S;

X_9 выбран из L и N;

X_{10} выбран из A, S и R;

X_{14} выбран из A, S, C и K, предпочтительно A, S и K;

X_{20} выбран из Y и F;

X_{23} выбран из N, D и R;

X_{26} выбран из N, D и E;

X_{27} выбран из N и K;

X_{35} выбран из K и E;

X_{38} выбран из I и K;

X_{39} выбран из D, E и L;

X_{40} выбран из A, E и H;

X_{43} выбран из A и K;

X_{44} выбран из A, S и E;

L в положении 45 присутствует или отсутствует, и

Р в положении 46 присутствует или отсутствует,
и b) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в а).

[0060] Остов последовательности а) основан на альбуминсвязывающем домене дикого типа (ABDwt, SEQ ID NO:4) белка G. Данные, демонстрирующие активность связывания i) и ii) с сывороточным альбумином, представлены в Jonsson 2008, WO2012004384 и в разделе "Примеры" ниже.

[0061] В предпочтительном варианте осуществления ABR содержит аминокислотную последовательность
LAX₃AKX₆X₇AX₉X₁₀ ELDX₁₄YGVSDX₂₀ YKX₂₃LIX₂₆X₂₇AKT VEGVX₃₅ALX₃₈X₃₉X₄₀
ILAALP, где независимо друг от друга

X₃ выбран из E и S;

X₆ выбран из E и V;

X₇ выбран из A и L;

X₉ выбран из L и N;

X₁₀ выбран из A и R;

X₁₄ выбран из A, S, C и K, предпочтительно из A, S и K;

X₂₀ выбран из Y и F;

X₂₃ выбран из N, D и R;

X₂₆ выбран из N и D;

X₂₇ выбран из N и K;

X₃₅ выбран из K и E;

X₃₈ выбран из I и K;

X₃₉ выбран из D и L;

X₄₀ выбран из A, E и H;

L в положении 45 присутствует или отсутствует, и

R в положении 46 присутствует или отсутствует.

[0062] В особенно предпочтительном варианте осуществления ABR содержит аминокислотную последовательность
LAEAKX₆X₇ANX₁₀ ELDX₁₄YGVSDYKRLIX₂₆КАКТ VEGVEALKX₃₉X₄₀ ILAALP, где независимо друг от друга

X₆ выбран из E и V;

X₇ выбран из A и L;

X₁₀ выбран из A и R;
 X₁₄ выбран из S и K;
 X₂₆ выбран из N и D;
 X₃₉ выбран из D и L, и
 X₄₀ выбран из A и H.

[0063] Данная последовательность охватывает ABD₃₅ и PEP07914 в WO2012004384. Сниженные иммуностимулирующие свойства последовательностей, раскрытых в WO2012004384, считаются полезными для конъюгата по настоящему изобретению. По WO2012004384 были получены два европейских патента, EP2590993B1 и EP2933262B1. ABR по настоящему изобретению может быть определен как в данных патентах.

[0064] Следовательно, ABR может, как в EP2933262B1, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из

aa) LAX₃AKX₆X₇ANX₁₀ELDX₁₄YGVSDFYKRLIX₂₆КАКТ VEGVEALKX₃₉X₄₀
 ILX₄₃X₄₄LP, где независимо друг от друга

X₃ выбран из E, S, Q и C, предпочтительно E, S и Q;
 X₆ выбран из E, S и C, предпочтительно E и S;
 X₇ выбран из A и S;
 X₁₀ выбран из A, S и R;
 X₁₄ выбран из A, S, C и K, предпочтительно A, S и K;
 X₂₆ выбран из D и E;
 X₃₉ выбран из D и E;
 X₄₀ выбран из A и E;
 X₄₃ выбран из A и K;
 X₄₄ выбран из A, S и E;
 L в положении 45 присутствует или отсутствует, и
 P в положении 46 присутствует или отсутствует,

и bb) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в aa), при условии, что X₇ не представляет собой ни L, ни E, ни D.

[0065] Кроме того, ABR может, как в EP2590993B1, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из

aaa) LAX₃AKEAANAELDX₁₄YGVSDFYKRLIDКАКТ VEGVEALKDA ILAALP, где

независимо друг от друга

X₃ выбран из E и S;

X₁₄ выбран из A, S, C и K, предпочтительно A, S и K,

и bbb) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в aaa).

[0066] В одном варианте осуществления ABR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVEALKLH ILAALP (SEQ ID NO:1);

LAEAKEAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAKT VEGVEALKDA ILAALP (SEQ ID NO:2);

GLAEAKEAAN AELDSYGVSD FYKRLIDKAK TVEGVEALKD AILAALP (SEQ ID NO:3);

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:4);

и

LAEAKVLALR ELDKYGVSDY YKDLIDKAKT VEGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:5).

[0067] Особенно предпочтительная группа состоит из SEQ ID NO:1 (ABD₃₅), SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 (PEP07914 в WO2012004384).

[0068] Цитотоксический радионуклид предпочтительно выбран из группы, состоящей из ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹⁸⁸Re; ¹⁸⁶Re; ¹⁶⁶Ho, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁴Cu, ¹⁴⁹Tb, ¹⁶¹Tb, ⁴⁷Sc; ²²⁵Ac; ²¹²Pb; ²¹³Bi, ²¹²Bi, ²²⁷Th, ²²³Ra; ^{58m}Co, ¹³¹I, ⁷⁶As, ⁷⁷As и ²¹¹At.

[0069] Предпочтительным радионуклидом является ¹⁷⁷Lu.

[0070] ⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹⁸⁸Re; ¹⁸⁶Re; ¹⁶⁶Ho, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁴Cu, ¹⁴⁹Tb, ¹⁶¹Tb, ⁴⁷Sc; ²²⁵Ac; ²¹²Pb; ²¹³Bi, ²¹²Bi, ²²⁷Th, ²²³Ra и ^{58m}Co представляют собой радиоактивные металлы, которые могут быть связаны со слитым белком посредством конъюгации с применением хелатора. Хелатор предпочтительно ковалентно связан с остатком цистеина слитого белка, необязательно посредством линкера, реагирующего с тиольной группой. Связывание с амином аминокислотного остатка слитого белка также возможно, но обычно менее предпочтительно.

[0071] Хелатор может быть выбран из группы, состоящей из DOTA и его производных (например, малеимидопроизводного DOTA), макроциклических хелаторов с перекрестными мостиками и стерически затрудненных ациклических хелаторов.

[0072] Особенно подходящими хелаторами для ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹⁶⁶Ho, ¹⁵³Sm, ¹⁴⁹Tb, ¹⁶¹Tb, ⁴⁷Sc; ²²⁵Ac; ²¹²Pb; ²¹³Bi, ²¹²Bi, ²²⁷Th и ^{58m}Co являются DOTA и его производное DOTAGA.

[0073] Для ⁶⁷Cu и ⁶⁴Cu лучшим вариантом является хелатор с перекрестными мостиками, такой как CB-TE2A.

[0074] Для ^{188}Re и ^{186}Re предпочтительным является хелатор на основе цистеин- или меркаптоацетил-содержащего пептида.

[0075] ^{131}I , ^{76}As , ^{77}As и ^{211}At представляют собой радионуклиды, отличные от металлов, которые могут быть связаны со слитым белком посредством ковалентной конъюгации.

[0076] Мечение радиоактивным йодом можно осуществлять с применением ((4-гидроксифенил)этил)малеимида (HPEM), который может быть связан с остатком цистеина (C) слитого белка. ^{76}As и ^{77}As (и ^{74}As) в форме As (III) могут быть связаны непосредственно со (свеже)восстановленной тиольной группой остатка цистеина (C) слитого белка.

[0077] Для связывания ^{211}At в качестве линкера можно использовать N-[4-(три-н-бутилстаннил)фенетил]малеимид. В таком случае ^{211}At сначала соединяют с линкером посредством астатодестаннирования с образованием 4-астатофенетилмалеимида (AtPEM), который, в свою очередь, может быть связан с остатком цистеина (C) слитого белка.

[0078] Следовательно, цитотоксический радионуклид предпочтительно связан со слитым белком посредством остатка цистеина (C) слитого белка. Во избежание перекрестных/побочных реакций слитый белок в таком случае предпочтительно содержит только один остаток цистеина (C).

[0079] Остаток цистеина (C), который соединяет цитотоксический радионуклид со слитым белком, может быть размещен в концевом положении. Предпочтительно остаток цистеина (C) представляет собой C-концевой остаток слитого белка.

[0080] В одном варианте осуществления остаток цистеина (C) представляет собой C-концевой остаток в аминокислотной последовательности, выходящей за пределы C-конца ABR. Такая аминокислотная последовательность может представлять собой, например, GSSC.

[0081] Слитый белок может дополнительно содержать дополнительную область, например, содержащую аминокислотную последовательность DEAVDANS (SEQ ID NO:25) или MGDEAVDANS (SEQ ID NO:18) или состоящую из нее. Данная дополнительная область, как правило, представляет собой концевую область слитого белка, предпочтительно N-концевую область слитого белка. В варианте осуществления дополнительная область выходит за пределы N-конца HBR. Дополнительная область может привести к улучшению биораспределения и облегчению получения.

[0082] В то же время полезно ограничить размер терапевтического конъюгата по настоящему изобретению. Соответственно, предпочтительно он содержит не более 150 аминокислотных остатков, например, не более 130 аминокислотных остатков. Общая молекулярная масса терапевтического конъюгата предпочтительно составляет менее 20 кДа, например, менее 15 кДа.

[0083] В варианте осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:21 (ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₃₅), SEQ ID NO:22 (ABD₃₅-(SSSG)₃-ADAPT6), SEQ ID NO:23 (ADAPT6-(SSSG)₅-ABD₃₅) или SEQ ID NO:24 (ABD₃₅-(SSSG)₅-ADAPT6). Из этих четырех последовательностей наиболее предпочтительной считается SEQ ID NO:21 (ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₃₅).

[0084] В варианте осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:30. Из этих четырех последовательностей наиболее предпочтительной считается SEQ ID NO:27.

[0085] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую рассмотренный выше терапевтический конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель.

[0086] Композиция предпочтительно адаптирована для внутривенного введения. Соответственно, композиция, как правило, имеет водную основу. Композиция на водной основе предпочтительно буферизована, например, буферизована фосфатом. В качестве примера, композиция может быть основана на солевом растворе, буферизованном фосфатом. Композиция на водной основе может содержать человеческий сывороточный альбумин (HSA). HSA захватывает свободные радикалы и предотвращает радиолитические повреждения терапевтического конъюгата. Количество HSA может составлять 10-150 мг/мл, например, 50-100 мг/мл, предпочтительно 75 мг/мл.

[0087] В одном варианте осуществления композиция содержит пентетовую кислоту (ДТРА). ДТРА превращает свободный нуклид в форму, которая быстро выводится почками. Количество ДТРА может составлять 0,1-1,0 мг/мл, например 0,2-0,8 мг/мл, предпочтительно 0,4 мг/мл.

[0088] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает вышеупомянутый терапевтический конъюгат для применения в способе лечения рака, как правило, рака со сверхэкспрессией HER2. Диагностика сверхэкспрессии HER2 известна специалисту в данной области техники. В варианте осуществления рак характеризуется устойчивостью к

нацеливаемому на HER2 средству лечения первой линии, такому как средство лечения на основе антитела, например, трастузумаб, пертузумаб или такой конъюгат антитело-лекарственное средство, как трастузумаб-DM1. По типу рак предпочтительно представляет собой рак молочной железы или рак желудка/гастроэзофагеальный рак.

[0089] Способ может включать внутривенное введение терапевтического конъюгата, например, в описанной выше фармацевтической композиции. Количество инъекций терапевтического конъюгата может составлять 1-5, например, 1-3. Инъекции, как правило, осуществляют с интервалом в несколько дней. Предпочтительно небольшое количество инъекций, не только с точки зрения затрат, но и для минимизации боли и возможных побочных эффектов инъекций.

ПРИМЕРЫ - МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

СТАТИСТИКА

[0090] Для определения значимых различий ($P < 0,05$) статистическую обработку производили с применением программного обеспечения GraphPad Prism (версия 4.00 для Microsoft Windows; GraphPad Software). Данные по клеточному поглощению и обработке, а также по биораспределению анализировали с помощью непарного 2-стороннего *t*-критерия при сравнении 2 групп. Сравнение данных для более чем 2-х групп осуществляли с применением дисперсионного анализа ANOVA с критерием Бонферрони для множественных сравнений. Данные по биораспределению, касающиеся результатов исследований с применением двух меток, анализировали с применением парного *t*-критерия.

Получение, очистка, конъюгация и определение характеристик нацеливающихся белков

[0091] В качестве ABR был выбран вариант ABD. Данный вариант, называемый ABD₃₅ (SEQ ID NO:1), конструировали для связывания человеческого сывороточного альбумина с субпиколярной аффинностью (Jonsson 2008). Дополнительно, в качестве HBR был выбран ADAPT6 (SEQ ID NO:6), поскольку он характеризуется высокой аффинностью к HER2. В качестве спейсерной области были выбраны повторы SSSG.

[0092] Гены, кодирующие ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₃₅ (SEQ ID NO:21), ABD₃₅-(SSSG)₃-ADAPT6 (SEQ ID NO:22), ADAPT6-(SSSG)₅-ABD₃₅ (SEQ ID NO:23) и ABD₃₅-(SSSG)₅-ADAPT6 (SEQ ID NO:24), синтезировали в компании Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США) и субклонировали в векторы экспрессии посредством амплификации с праймерами, содержащими требуемые сайты рестрикции, а также N-

концевую последовательность MGDEAVDANS (SEQ ID NO:18) и С-концевую последовательность GSSC. Белки экспрессировали в клетках *E. coli* BL21*(DE3) и экстрагировали посредством обработки ультразвуком. Белки очищали посредством загрузки лизатов в колонку для аффинной хроматографии собственного производства, связанную с человеческим сывороточным альбумином (HSA).

[0093] Белки, предназначенные для мечения с применением ^{177}Lu , конъюгировали с хелатором DOTA (Macrocyclos, Техас, США) посредством стандартного связывания с помощью малеимида по свободной тиольной группе С-концевого остатка цистеина. Белок, конъюгированный с DOTA, а также неконъюгированный белок, предназначенные для мечения с применением ^{125}I , дополнительно очищали посредством полупрепаративной RP-HPLC (Zorbax, 300SB-C18, $9,4 \times 250$ мм, 5 мкм, Agilent).

[0094] В качестве контроля при измерениях биораспределения использовали неслитый ADAPT6 (MGDEAVDANS-ADAPT6-GSSC, SEQ ID NO:26) и его получали и очищали так, как описано ранее (Garousi 2019).

[0095] Для целей радионуклидной терапии была разработана версия ADAPT, не связывающаяся с мишенью, обозначенная как ADAPT_{Neg} (SEQ ID NO:19).

[0096] Ген, кодирующий слитый белок, не связывающийся с мишенью (MGDEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC (SEQ ID NO:20)), синтезировали в Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США) и получали так, как описано выше.

