

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292871 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.13

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

(22) Дата подачи заявки  
2020.04.30

(54) ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ HER2 У ПАЦИЕНТОВ-ЛЮДЕЙ

(86) PCT/EP2020/061735

(74) Представитель:

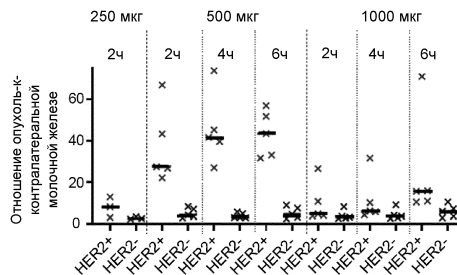
(87) WO 2021/219202 2021.11.04

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)

(71) Заявитель:  
ХОБЕР БИОТЕК АБ (SE)

(72) Изобретатель:  
Хобер София, Гаруси Джавад,  
Толмачев Владимир (SE), Ольга  
Брагина (RU), Линдбо Сара (SE),  
Чернов Владимир (RU)

(57) Предложен визуализирующий агент для применения в способе визуализации экспрессии HER2 (рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста) у пациентов-людей, где указанный способ включает введение пациенту визуализирующего агента в дозе 400-700 мкг и последующее сканирование пациента для визуализации экспрессии HER2, где визуализирующий агент представляет собой конъюгат, содержащий радиоактивный изотоп и HER2-связывающий белок (НВР) с определенной аминокислотной последовательностью. Также предложена единичная доза, содержащая визуализирующий агент в количестве 400-700 мкг.



A1

202292871

202292871

A1

## **ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ HER2 У ПАЦИЕНТОВ-ЛЮДЕЙ**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение относится к области визуализации экспрессии HER2 у пациентов-людей.

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (HER2) функционирует в качестве молекулярной мишени для некоторых терапевтических средств, эффективных для лечения рака молочной железы и гастроэзофагеального рака. Ответ на такие терапевтические средства зависит от уровня экспрессии HER2 и, следовательно, необходима точная оценка статуса HER2 в опухолях для того, чтобы избежать недостаточного и избыточного лечения (Wolff 2013; Bartley 2017). В настоящее время стандарт лечения включает взятие биопсийного материала с последующей оценкой статуса HER2 с использованием иммуногистохимии (ИНС) и анализа гибридизации *in situ* (ISH). Опухоли с баллом 3+ ИНС или 2+ ИНС и положительные по результатам ISH считаются HER2-положительными и подходят для HER2-таргетной терапии. Главной проблемой данного способа является гетерогенность экспрессии HER2, и пациенты с раком молочной железы часто имеют как HER2-положительные, так и HER2-отрицательные метастазы (Sörensen 2016; Gebhart 2016). Кроме того, инвазивность биопсий не позволяет брать образцы всех метастазов, что связано с риском нерепрезентативных результатов.

Молекулярная визуализация экспрессии HER2 с применением радиоактивных изотопов может служить неинвазивной альтернативой для стратификации пациентов, обеспечивая такие преимущества, как повторное картирование экспрессии HER2 во множестве метастазов (Tolmachev 2008; обзор Gebhart 2016; Mankoff 2016). Одним из перспективных подходов, используемых для определения экспрессии HER2, является иммуно-РЕТ. В данной стратегии используется специфическое распознавание HER2 при помощи моноклональных антител, а также лучшее пространственное разрешение, эффективность регистрации и точность количественного определения позитронной эмиссионной томографии (РЕТ). Терапевтические анти-HER2 антитела трастузумаб (Dijkers 2010; Laforest 2016; Gebhart 2016; Bensch 2018, Ulaner 2017; Mortimer 2014) и

пертузумаб (Ulaner 2018) оба были помечены долгоживущими излучателями позитронов  $^{89}\text{Zr}$  или  $^{64}\text{Cu}$  и их оценивали в клинике. Несколько клинических исследований продемонстрировали возможность молекулярной визуализации HER2 с применением радиоактивных изотопов. Например, ПЕТ-визуализация с  $^{89}\text{Zr}$ -трастузумабом привела к изменению выбора метода лечения для 40% пациентов в случаях, когда было невозможно провести биопсию клинически значимых очагов (Bensch 2018). Однако применение полноразмерных антител осложнено вследствие их медленного проникновения в опухоли и медленного выведения из кровотока. Указанные характеристики влекут за собой необходимость длительного периода задержки между инъекцией и визуализацией, при этом наилучшие результаты получают через 4-8 суток после инъекции (Dijkers 2010; Ulaner 2018). Кроме того, крупные антитела склонны накапливаться в опухолях неспецифическим образом, тем самым создавая риск ложноположительных диагнозов.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы данного изобретения поняли, что применение гораздо более мелких направленных векторов, таких как сконструированные каркасные белки (ESP) является многообещающей альтернативой иммуно-ПЕТ.