[0097] Значения молекулярной массы всех белков подтверждали посредством жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (LC-ESI-MS) с применением Impact II UHR QqTOF MS (Bruker Daltonics, Массачусетс, США) и оценивали вторичную структуру и термостабильность на спектрометре кругового дихроизма Chirascan (Applied Photophysics, Суррей, Соединенное Королевство), как описано ранее (Garousi 2019).

[0098] Анализ связывания мишени проводили с применением системы Biacore T200 (GE Healthcare, Стокгольм, Швеция) посредством введения аналитов на чип CM5 с иммобилизованными мышинным сывороточным альбумином (MSA), человеческим сывороточным альбумином (HSA) и рецептором 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), до уровня ответа ~ 1000 RU в каждом случае. Экспериментальные параметры были описаны ранее (Garousi 2019).

Мечение радиоактивным изотопом

[0099] Выход ^{125}I -НРЕМ измеряли с применением TLC с радиоактивной меткой с применением пластин F254 для TLC с силикагелем 60 (20×100 мм, путь элюирования 80 мм; E. Merck, Дармштадт, Германия), элюировали ацетонитрилом. Радиохимический выход и значения чистоты измеряли с применением ITLC с радиоактивной меткой (Varian Medical Systems, Пало-Альто, Калифорния, США). В ходе анализа белков, меченных радиоактивным йодом, для проявления использовали смесь ацетон:вода (7:3). В анализе ^{177}Lu -меченных белков для проявления использовали 0,2 М лимонную кислоту, pH 2,0. Для перекрестной проверки данных, полученных посредством ITLC с радиоактивной меткой, проводили анализ посредством HPLC с радиоактивной меткой. Использовали системы Hitachi Chromaster для HPLC с детектором радиоактивности и колонкой Vydac RP C18 (300 \AA ; 3×150 мм; 5-мкм) при комнатной температуре. Растворитель А представлял собой 0,1% трифторуксусную кислоту (TFA) в H_2O ; растворитель В представлял собой 0,1% TFA в ацетонитриле. Скорость потока составляла 1 мл/мин с градиентом от 5% В до 80% В в течение 20 минут.

[00100] Мечение с применением ^{125}I проводили согласно способу, описанному в (Tolmachev 2009). Вкратце, ^{125}I (14 МБк) смешивали с раствором НРЕМ (10 мкг, 31,5 нмоль) в 5% уксусной кислоте в метаноле. Добавляли хлорамин-Т (10 мкл, 8 мг/мл в воде MQ) и 10 мкл 5% уксусной кислоты в метаноле и смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию гасили посредством добавления 10 мкл метабисульфита натрия (12 мг/мл в воде). Производные ADAPT6 (500 мкг, 38,9 нмоль) восстанавливали посредством инкубации в PBS с 20 мМ дитиотреитола (DTT) в течение 60 мин при 40°C . Восстановленные белки очищали с применением колонки NAP-5 для эксклюзионной хроматографии (GE Healthcare, Уппсала, Швеция), предварительно уравновешенной буфером с 0,2 М NH_4OAc , pH 6. Добавляли НРЕМ, меченный радиоактивным йодом, и смесь инкубировали в течение 60 мин при 40°C . Меченные радиоактивным изотопом белки очищали с применением колонок NAP-5.

[00101] Мечение с применением ^{177}Lu проводили так, как описано ранее (Altai 2017). Вкратце, конъюгированный с DOTA белок (80 мкг, 6,2 нмоль) в буфере с 1 М аскорбата, pH 5,5, смешивали с 345 МБк ^{177}Lu в 0,1 М HCl. Смесь инкубировали в течение 45 мин при 95°C . После этого добавляли 5000-кратный молярный избыток EDTA для захвата слабосвязанного нуклида и смесь инкубировали в течение 15 мин при 95°C . Меченные радиоактивным изотопом белки очищали с применением колонок NAP-5.

[00102] Стабильность меток, представляющих собой радиоактивный йод, тестировали посредством 3-ч инкубации с 1000-кратным молярным избытком йодида калия. Стабильность мечения с применением ^{177}Lu оценивали посредством 3-часового контроля с применением 5000-кратного молярного избытка EDTA.

Оценивание *in vitro*

[00103] Линии клеток приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Виргиния). Специфичность связывания меченных радиоактивным изотопом производных ADAPT6 с HER2-экспрессирующими раковыми клетками оценивали с применением линий клеток карциномы яичника SKOV-3 и карциномы молочной железы BT474 с применением способа насыщения, описанного ранее (Wällberg 2008). Аффинность меченных радиоактивным изотопом конъюгатов, связывающихся с живыми HER2-экспрессирующими клетками SKOV-3, определяли с применением LigandTracer (Ridgeview Instruments AB) по общепринятому способу, описанному ранее (Tolmachev 2014). Интернализацию меченных радиоактивным изотопом производных ADAPT6 клетками SKOV-3 и BT474 в ходе непрерывной инкубации оценивали посредством модифицированного способа с промывкой кислотой, описанного ранее (Wällberg 2008).

Исследования на животных

[00104] Исследования на животных планировали согласно национальному законодательству Швеции о защите лабораторных животных, и они были одобрены Комитетом по этике проведения исследований на животных в Уппсале.

[00105] Биораспределение и свойства нацеливания оценивали на мышах BALB/C nu/nu, несущих HER2-положительные ксенотрансплантаты SKOV-3. В качестве контроля специфичности использовали HER2-отрицательные ксенотрансплантаты Ramos. Для получения ксенотрансплантатов подкожно имплантировали 10^7 клеток.

Измерения биораспределения

[00106] Для уменьшения количества мышей, несущих опухоли, использовали подход с применением двух меток. Мышам в хвостовую вену путем инъекции вводили смесь ^{125}I - и ^{177}Lu -меченных вариантов ADAPT6 (15 кБк ^{125}I и 90 кБк ^{177}Lu на животное в 100 мл PBS). Общую дозу белка, вводимого путем инъекции, доводили до 3 мкг/мышь в случае неслитых ADAPT6 и 6 мкг/мышь для слитых с ABD вариантов с применением соответствующего немеченого белка. После обескровливания под анестезией хирургическим путем получали представляющие интерес орган и ткани и измеряли в них

активность с применением автоматического гамма-спектрометра (1480 WIZARD; Wallac Oy). Активность измеряли в энергетическом интервале от 10 до 45 кэВ в случае ^{125}I и от 90 до 370 кэВ в случае ^{177}Lu .

[00107] Для оценивания влияния продукта слияния с ABD_{035} сравнивали влияние позиционирования ABD_{035} относительно фрагмента ADAPT6 и химической природы метки, биораспределения $\text{MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)}_3\text{-ABD}_{035}\text{-GSSC-HPEM-}^{125}\text{I}$, $\text{MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)}_3\text{-ABD}_{035}\text{-GSSC-DOTA-}^{177}\text{Lu}$, $\text{MG-DEAVDANS-ABD}_{035}\text{-(SSSG)}_3\text{-ADAPT6-GSSC-HPEM-}^{125}\text{I}$, $\text{MG-DEAVDANS-ABD}_{035}\text{-(SSSG)}_3\text{-ADAPT6-GSSC-DOTA-}^{177}\text{Lu}$, $\text{MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-HPEM-}^{125}\text{I}$ и $\text{MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ через 48 ч после инъекции. В данном эксперименте использовали пять мышей на группу. Средний вес мыши составлял $16,9 \pm 0,6$ г, и средний вес опухоли составлял $0,42 \pm 0,6$ г.

[00108] Для дозиметрической оценки наиболее перспективных вариантов, $\text{MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)}_3\text{-ABD}_{035}\text{-GSSC-HPEM-}^{125}\text{I}$ и $\text{MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)}_3\text{-ABD}_{035}\text{-GSSC-DOTA-}^{177}\text{Lu}$, измеряли их биораспределение через 4, 24, 48, 72, 168 и 336 ч после инъекции мышам, несущим ксенотрансплантаты SKOV-3 (средний вес мыши составлял $16,3 \pm 1,3$ г, и средний вес опухоли составлял $0,11 \pm 0,06$ г). Для контроля того, что поглощение опухолью является HER2-специфическим, через 48 часов после инъекции измеряли биораспределение данных конъюгатов у мышей, несущих HER2-отрицательные ксенотрансплантаты Ramos (средний вес опухоли составлял $0,11 \pm 0,06$ г). В данном эксперименте использовали по четыре мыши на точку сбора данных. Дозиметрическую оценку проводили так, как описано ранее (Westerlund 2019).

Радионуклидная терапия

[00109] Для оценки терапевтического эффекта ADAPT6, слитого с ABD, каждой мыши подкожно в брюшную полость имплантировали 10^7 клеток SKOV-3. По меньшей мере два раза в неделю мышей взвешивали и визуально осматривали и опухоли измеряли с применением электронных штангенциркулей. Объемы опухолей (мм^3) рассчитывали как $[\text{длина (мм)}] \cdot [\text{ширина (мм)}]^2 \cdot 0,5$. Животных подвергали эвтаназии при достижении опухолями размера 1000 мм^3 , или при изъязвлении, или при падении веса животного более чем на 10% в течение 1 недели или более чем на 15% с начала исследования. После эвтаназии опухоли и почки вырезали хирургическим путем для последующей гистологической оценки.

[00110] Обработку начинали через 7 дней после имплантации опухоли при достижении среднего объема опухоли $0,07 \pm 0,02$ мм³ и среднего веса мышцы $15,1 \pm 0,4$ г. Мышей случайным образом разделяли на 5 групп по 11 животных в каждой. Первой группе подвергаемых обработке животных путем инъекции вводили 6 мкг (4,7 нмоль)/18 МБк MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu. Животные во второй группе обработки получали две обработки, первую в день 7 и вторую через три недели после первой. Контрольная группа 1 получала только среду-носитель, PBS. Для оценивания влияния немеченого слитого с ABD ADAPT6 на рост опухоли контрольной группе 2 путем инъекции вводили 6 мкг (4,7 нмоль) немеченого MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА. Для оценивания влияния ненацеливающегося меченого радиоактивным изотопом белка контрольной группе 3 путем инъекции вводили только MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu (6 мкг/18 МБк).

[00111] Для подтверждения нацеливания на опухоль проводили СРЕСТ/СТ-визуализацию. Визуализацию мыши проводили через 72 ч так, как описано в (Westerlund 2018).

ПРИМЕРЫ - РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение, очистка, конъюгация и определение характеристик нацеливающихся белков

[00112] Все белки, использованные в данном исследовании, получали в *E. coli* и очищали до гомогенного состояния. Для установления оптимальной длины линкера с повторами SSSG между HBR и ABR проводили SPR-анализ связывания для сравнения степеней аффинности между вариантами со спейсерной областью (SSSG)₃ и более длинной спейсерной областью (SSSG)₅. Как можно видеть в таблице 1, при увеличении длины спейсерной области с 12 до 20 аминокислотных остатков данные SPR свидетельствуют об отсутствии повышения аффинности. Поэтому остальная часть исследования была сосредоточена на более коротких вариантах.

[00113] Таблица 1. Константы аффинности белков, слитых с ABD, относительно HSA, MSA и HER2. Все варианты демонстрировали сходные степени аффинности независимо от расположения ABD и длины линкера.

	SEQ ID NO:№	K _D (MSA), M	K _D (HSA), M	K _D (HER2), M
MG-DEAVDANS-ADAPT6- (SSSG) ₃ -ABD ₃₅ -GSSC	27	1,76×10 ⁻⁹	4,98×10 ⁻¹¹	4,67×10 ⁻⁹
MG-DEAVDANS-ABD ₃₅ -(SSSG) ₃ - ADAPT6-GSSC	28	1,83×10 ⁻⁹	5,21×10 ⁻¹¹	5,20×10 ⁻⁹
MG-DEAVDANS-ADAPT6- (SSSG) ₅ -ABD ₃₅ -GSSC	29	1,80×10 ⁻¹¹	5,38×10 ⁻¹¹	4,45×10 ⁻⁹
MG-DEAVDANS-ABD ₃₅ -(SSSG) ₅ - ADAPT6-GSSC	30	1,33×10 ⁻¹¹	5,20×10 ⁻¹¹	4,32×10 ⁻⁹

[00114] Степень чистоты вариантов, предназначенных для исследований *in vivo*, определяли посредством RP-HPLC как более 95% (фигура 2), и посредством масс-спектрометрии подтверждали надлежащую массу всех белков (таблица 2).. Результаты анализа кругового дихроизма свидетельствовали о высоком содержании альфа-спиралей, а также о способности к полному рефолдингу после тепловой обработки образца (фигура 3). Все варианты демонстрировали высокие температуры плавления, почти идентичные таковым у неслитого контроля (MGDEAVDANS-ADAPT6-GSSC).

[00115] Таблица 2. Теоретические и экспериментальные значения молекулярной массы слитых белков, использованных в данном исследовании.

	Без DOTA		С DOTA	
	Теоретическая MW (Да)	Измеренная MW (Да)	Теоретическая MW (Да)	Измеренная MW (Да)
MG-DEAVDANS- ADAPT6-(SSSG) ₃ -ABD ₃₅ - GSSC (SEQ ID NO:27)	12338,96	12338,45	12865,50	12864,69
MG-DEAVDANS-ABD ₃₅ - (SSSG) ₃ -ADAPT6-GSSC (SEQ ID NO:28)	12338,96	12338,46	12865,50	12864,69
MG-DEAVDANS- ADAPT6-GSSC (SEQ ID NO:26)	6292,10	6291,21	6818,64	6817,47

MG-DEAVDANS- ADAPT _{Neg} -(SSSG) ₃ - ABD ₃₅ -GSSC (SEQ ID NO:20)	-	-	12749,33	12748,62
--	---	---	----------	----------

[00116] По результатам SPR-измерений слитых с ABD конструкций были выявлены сходные степени аффинности к HER2 (около 5 нМ), независимо от размещения ABD. Это сравнимо с ранее определенной аффинностью неслитого контроля, составляющей 4 нМ (Garousi 2016). Аффинность к сывороточным альбуминам также была сходной у всех конструкций с измеренными степенями аффинности, составляющими около 1,8 нМ к MSA и около 50 пМ к HSA (фигура 4, таблица 1). На фигуре 4 также продемонстрировано одновременное связывание HER2 и HSA, поскольку слитые белки способны связывать HER2 также в присутствии насыщающих концентраций HSA. Для дополнительного подтверждения данного заявления можно увидеть, что насыщенные белки больше не связывали HSA/MSA.

[00117] Как упоминалось ранее, для применения в качестве контроля в исследованиях средств терапии был разработан слитый белок, не связывающийся с мишенью. Результаты SPR-измерений подтверждают, что трехточечные мутации эффективно устраняют связывание с HER2 (фигура 5).

Мечение радиоактивным изотопом

[00118] В таблице 3 представлены данные касательно значений радиохимического выхода и радиохимической чистоты. Все протоколы мечения были эффективными, и очистка с применением NAP-5 обеспечивала полное отсутствие неконъюгированного радионуклида. Радиохимический выход мечения НРЕМ с применением ¹²⁵I (ковалентное связывание) составлял 98%. Для экспериментальной терапии была получена максимальная молярная активность до 55,6 ГБк/мкмоль для MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu. Идентичность меченного радиоактивным изотопом производного ADAPT6 подтверждали посредством HPLC с радиоактивной меткой (фигуры 6 и 7). Все метки были стабильны в контрольных условиях (отсутствие измеряемого высвобождения радионуклида).

[00119] Таблица 3. Значения радиохимического выхода и чистоты меченных радиоактивным изотопом вариантов ADAPT6

	Радиохимический выход (%)	Радиохимическая чистота (%)
MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-HPEM- ¹²⁵ I	63±11	100
MG-DEAVDANS-ABD ₀₃₅ -(SSSG) ₃ -ADAPT6- GSSC-HPEM- ¹²⁵ I	65±25	100
MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG) ₃ -ABD ₀₃₅ - GSSC-HPEM- ¹²⁵ I	68±18	100
MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	96±1	100
MG-DEAVDANS-ABD ₀₃₅ -(SSSG) ₃ -ADAPT6- GSSC-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	94±0,1	100
MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG) ₃ -ABD ₀₃₅ - GSSC-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	94,1±0,1	100

Оценивание *in vitro*

[00120] Предварительное насыщение рецепторов HER2 в клетках немечеными конструкциями приводило к значимому ($p < 5 \times 10^{-5}$) снижению степени связывания всех меченных радиоактивным изотопом вариантов ADAPT6 с обеими линиями клеток SKOV-3 и BT-474. Данные касательно связывания и обработки меченных радиоактивным изотопом производных ADAPT6 HER2-экспрессирующими клетками представлены на фигурах 8 и 9. Паттерн связывания слитого с ABD₀₃₅ меченного радиоактивным металлом варианта был схож с паттерном неслитого варианта; быстрое связывание в течение первых двух часов с последующим несколько более медленным повышением. Данные для неслитого варианта очень напоминали данные для ¹¹¹In-меченного аналога (Lindbo 2018). Скорость интернализации в случае всех вариантов была низкой, и через 24 ч интернализировалось менее 20% связанных с клетками активных молекул.

[00121] Данные касательно аффинности меченных радиоактивным изотопом производных ADAPT6 к живым HER2-экспрессирующим клеткам представлены в таблице 4 и на фигуре 10. Все варианты демонстрировали два типа взаимодействия с HER2 на живых клетках: сильное с субнаномолярной кажущейся константой диссоциации и более слабое с константой диссоциации в диапазоне 20-50 нМ. Отсутствовало очевидное отрицательное влияние слияния с ABD₀₃₅ на силу связывания ADAPT6 с HER2-экспрессирующими клетками.

[00122] Таблица 4. K_D взаимодействия меченных радиоактивным изотопом вариантов ADAPT6 с HER2-экспрессирующими клетками SKOV-3, определенная с применением LigandTracer.

	K_D1 (пМ)	K_D2 (нМ)
MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-HPEM- ^{125}I	410±175	27±7
MG-DEAVDANS-ABD $_{035}$ -(SSSG) $_3$ -ADAPT6-GSSC-HPEM- ^{125}I	150±25	28±2
MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG) $_3$ -ABD $_{035}$ -GSSC-HPEM- ^{125}I	600±140	36±9
MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-DOTA- ^{177}Lu	337±150	41±9
MG-DEAVDANS-ABD $_{035}$ -(SSSG) $_3$ -ADAPT6-GSSC-DOTA- ^{177}Lu	432±158	38±1
MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG) $_3$ -ABD $_{035}$ -GSSC-DOTA- ^{177}Lu	485±88	33±4

Измерения биораспределения

[00123] Влияние слияния с ABD $_{035}$ продемонстрировано на фигуре 11 с применением конъюгатов с меткой ^{177}Lu , остающейся в лизосомах после расщепления связанного с ней белка. Биораспределение MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-DOTA- ^{177}Lu было типичным для меченных радиоактивным металлом производных данного белка (Lindbo 2018), т. е. достаточно высокое поглощение опухолью, быстрый клиренс из крови и других тканей, очень высокая реабсорбция и сохранение активности в почках. Слияние с ABD значительно изменяет паттерн биораспределения. Удержание в крови повышалось в более чем 200 раз в случае обоих вариантов. Накопление активных молекул в почках снижалось в 10 раз в случае MG-DEAVDANS-ABD $_{35}$ -(SSSG) $_3$ -ADAPT6-GSSC-DOTA- ^{177}Lu и в 14 раз в случае MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG) $_3$ -ABD $_{35}$ -GSSC-DOTA- ^{177}Lu . В то же время поглощение опухолью слитого с ABD ADAPT6 было более чем в 3 раза выше, чем в случае MG-DEAVDANS-ADAPT6-GSSC-DOTA- ^{177}Lu . В обоих случаях поглощение опухолью было выше, чем поглощение почками.

[00124] Влияние на биораспределение, обусловленное расположением области ABD $_{035}$ относительно области ADAPT6, а также химической природой метки, показано на фигуре 12. В случае ^{125}I -меченных слитых белков поглощение опухолью является относительно высоким (приблизительно 15-20%), особенно по сравнению с поглощением почками. В случае мечения с применением ^{125}I также наблюдается небольшая тенденция к более высокому поглощению опухолью слитого белка на основе ADAPT6-ABD $_{35}$, чем

слитого белка на основе ABD₃₅-ADAPT6. В случае ¹⁷⁷Lu-меченных слитых белков поглощение опухолью было еще выше (свыше 25%). Наиболее высокое поглощение опухолью (приблизительно 30%) наблюдается в случае ¹⁷⁷Lu-меченного слитого белка на основе ADAPT6-ABD₃₅. В случае ¹⁷⁷Lu-меченных слитых белков поглощение почками выше, чем в случае ¹²⁵I-меченных слитых белков, но все же намного ниже, чем в случае эталонного продукта без ABD₃₅. Размещение ABD₃₅ на С-конце ADAPT6 приводило к более благоприятному соотношению опухоль/почка в случае метки ¹⁷⁷Lu.

[00125] Данные касательно биораспределения MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I и MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu через не более 48 часов после инъекции представлены на фигуре 13 и в таблицах 5 и 6. Результаты теста в отношении специфичности *in vivo* демонстрировали, что через 48 ч после инъекции поглощение обоих вариантов значимо ($p < 0,005$) выше у HER2-положительных ксенотрансплантатов по сравнению с HER2-отрицательными ксенотрансплантатами (фигура 13). Разница была 14-17-кратной.

[00126] Данные по биораспределению (таблицы 5 и 6) демонстрируют медленный клиренс активной молекулы из крови. Периоды биологического полувыведения из крови составляли 29,4 (95% CI 25,7-33,7) и 28,4 (95% CI 24,6-32,8) ч в случае MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I и MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu соответственно. Уровень активности в крови был несколько, но значимо ($p < 0,05$ при парном *t*-критерии) выше в случае метки, представляющей собой радиоактивный йод, во всех временных точках. Оба конъюгата демонстрировали эффективное нацеливание, так как уже через 24 ч поглощение в HER2-положительных опухолях превышало поглощение в любом другом органе или тканях в случае обоих вариантов. Начиная с 72 ч после инъекции поглощение опухолью было выше в случае метки ¹⁷⁷Lu. В целом, применение ¹⁷⁷Lu обеспечивало значимо более высокие соотношения содержания в опухоли к содержанию в крови, но более низкие соотношения содержания в опухоли к содержанию в почках по сравнению с меткой ¹²⁵I.

[00127] Таблица 5. Биораспределение MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu у мышей BALB/C nu/nu, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3. Данные выражены в виде %ID/г и представляют собой средние значения от 4 животных \pm SD.

	4 ч	24 ч	48 ч	72 ч	168 ч	336 ч
--	-----	------	------	------	-------	-------

Кровь	27±2	17±2	11,9±0,4	8,2±1, 4	2,5±0,5	0,29±0,0 8
Сердце	8±2	6±1	5,0±0,7	4,2±0, 7	1,8±0,4	0,97±0,0 7
Легкое	12±4	8±1	6±2	5,3±0, 7	2,3±0,6	0,82±0,0 7
Слюнная железа	4,8±0,5	4,8±0,6	4,3±0,3	4,9±0, 5	2, 6±0,4	1,2±0,2
Печень	6,0±0,7	4,8±0,3	5,2±0,3	6,2±0, 6	3,5±0,8	1,3±0,2
Селезенка	4,7±0,8	6,2±0,4	6,8±1,0	6,6±0, 3	7±3	3,8±0,5
Поджелудочная железа	2,6±0,5	1,8±0,2	1,9±0,1	1,6±0, 5	0,8±0,3	0,52±0,0 7
Желудок	2,3±0,3	1,8±0,3	1,4±0,2	1,3±0, 1	0,6±0,2	0,4±0,1
Тонкий кишечник	2,8±0,6	2,5±0,5	1,9±0,2	1,7±0, 1	0,7±0,3	0,35±0,0 6
Толстый кишечник	2,4±0,2	2,1±0,2	1,5±0,5	1,6±0, 3	0,8±0,4	0,5±0,1
Почка	10,8±1, 3	10,9±0,7	9,6±0,7	9,3±0, 7	5±1	1,6±0,2
Опухоль	9±2	26±4	35±12	30±5	25±13	5±1
Кожа	5±2	6,1±0,9	6,2±0,9	7,0±0, 3	4,4±0,5	1,3±0,4
Мышца	1,5±0,2	1,58±0,0 9	1,3±0,2	1,2±0, 6	0,57±0,0 9	0,31±0,0 8
Кость	2,2±0,2	2,3±0,2	3,02±1,5 5	1,8±0, 1	1,1±0,1	0,7±0,1
Головной мозг	0,5±0,1	0,5±0,2	0,5±0,1	0,3±0, 1	0,10±0,0 1	0,13±0,0 2

[00128] Таблица 6. Биораспределение MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPREM-¹²⁵I у мышей BALB/C nu/nu, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3. Данные выражены в виде %ID/г и представляют собой средние значения от 4 животных ± SD.

	4 ч	24 ч	48 ч	72 ч	168 ч	136 ч
Кровь	31±2	19±2	13,5±0,5	9±2	2,8±0,6	0,45±0,09
Сердце	9±2	5±1	4,0±0,7	3,1±0,6	0,7±0,3	0,13±0,05
Легкое	14±4	8±2	5,4±0,9	4,7±0,7	1,3±0,4	0,18±0,04
Слюнная железа	5,5±0, 7	4,2±0,6	2,8±0,2	2,4±0,3	0,6±0,2	0,09±0,01
Печень	6,1±0, 8	3,2±0,3	2,6±0,2	2,4±0,3	0,6±0,1	0,11±0,02
Селезенка	4,3±1, 0	2,7±0,2	2,1±0,3	1,7±0,4	0,8±0,3	0,22±0,06
Поджелудочная железа	3,0±0, 6	1,9±0,3	1,5±0,2	1,1±0,3	0,28±0,0 6	0,05±0,02
Желудок	2,7±0, 3	1,8±0,1	1,2±0,1	1,1±0,2	0,28±0,0 6	0,05±0,01
Тонкий кишечник	3,3±0, 5	2,3±0,3	1,50±0,0 6	1,2±0,1	0,3±0,1	0,04±0,01
Толстый кишечник	2,9±0, 2	2,2±0,2	1,3±0,3	1,3±0,1	0,3±0,1	0,05±0,01
Почка	8±1	5,5±0,3	3,8±0,3	3,1±0,4	0,8±0,2	0,14±0,02
Опухоль	10±2	22±2	20±2	17±3	8±5	0,6±0,3
Кожа	5±2	5,1±0,6	3,4±0,1	2,74±0,0 9	1,1±0,4	0,10±0,02
Мышца	1,8±0, 2	1,57±0,0 7	1,1±0,1	0,8±0,2	0,24±0,0 3	0,03±0,02
Кость	2,6±0, 4	2,0±0,2	1,5±0,3	1,0±0,1	0,4±0,1	0,05±0,03
Головной мозг	0,5±0, 1	0,5±0,2	0,5±0,1	0,29±0,0 7	0,08±0,0 1	0,02 0,01

[00129] Данные по биораспределению из таблиц 5 и 6 можно сравнить с данными, представленными в документе Liu 2019 предшествующего уровня техники, в котором цитотоксический полипептид (PE38X8 или PE25) связан с С-концом слитого белка ADAPT6-ABD₀₃₅ (см. таблицы 7 и 8). Такое сравнение демонстрирует, что конъюгаты по настоящему изобретению приводят к значительно улучшенному биораспределению. Примечательно, что слитые токсины из Liu 2019 накапливаются в печени и/или почке, а это означает, что большая доля лекарственного средства не способна нацеливаться на опухоль и что со стороны печени и/или почки ожидаются тяжелые и, вероятно, неприемлемые побочные эффекты. Через 24 часа после инъекции соотношение содержания в крови к содержанию в почках является очень низким (0,04 и 0,12 соответственно) в Liu 2019, но намного выше (1,6 и 3,5 соответственно) в случае конъюгатов по настоящему изобретению, содержащих цитотоксические радионуклиды. Аналогично, соотношение содержания в крови к содержанию в печени через 24 ч после инъекции является очень низким (0,3 и 0,04 соответственно) в Liu 2019, но намного выше в случае конъюгатов по настоящему изобретению, содержащих цитотоксические радионуклиды (3,5 и 5,9 соответственно). Примечательно, что в данный момент времени в Liu 2019 не продемонстрирована концентрация в крови, превышающая 1,8%, несмотря на наличие альбуминсвязывающей области ABD₀₃₅. Напротив, концентрация конъюгатов по настоящему изобретению в крови составляет 17% и 19% соответственно.

[00130] Таблица 7. Биораспределение через 4 ч после инъекции MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu ("изобретение 1") и MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPeM-¹²⁵I ("изобретение 2") по сравнению с биораспределением ADAPT6-ABD₀₃₅-PE38X8 ("Liu 1") и ADAPT6-ABD₀₃₅-PE25 ("Liu 2"), представленным в Liu 2019. "Соотношение В/К" означает соотношение содержания в крови к содержанию в почках. "Соотношение В/Л" означает соотношение содержания в крови к содержанию в печени.

	Изобретение 1	Изобретение 2	Liu 1	Liu 2
Кровь	27±2	31±2	9,0±0,7	3,2±0,1
Сердце	8±2	9±2	3,0±0,8	1,1±0,2
Легкое	12±4	14±4	3,3±0,4	1,3±0,1
Слюнная железа	4,8±0,5	5,5±0,7	1,5±0,2	0,7±0,2

Печень	6,0±0,7	6,1±0,8	9,0±0,4	43,0±7,0
Селезенка	4,7±0,8	4,3±1,0	3,3±0,3	19,0±4,0
Поджелудочная железа	2,6±0,5	3,0±0,6	0,9±0,2	0,4±0,1
Желудок	2,3±0,3	2,7±0,3	1,0±0,1	0,5±0,2
Тонкий кишечник	2,8±0,6	3,3±0,5	N/A	N/A
Толстый кишечник	2,4±0,2	2,9±0,2	N/A	N/A
Почка	10,8±1,3	8±1	58,0±3,0	13,0±1,0
Опухоль	9±2	10±2	N/A	N/A
Кожа	5±2	5±2	1,8±0,3	0,6±0,1
Мышца	1,5±0,2	1,8±0,2	0,7±0,1	0,3±0,1
Кость	2,2±0,2	2,6±0,4	1,3±0,1	1,1±0,3
Головной мозг	0,5±0,1	0,5±0,1	N/A	N/A
Соотношение В/К	2,5	3,9	0,16	0,25
Соотношение В/L	4,5	5,1	1	0,07

[00131] Таблица 8. Биораспределение через 24 ч после инъекции MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOТА-¹⁷⁷Lu ("изобретение 1") и MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-HPЕM-¹²⁵I ("изобретение 2") по сравнению с биораспределением ADAPT6-ABD₀₃₅-PE38X8 ("Liu 1") и ADAPT6-ABD₀₃₅-PE25 ("Liu 2"), представленным в Liu 2019. "Соотношение В/К" означает соотношение содержания в крови к содержанию в почках. "Соотношение В/L" означает соотношение содержания в крови к содержанию в печени.

	Изобретение 1	Изобретение 2	Liu 1	Liu 2
Кровь	17±2	19±2	1,8±0,1	1,3±0,2
Сердце	6±1	5±1	1,0±0,1	0,7±0,2
Легкое	8±1	8±2	1,0±0,2	0,8±0,1
Слюнная железа	4,8±0,6	4,2±0,6	0,7±0,1	0,6±0,1
Печень	4,8±0,3	3,2±0,3	6,0±1,0	32,0±5,0

Селезенка	6,2±0,4	2,7±0,2	2,2±0,4	11,4±1,3
Поджелудочная железа	1,8±0,2	1,9±0,3	0,4±0,1	0,4±0,2
Желудок	1,8±0,3	1,8±0,1	0,5±0,1	0,4±0,2
Тонкий кишечник	2,5±0,5	2,3±0,3	N/A	N/A
Толстый кишечник	2,1±0,2	2,2±0,2	N/A	N/A
Почка	10,9±0,7	5,5±0,3	46,0±2,0	11,0±1,0
Опухоль	26±4	22±2	N/A	N/A
Кожа	6,1±0,9	5,1±0,6	1,3±0,3	0,7±0,2
Мышца	1,58±0,09	1,57±0,07	0,4±0,1	0,3±0,1
Кость	2,3±0,2	2,0±0,2	0,7±0,2	0,8±0,2
Головной мозг	0,5±0,2	0,5±0,2	N/A	N/A
Соотношение В/К	1,6	3,5	0,04	0,12
Соотношение В/L	3,5	5,9	0,3	0,04

Радионуклидная терапия

[00132] Визуализация, проведенная в ходе экспериментальной терапии через 72 часа после инъекции (фигура 14), подтверждала данные по биораспределению, демонстрирующие, что ^{177}Lu накапливался в опухолях в гораздо более высокой степени, чем в любой из нормальных тканей.

[00133] Данные по росту опухоли (фигура 15) отражают влияние обработки. Значения времени удвоения объема опухоли составляли 7,0 (95% CI, 6,0-8,3), 8,0 (95% CI, 7,0-9,1) и 10,5 (95% CI, 7,6-15,3) дня в случае групп мышей, обработанных с помощью PBS, немеченного MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA и MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA- ^{177}Lu соответственно. У мышей, обработанных с помощью MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA- ^{177}Lu , за первоначальным ростом опухоли следовало ее сокращение (через 11 дней), и повторный рост опухоли начинался примерно только через 30 дней в группе, обработанной посредством однократной инъекции MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA- ^{177}Lu . Такой паттерн роста опухоли оказывал очевидное влияние на выживаемость (фигура 16). Медианная выживаемость в контрольных группах составляла 25, 25 и 31 день в случае обработки с помощью PBS, немеченного MG-DEAVDANS-

ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA и MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu соответственно. Обработка с помощью MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu незначительно, но значимо повышает выживаемость по сравнению с выживаемостью мышей, обработанных веществами, не содержащими радиоактивных изотопов. Медианная выживаемость в группе, получающей однократную инъекцию MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu, составляла 70 дней, что значимо ($p < 0,0001$) дольше, чем медианная выживаемость мышей в группе, обработанной с помощью MG-DEAVDANS-ADAPT_{Neg}-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu. В данной группе у животного с опухолью объемом 152 мм³ в начале терапии наблюдали почти полное исчезновение опухоли на день 62, что сохранялось до конца исследования (день 90). В группе, обработанной посредством двух инъекций MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu, умертвить пришлось (только) одну мышь (на день 29 по причине потери веса тела). Остальные животные характеризовались заметным снижением веса через 11-14 дней после первой обработки. К дню 90 одна опухоль демонстрировала повторный рост (с временем удвоения 16 дней), но, тем не менее, объемы опухоли были меньше 120 мм³ у всех остальных животных в данной группе.

[00134] Данная терапия переносилась хорошо. Внешний вид кожи, жировых подушечек и глаз у обработанных и необработанных мышей не отличался, а также отсутствовало поведение, указывающее на боль или страдание. Средний вес животного значимо не отличался между обработанными группами и контрольными группами (данные не показаны). Средний вес в группах, обработанных с помощью MG-DEAVDANS-ADAPT6-(SSSG)₃-ABD₀₃₅-GSSC-DOTA-¹⁷⁷Lu, возрастал в промежутке от дня 28 до дня 90, что отражает восстановление после заболевания и обработки (данные не показаны).

ПЕРЕЧЕНЬ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

[00135] Altai M, Westerlund K, Vellella J, Mitran B, Honarvar H, Karlström AE. Evaluation of affibody molecule-based PNA-mediated radionuclide pretargeting: Development of an optimized conjugation protocol and ¹⁷⁷Lu labeling. Nucl Med Biol. 2017 Nov;54:1-9.

[00136] Garousi J, Lindbo S, Nilvebrant J, Åstrand M, Buijs J, Sandström M, Honarvar H, Orlova A, Tolmachev V, Hober S. ADAPT, a Novel Scaffold Protein-Based Probe for Radionuclide Imaging of Molecular Targets That Are Expressed in Disseminated Cancers. Cancer Res. 2015 Oct 15;75(20):4364-71.

- [00137] Garousi J, Lindbo S, Honarvar H, Velletta J, Mitran B, Altai M, Orlova A, Tolmachev V, Hober S. Influence of the N-Terminal Composition on Targeting Properties of Radiometal-Labeled Anti-HER2 Scaffold Protein ADAPT6. *Bioconjug Chem*. 2016 Nov 16;27(11):2678-2688.
- [00138] Garousi J, Lindbo S, Borin J, von Witting E, Vorobyeva A, Oroujeni M, Mitran B, Orlova A, Buijs J, Tolmachev V, Hober S. Comparative evaluation of dimeric and monomeric forms of ADAPT scaffold protein for targeting of HER2-expressing tumours. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019 Jan;134:37-48.
- [00139] Jonsson A, Dogan J, Herne N, Abrahmsén L, Nygren PA. Engineering of a femtomolar affinity binding protein to human serum albumin. *Protein Eng Des Sel*. 2008 Aug;21(8):515-27.
- [00140] Krasniqi A, D'Huyvetter M, Devoogdt N, Frejd FY, Sørensen J, Orlova A, Keyaerts M, Tolmachev V. Same-Day Imaging Using Small Proteins: Clinical Experience and Translational Prospects in Oncology. *J Nucl Med*. 2018 Jun;59(6):885-891.
- [00141] Lindbo S, Garousi J, Åstrand M, et al. Influence of histidine-containing tags on the biodistribution of ADAPT scaffold proteins. *Bioconjug Chem*. 2016;27:716-726.
- [00142] Lindbo S, Garousi J, Mitran B, Altai M, Buijs J, Orlova A, Hober S, Tolmachev V. Radionuclide Tumor Targeting Using ADAPT Scaffold Proteins: Aspects of Label Positioning and Residualizing Properties of the Label. *J Nucl Med*. 2018 Jan;59(1):93-99.
- [00143] Nilvebrant J, Hober S. The albumin-binding domain as a scaffold for protein engineering. *Comput Struct Biotechnol J*. 2013;6:1-8.
- [00144] Nilvebrant J, Hober S. Engineering of Bispecific Affinity Proteins with High Affinity for ERBB2 and Adaptable Binding to Albumin. *PLOS ONE*. August 2014, Volume 9, Issue 8.
- [00145] Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*. 2014 Jan 7;43(1):260-90.
- [00146] Tolmachev V, Mume E, Sjöberg S, Frejd FY, Orlova A. Influence of valency and labelling chemistry on in vivo targeting using radioiodinated HER2-binding Affibody molecules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36:692-701.
- [00147] Tolmachev V, Orlova A, Andersson K. Methods for radiolabelling of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*. 2014;1060:309-30.
- [00148] Westerlund K, Altai M, Mitran B, Konijnenberg M, Oroujeni M, Atterby C, de Jong M, Orlova A, Mattsson J, Micke P, Karlström AE, Tolmachev V. Radionuclide Therapy of

HER2-Expressing Human Xenografts Using Affibody-Based Peptide Nucleic Acid-Mediated Pretargeting: In Vivo Proof of Principle. *J Nucl Med.* 2018;59:1092-1098.

[00149] Wällberg H, Orlova A. Slow internalization of anti-HER2 synthetic affibody monomer ^{111}In -DOTA-ZHER2: 342-pep2: implications for development of labeled tracers. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008;23:435–442.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтический конъюгат, содержащий слитый белок и цитотоксический радионуклид, при этом цитотоксический радионуклид связан со слитым белком, где:

- слитый белок содержит и HER2-связывающую область (HBR), альбуминсвязывающую область (ABR) и спейсерную область;
- количество аминокислот в спейсерной области составляет по меньшей мере 7, например, 7-30;

– HBR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

i) $LAX_3AKX_6TX_8X_9YHLX_{13}X_{14}X_{15}GVX_{18}DX_{20}YKX_{23}LIDKX_{28}KT VEX_{33}VX_{35}AX_{37}YX_{39}X_{40}ILX_{43}ALP$, где независимо друг от друга

X_3 выбран из A, G, P, S и V;

X_6 выбран из D и E;

X_8 выбран из A и V;

X_9 выбран из L и N;

X_{13} выбран из D и T;

X_{14} выбран из K и R;

X_{15} выбран из I, L, M, T и V;

X_{18} выбран из S и A;

X_{20} выбран из F, Y и A;

X_{23} выбран из D и R;

X_{28} выбран из A и V;

X_{33} выбран из G, S и D;

X_{35} выбран из K, M и R;

X_{37} выбран из L и R;

X_{39} выбран из A, F и L;

X_{40} выбран из A и E, и

X_{43} выбран из A, H, K, P, R, T, Q и Y,

и ii) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в i), и

– ABR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

a) $LAX_3AKX_6X_7AX_9X_{10}ELDX_{14}YGVSDX_{20}YKX_{23}LIX_{26}X_{27}AKT VEGVX_{35}ALX_{38}X_{39}X_{40}ILX_{43}X_{44}LP$, где независимо друг от друга

X_3 выбран из E, S, Q и C;

X_6 выбран из E, S, V и C;

X_7 выбран из A, L и S;

X₉ выбран из L и N;

X₁₀ выбран из A, S и R;

X₁₄ выбран из A, S, C и K;

X₂₀ выбран из Y и F;

X₂₃ выбран из N, D и R;

X₂₆ выбран из N, D и E;

X₂₇ выбран из N и K;

X₃₅ выбран из K и E;

X₃₈ выбран из I и K;

X₃₉ выбран из D, E и L;

X₄₀ выбран из A, E и H;

X₄₃ выбран из A и K;

X₄₄ выбран из A, S и E;

L в положении 45 присутствует или отсутствует, и

R в положении 46 присутствует или отсутствует,

и b) аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, определенной в а).

2. Терапевтический конъюгат по п. 1, где цитотоксический радионуклид связан с концом слитого белка, таким как C-конец слитого белка.

3. Терапевтический конъюгат по п. 1 или п. 2, где спейсерная область соединяет C-конец HBR с N-концом ABR.

4. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где ABR содержит аминокислотную последовательность

LAX₃AKX₆X₇AX₉X₁₀ ELDX₁₄YGVSDX₂₀ YKX₂₃LIX₂₆X₂₇AKT VEGVX₃₅ALX₃₈X₃₉X₄₀

PLAALP, где независимо друг от друга

X₃ выбран из E и S;

X₆ выбран из E и V;

X₇ выбран из A и L;

X₉ выбран из L и N;

X₁₀ выбран из A и R;

X₁₄ выбран из A, S, C и K, предпочтительно из A, S и K;

X₂₀ выбран из Y и F;

X₂₃ выбран из N, D и R;

X₂₆ выбран из N и D;

X₂₇ выбран из N и K;

- X₃₅ выбран из К и Е;
- X₃₈ выбран из I и К;
- X₃₉ выбран из D и L;
- X₄₀ выбран из А, Е и Н;
- L в положении 45 присутствует или отсутствует, и
- P в положении 46 присутствует или отсутствует.

5. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где ABR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVEALKLH ILAALP (SEQ ID NO:1);
 LAEAKAANA ELDSYGVSDF YKRLIDKAKT VEGVEALKDA ILAALP (SEQ ID NO:2);
 GLAEAKEAAN AELDSYGVSD FYKRLIDKAK TVEGVEALKD AILAALP (SEQ ID NO:3);
 LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:4);
 и

LAEAKVLALR ELDKYGVSDY YKDLIDKAKT VEGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:5).

6. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где в аминокислотной последовательности i):

- X₃ выбран из А, G, P;
- X₆ представляет собой Е;
- X₉ представляет собой L;
- X₁₃ представляет собой D;
- X₁₄ представляет собой R;
- X₁₅ выбран из L и V;
- X₁₈ выбран из S и A;
- X₂₀ выбран из F, Y и A;
- X₂₈ представляет собой A;
- X₃₃ представляет собой G;
- X₃₅ выбран из К и R;
- X₃₇ представляет собой L;
- X₃₉ выбран из F и L;
- X₄₀ представляет собой Е, и
- X₄₃ выбран из H, P и R.

7. Терапевтический конъюгат по любому из пп. 1-5, где HBR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

LAAAKETALY HLDRLGVADA YKDLIDKAKT VEGVKARYFE ILHALP (SEQ ID NO:6);
 LAAAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAKT VEGVRALYLE ILPALP (SEQ ID NO:7);

LAPAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILHALP (SEQ ID NO:8);
 LAAAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVKALYFE ILHALP (SEQ ID NO:9);
 LAPAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILKALP (SEQ ID NO:10);
 LAGAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILTALP (SEQ ID NO:11);
 LAPAKETALY HLDRLGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILRALP (SEQ ID NO:12);
 LAGAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILRALP (SEQ ID NO:13);
 LAAAKETALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVMALYAE ILPALP (SEQ ID NO:14);
 LAGAKETALY HLDKTGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYLE ILQALP (SEQ ID NO:15);
 LAAAKETALY HLTRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILYALP (SEQ ID NO:16);
 и
 LASAKDTALY HLDRVGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYAE ILAALP (SEQ ID NO:17).

8. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где цитотоксический радионуклид выбран из группы, состоящей из ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{188}Re ; ^{186}Re ; ^{166}Ho , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{149}Tb , ^{161}Tb , ^{47}Sc ; ^{225}Ac ; ^{212}Pb ; ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{227}Th , ^{223}Ra ; $^{58\text{m}}\text{Co}$, ^{131}I , ^{76}As , ^{77}As и ^{211}At .

9. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где радионуклид представляет собой радиоактивный металл, и слитый белок конъюгирован с радиоактивным металлом с помощью хелатора, который ковалентно связан со слитым белком.

10. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где слитый белок содержит остаток цистеина (C), с которым связан радионуклид, при этом указанный остаток цистеина (C) предпочтительно является концевым остатком, таким как C-концевой остаток.

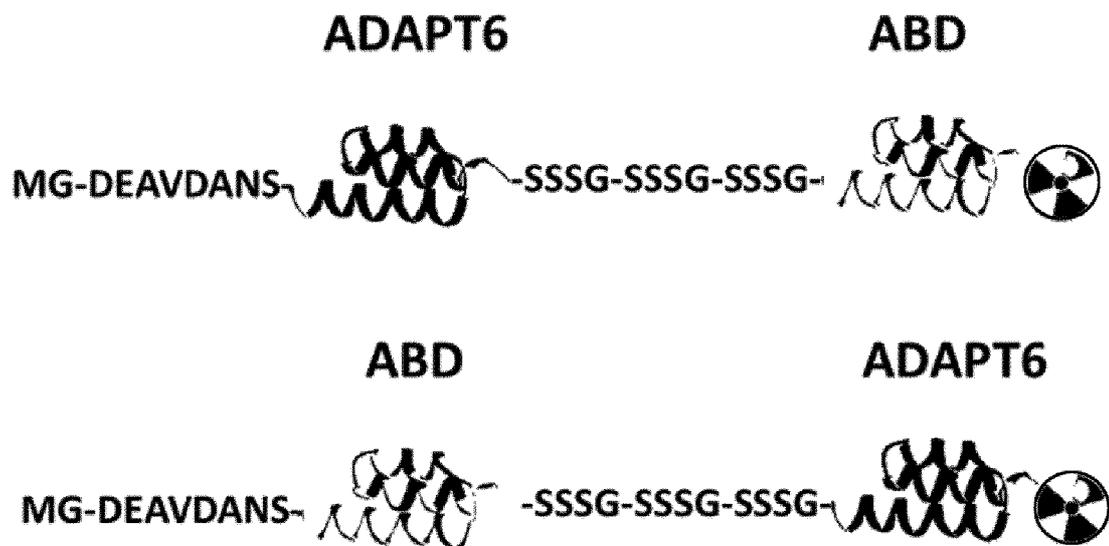
11. Терапевтический конъюгат по п. 10, где остаток цистеина (C) является единственным остатком цистеина (C) в слитом белке.

12. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где количество аминокислот в спейсерной области составляет по меньшей мере 8, например, 8-30, например, 8-20, предпочтительно 8-14, более предпочтительно 10-14.

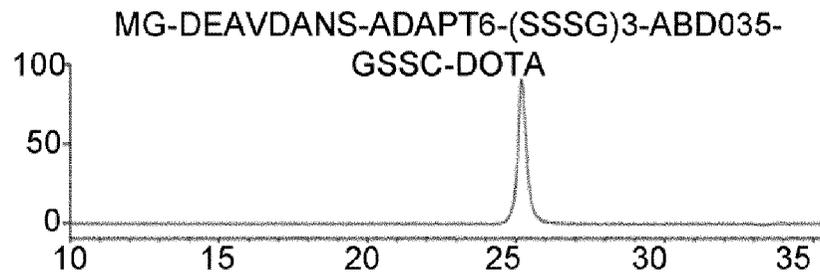
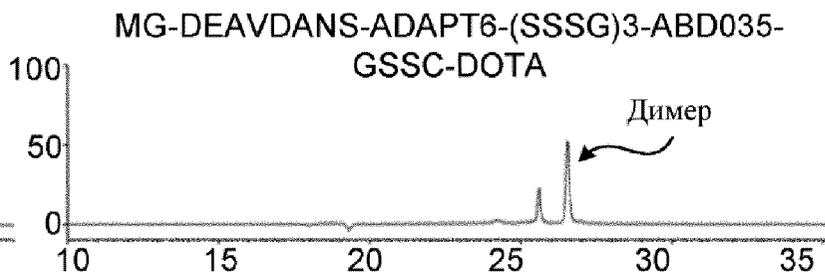
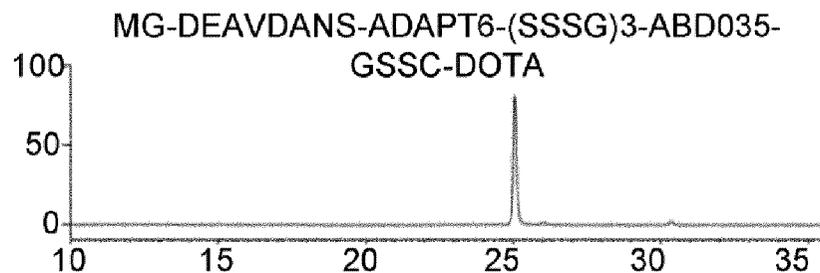
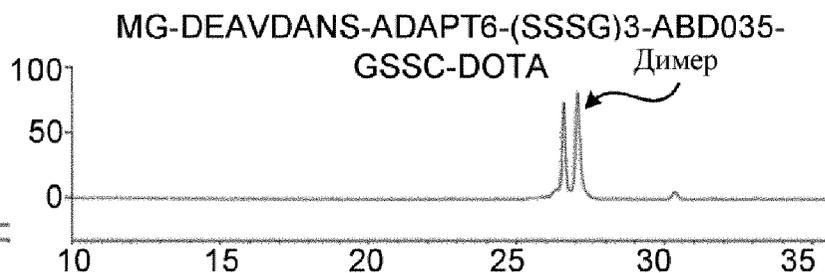
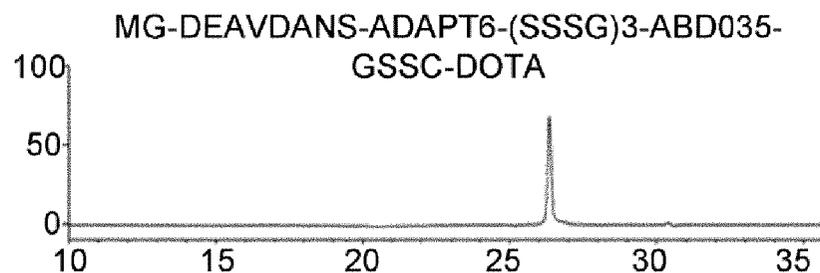
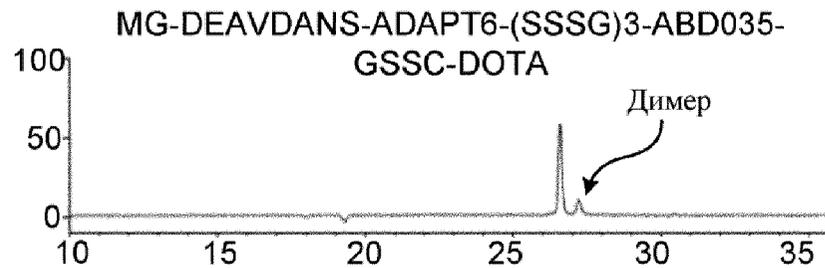
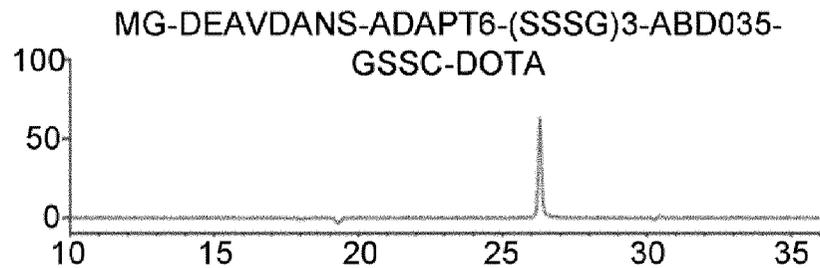
13. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов, который содержит не более 150 аминокислотных остатков, например, не более 130 аминокислотных остатков.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

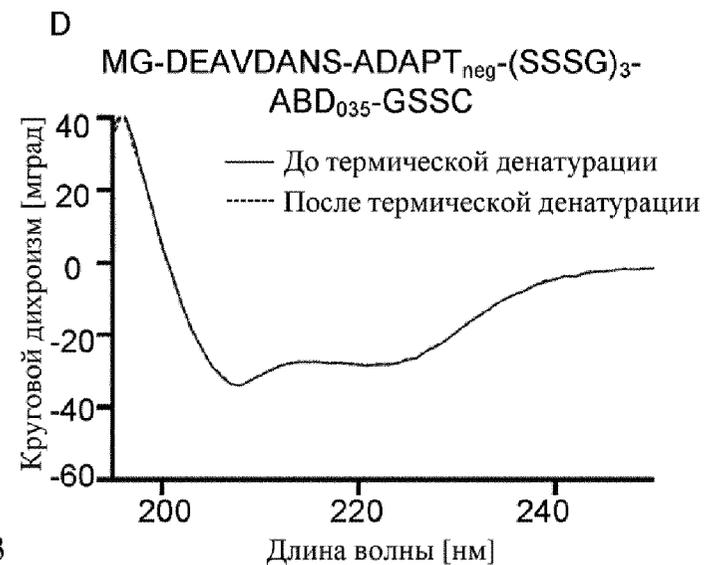
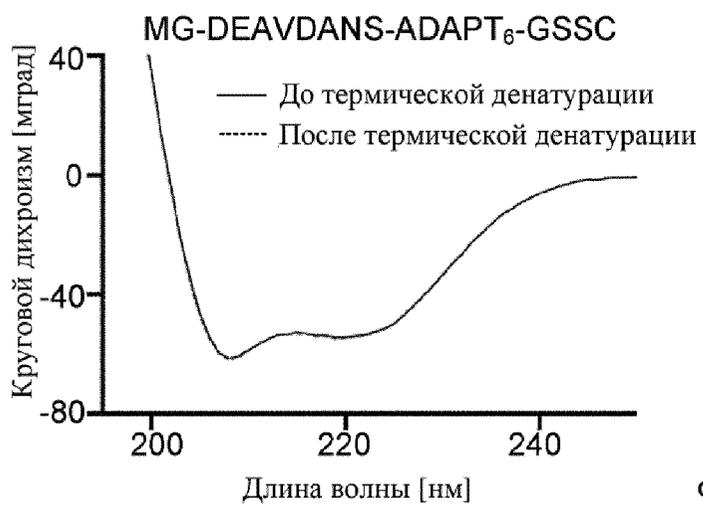
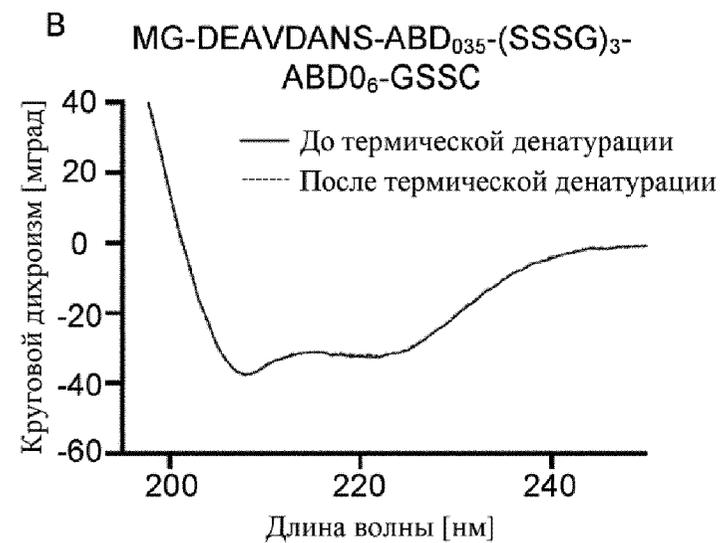
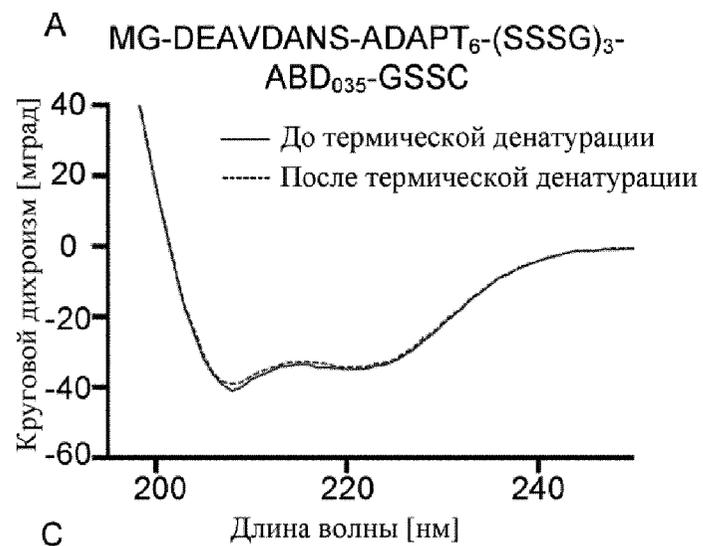
15. Терапевтический конъюгат по любому из предыдущих пунктов для применения в способе лечения рака, такого как рак молочной железы или рак желудка/гастроэзофагеальный рак.



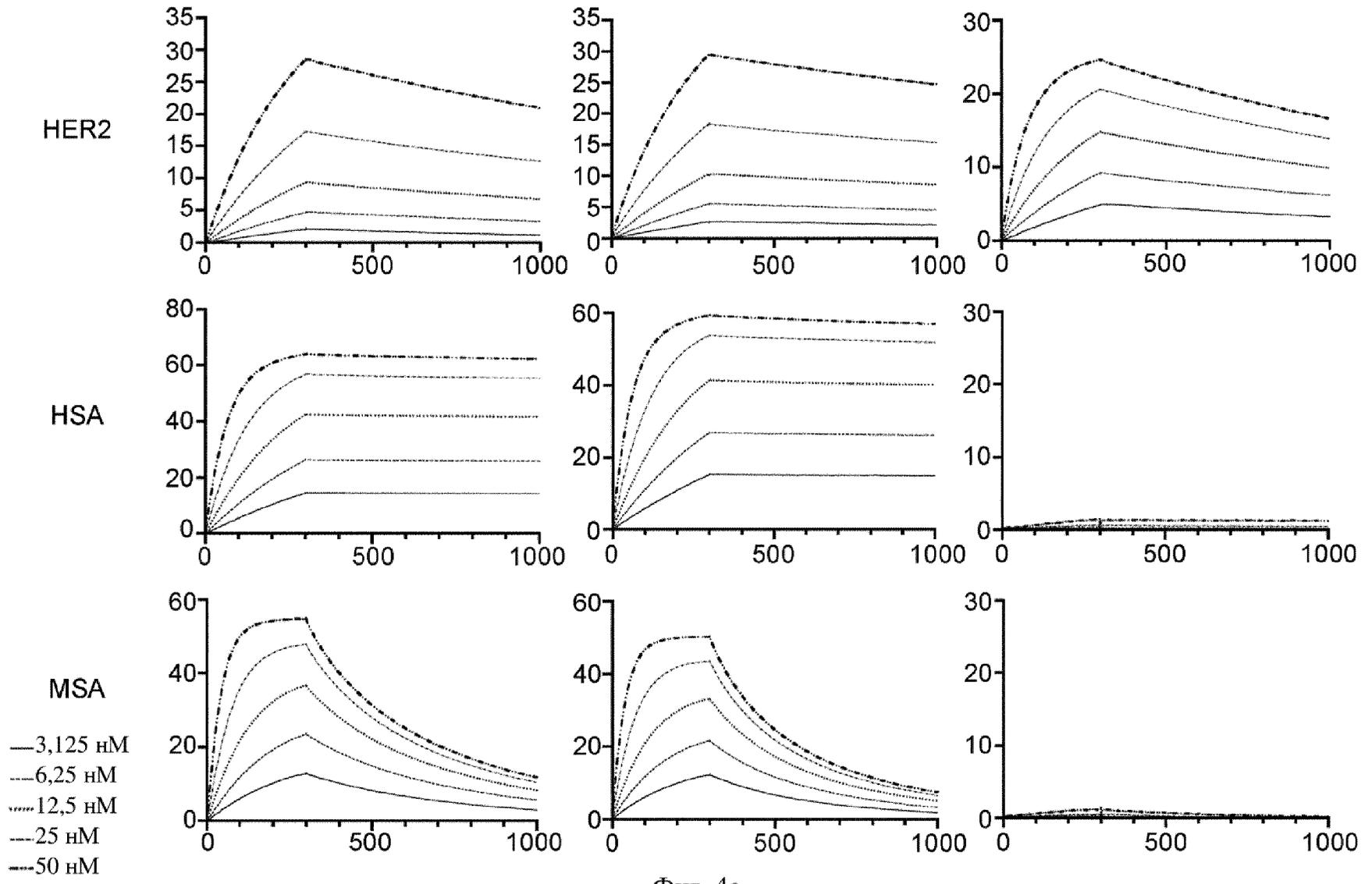
Фиг. 1



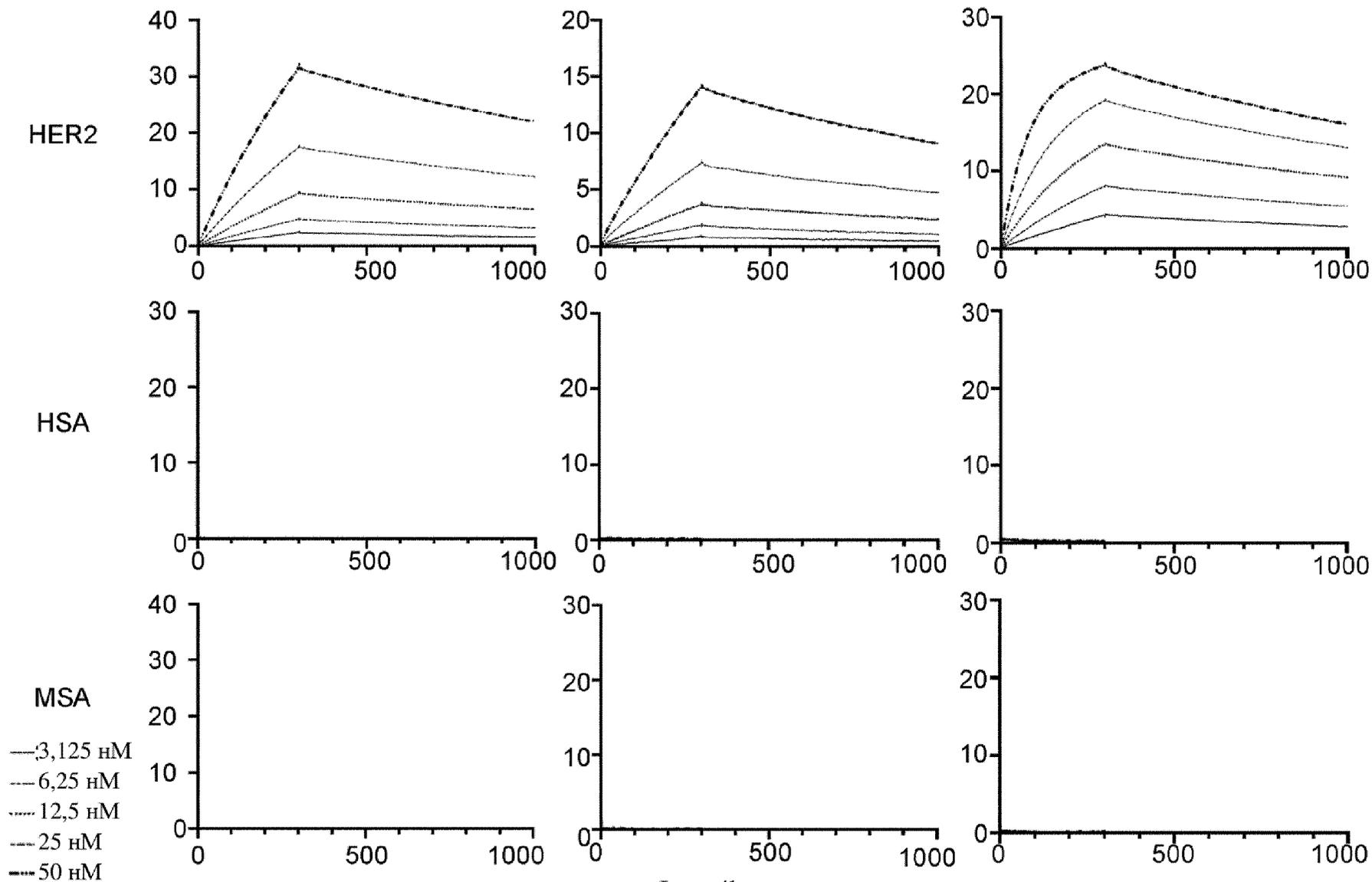
Фиг. 2



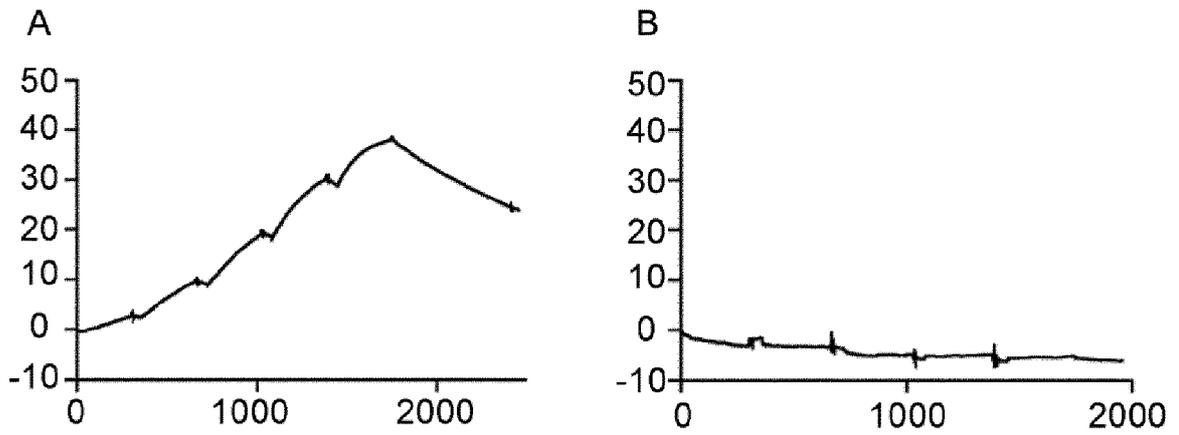
Фиг. 3



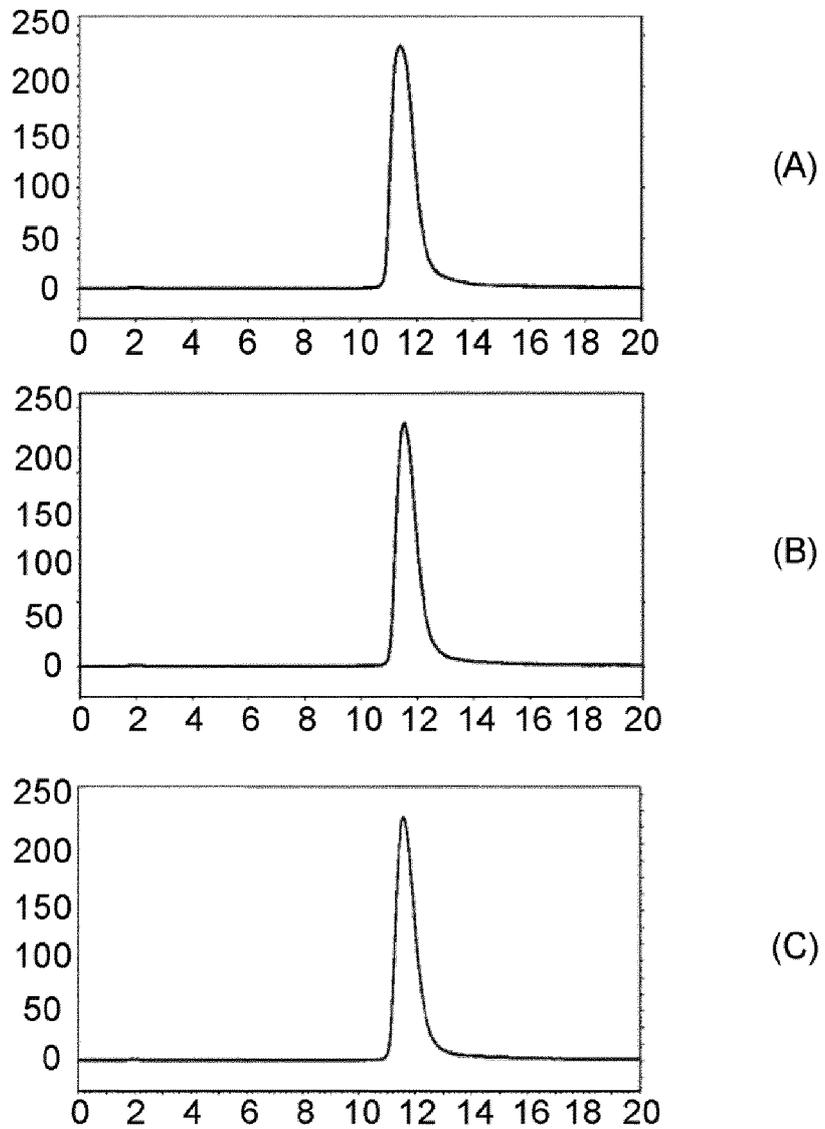
Фиг. 4а



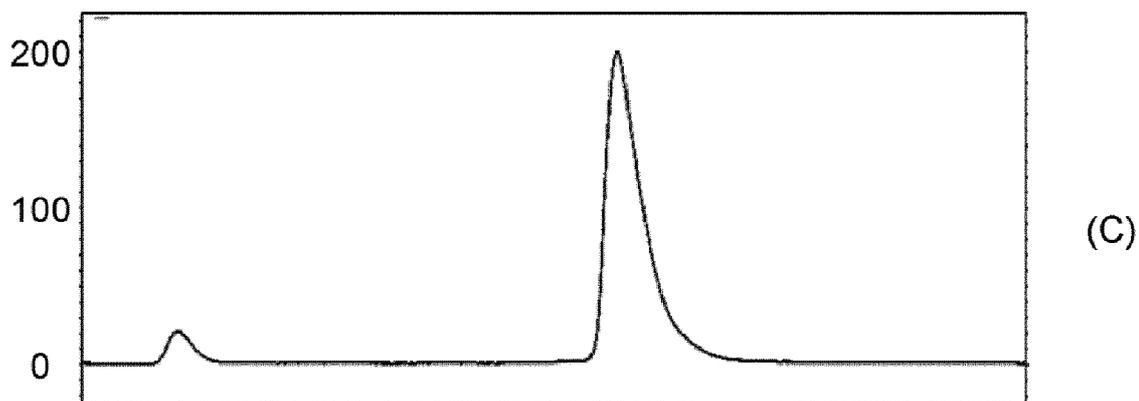
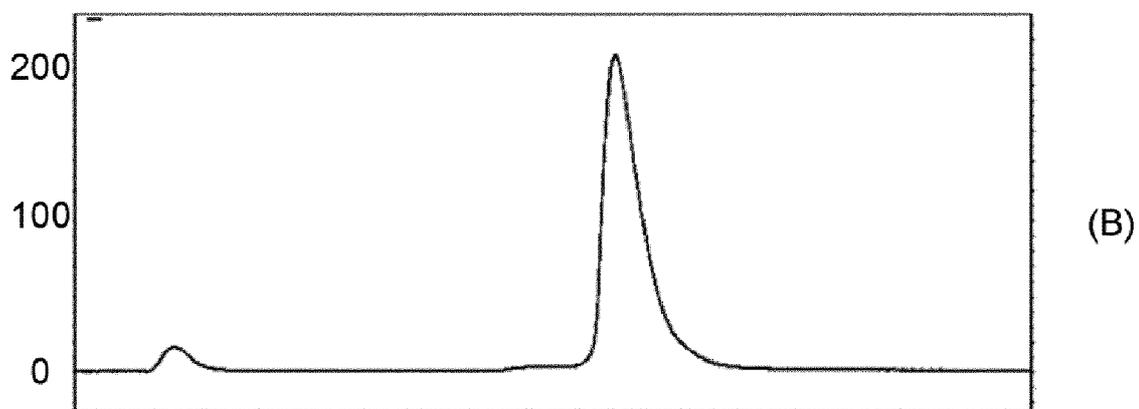
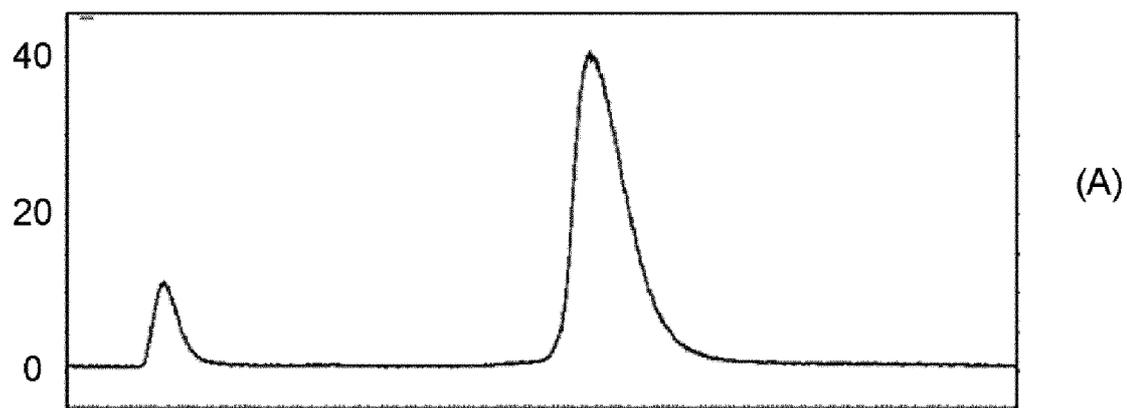
Фиг. 4b



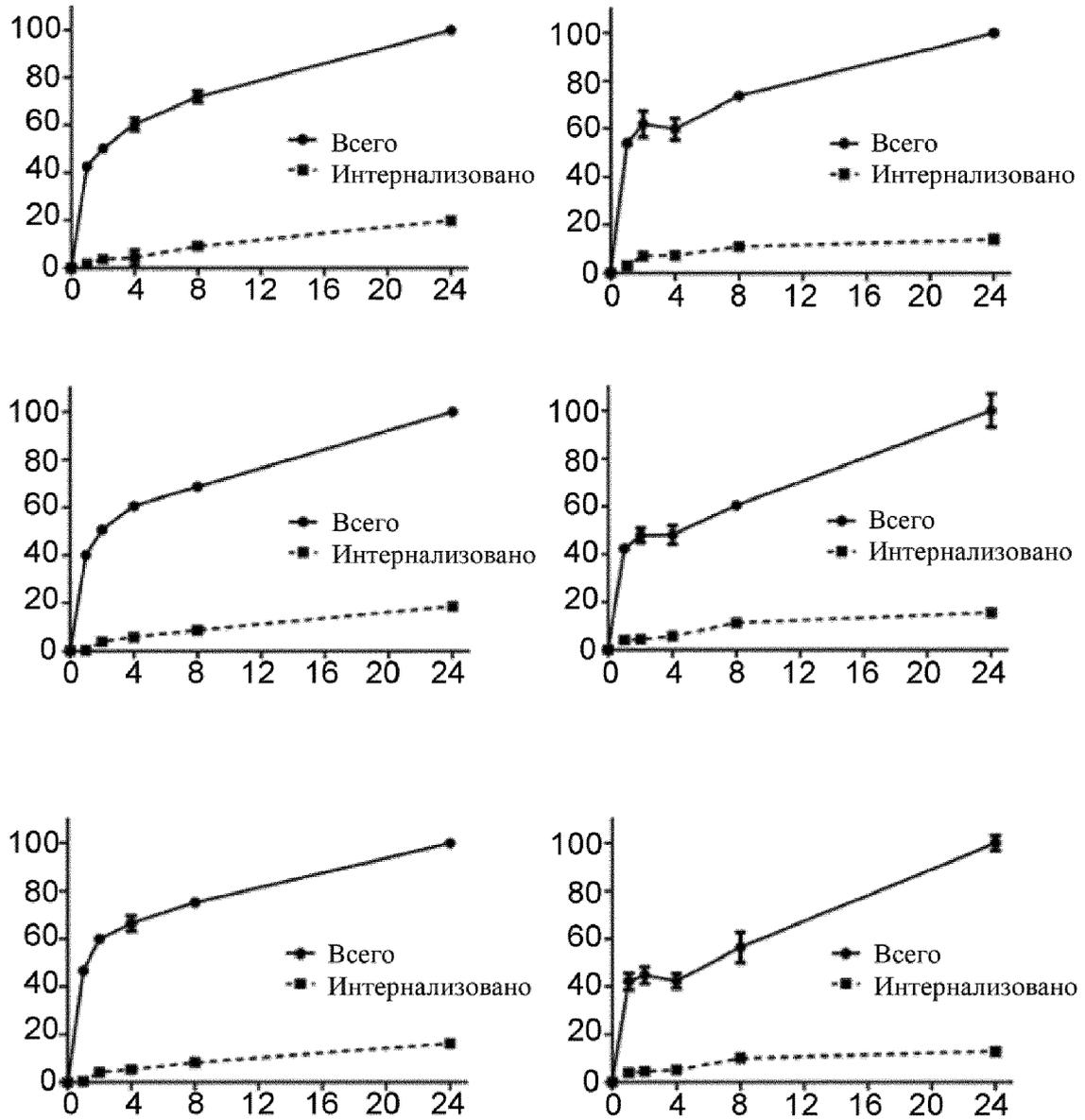
Фиг. 5



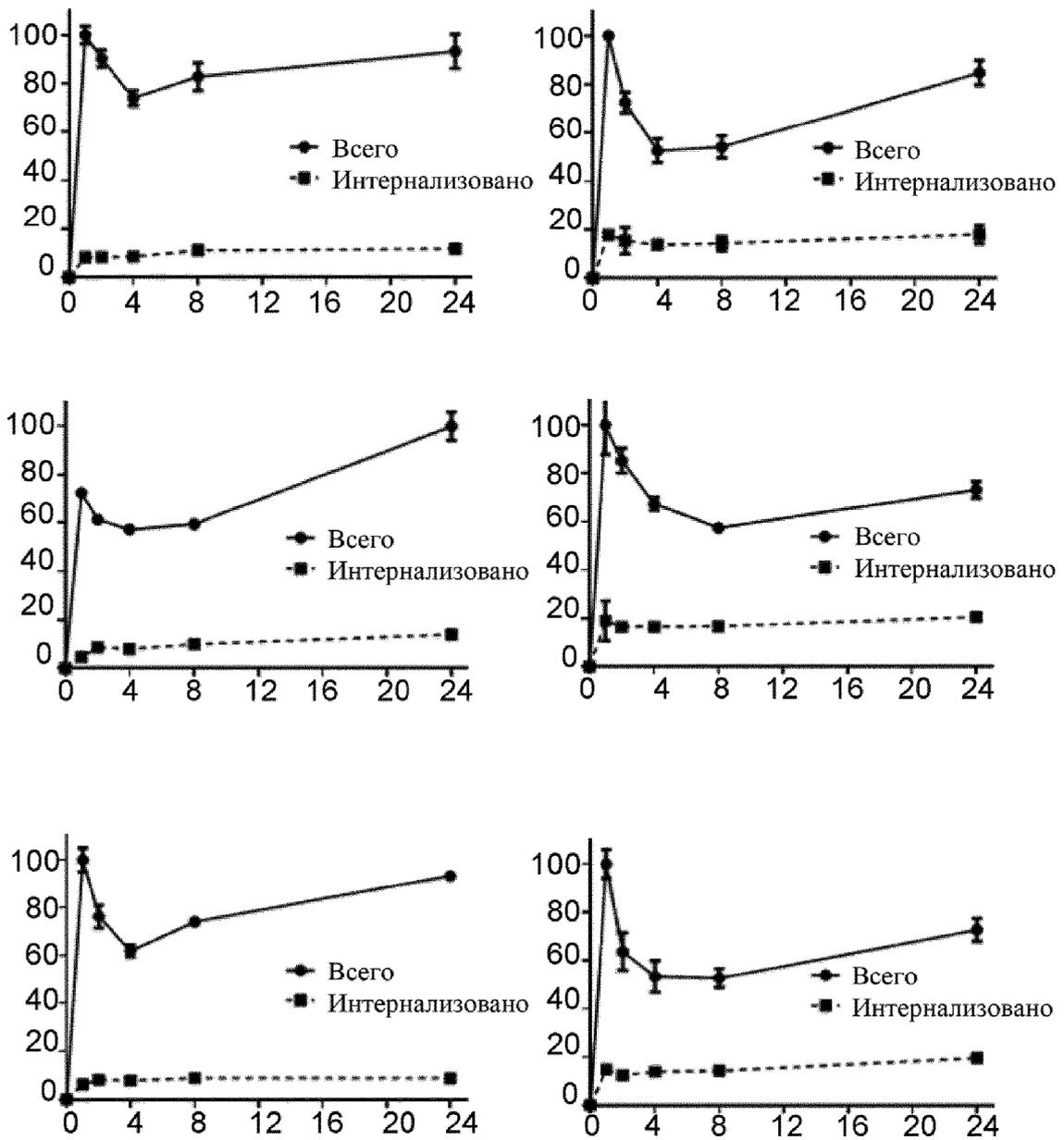
Фиг. 6



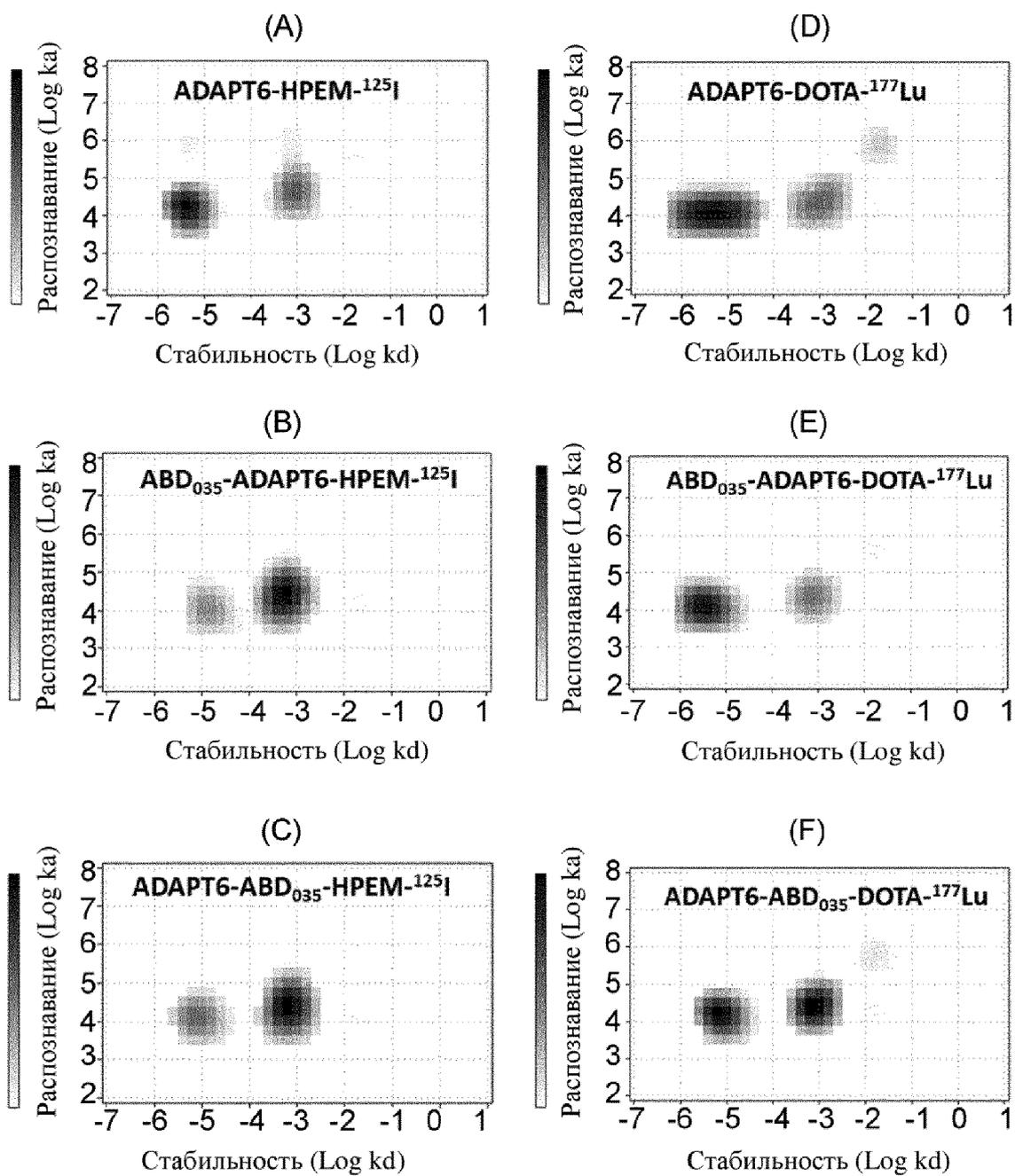
Фиг. 7



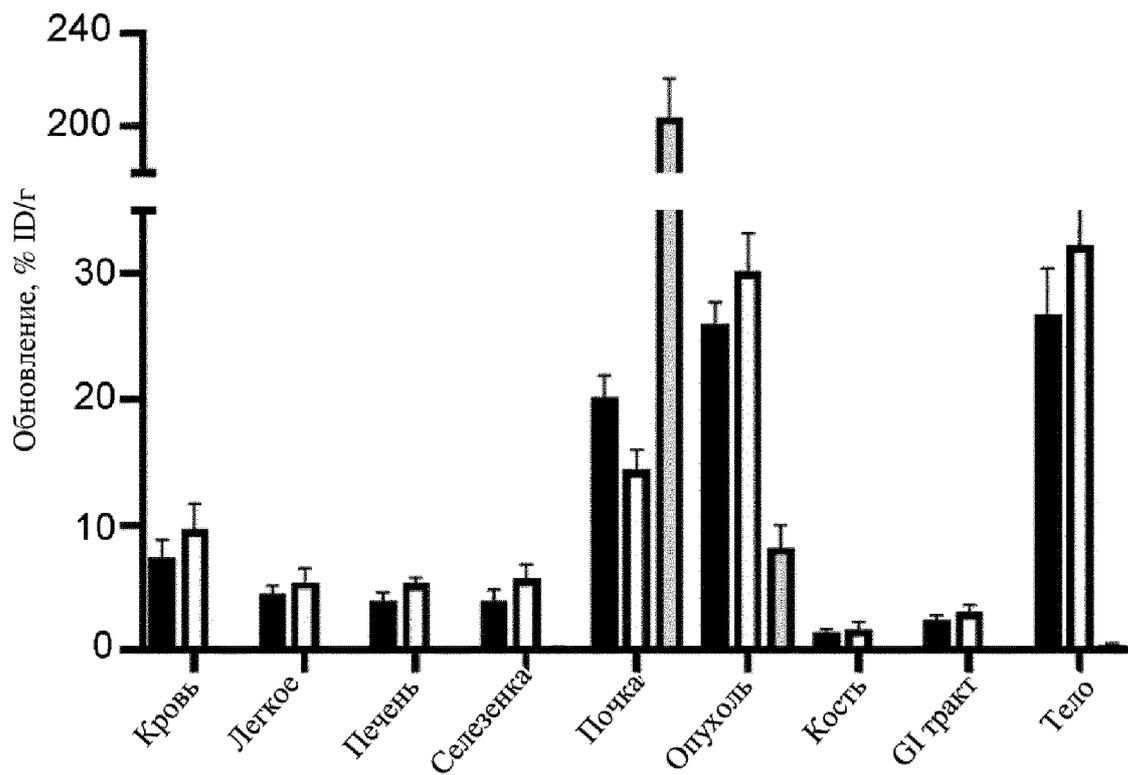
Фиг. 8



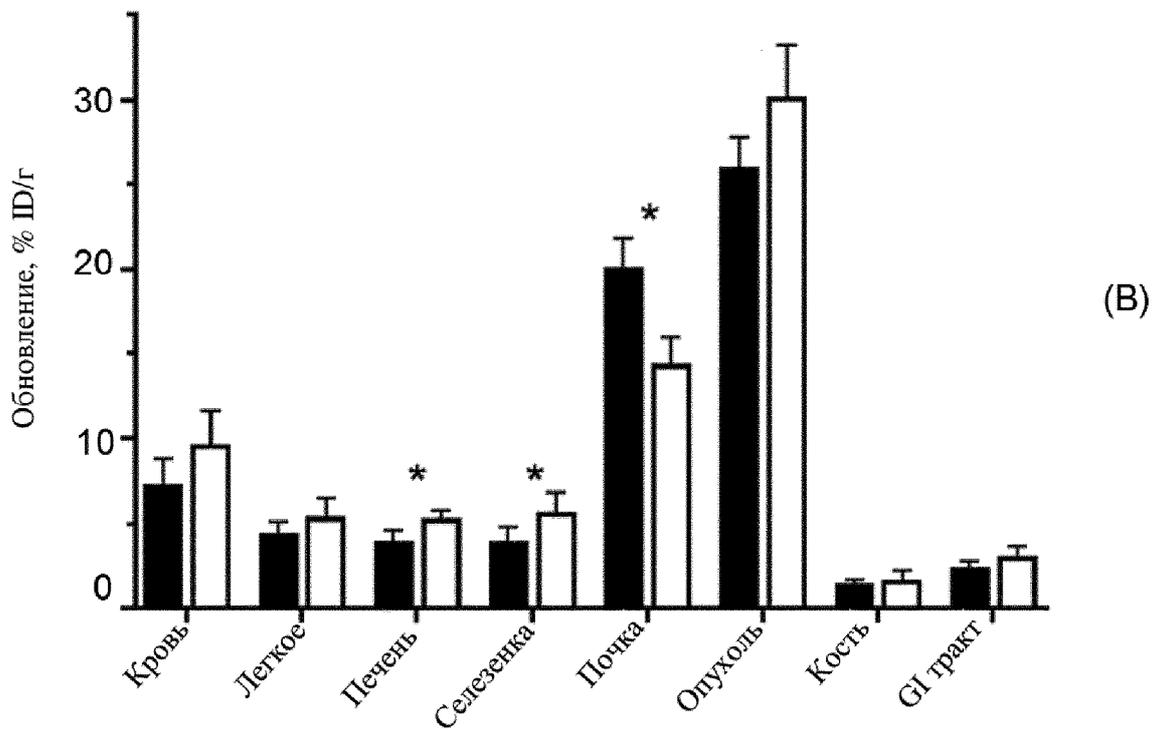
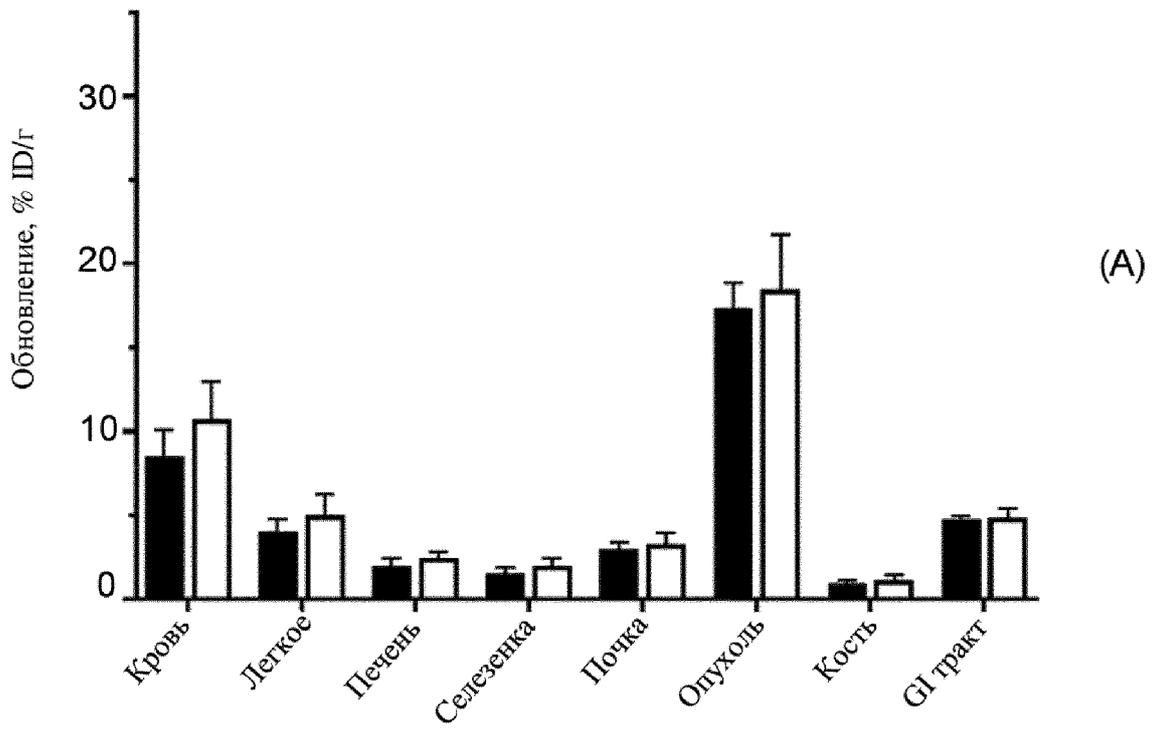
Фиг. 9



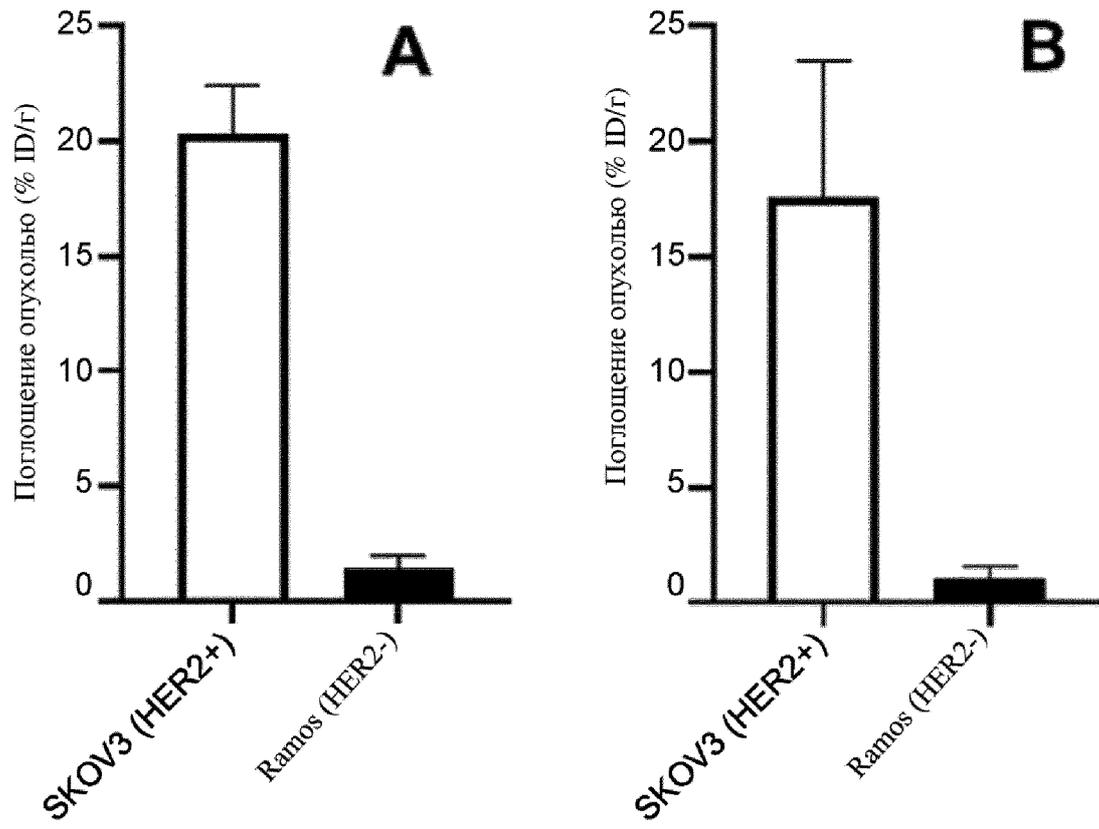
Фиг. 10



Фиг. 11



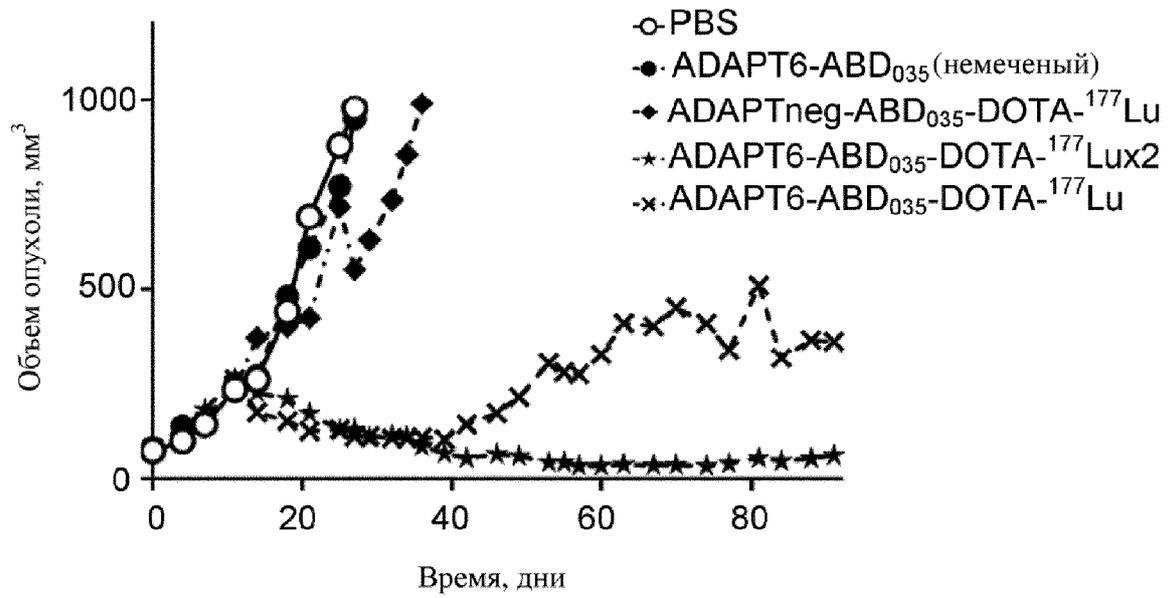
Фиг. 12



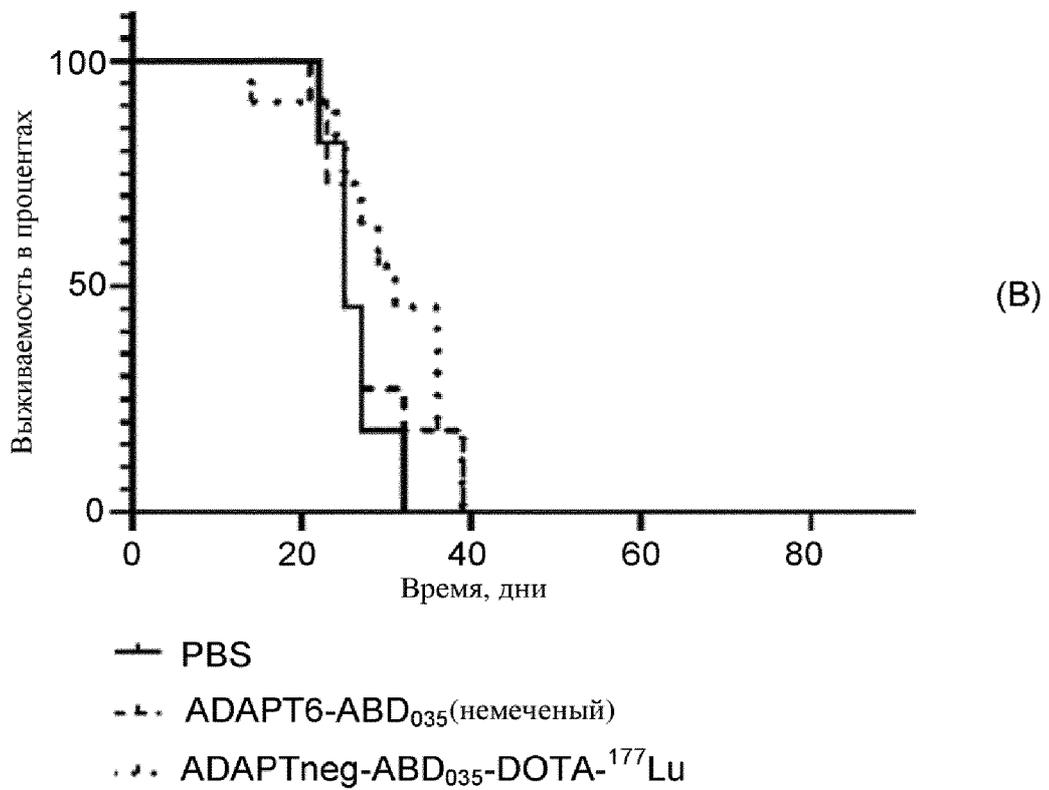
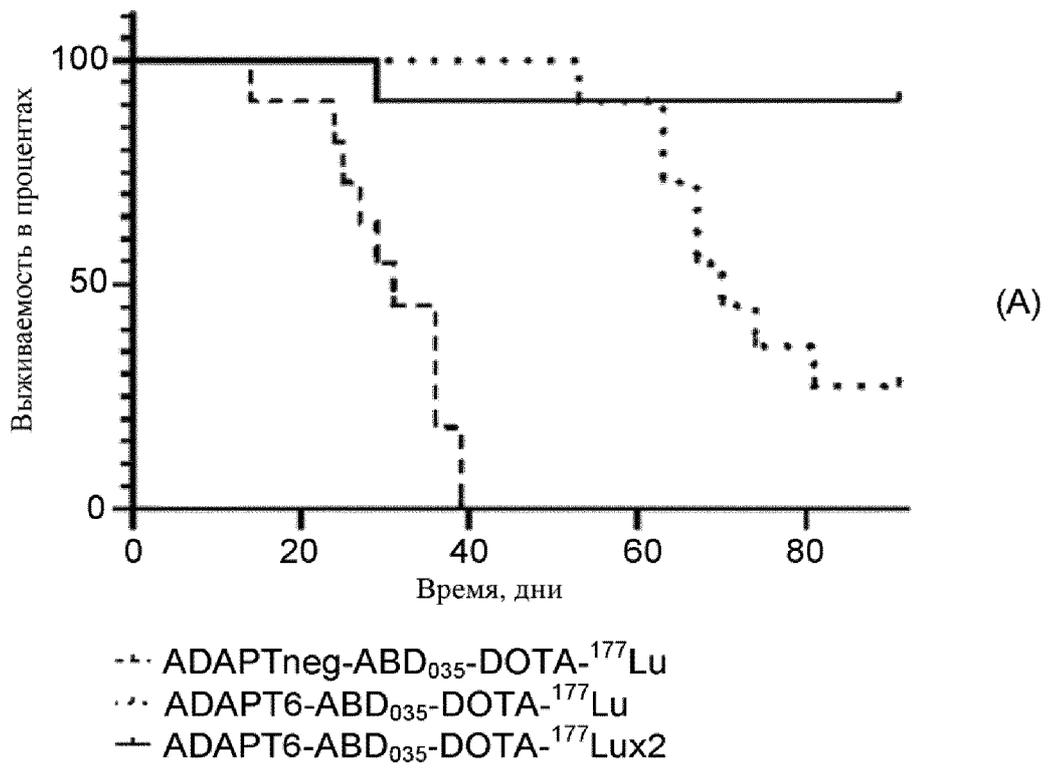
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16