ADAPT (производные от альбумин-связывающего домена аффинные белки) представляют собой аффинные белки на основе трехспирального каркаса альбумин-связывающего домена белка G стрептококков (Nilvebrant 2013). Небольшой размер ADAPT и аффинности, находящиеся в низком наномолярном диапазоне, создают многообещающие условия для их успешного применения в качестве визуализирующих агентов. Ранее был отобран ряд ADAPT для их возможного применения в качестве HER2-визуализирующих зондов (Nilvebrant 2014). Для облегчения быстрого выведения несвязавшегося агента из крови был разработан один конкретный вариант ADAPT, ADAPT6, путем устранения присущего ему связывания с сывороточным альбумином (Nilvebrant 2014).

Задачей настоящего изобретения является обеспечение безопасной, эффективной и точной визуализации экспрессии HER2 у пациентов-людей. После такой визуализации пациента можно стратифицировать для таргетной анти-HER2 терапии.

В связи с этим предложен визуализирующий агент для применения в способе визуализации экспрессии HER2 у пациентов-людей, где способ включает введение

пациенту визуализирующего агента в дозе 400-700 мкг и последующее сканирование пациента для определения, визуализации и/или количественного определения экспрессии HER2. Аналогично, предложен способ визуализации экспрессии HER2 у пациентов-людей, включающий введение пациенту визуализирующего агента в дозе 400-700 мкг и последующее сканирование пациента для визуализации экспрессии HER2.

Также предложена лекарственная форма, содержащая визуализирующий агент в количестве 400-700 мкг.

Визуализирующий агент, упомянутый выше, представляет собой конъюгат, содержащий радиоактивный изотоп и HER2-связывающий белок (НВР), где НВР содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из

1) LAX<sub>3</sub>AKX<sub>6</sub>TX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>Y HLX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GVX<sub>18</sub>DX<sub>20</sub> YKX<sub>23</sub>LIDKX<sub>28</sub>KT

VEX<sub>33</sub>VX<sub>35</sub>AX<sub>37</sub>YX<sub>39</sub>X<sub>40</sub> ILX<sub>43</sub>ALP (SEQ ID NO:18), где независимо друг от друга

X<sub>3</sub> выбран из A, G, P, S и V;

X<sub>6</sub> выбран из D и E,

X<sub>8</sub> выбран из A и V;

X<sub>9</sub> выбран из L и N;

X<sub>13</sub> выбран из D и T;

X<sub>14</sub> выбран из K и R;

X<sub>15</sub> выбран из I, L, M, T и V;

X<sub>18</sub> выбран из S и A;

X<sub>20</sub> выбран из F, Y и A;

X<sub>23</sub> выбран из D и R,

X<sub>28</sub> выбран из A и V;

X<sub>33</sub> выбран из G, S и D;

X<sub>35</sub> выбран из K, M и R;

X<sub>37</sub> выбран из L и R;

X<sub>39</sub> выбран из A, F и L;

X<sub>40</sub> выбран из A и E; и

X<sub>43</sub> выбран из A, H, K, P, R, T, Q и Y;

и 2) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, определенной в (1).

В одном воплощении радиоактивный изотоп присоединен к концу НВР, такому

как N-конец НВР. Визуализирующий агент может дополнительно содержать линкерную аминокислотную последовательность, где радиоактивный изотоп присоединен к концу НВР посредством линкерной аминокислотной последовательности.

В одном воплощении число аминокислотных остатков в линкерной аминокислотной последовательности составляет от 5 до 30, например от 5 до 20.

В одном воплощении по меньшей мере часть линкерной аминокислотной последовательности образует хелатор радиоактивного изотопа. Хелатор может содержать последовательность НННННН (SEQ ID NO:3).

В одном воплощении линкерная аминокислотная последовательность отделяет любой хелатор или группировку, связывающую радиоактивный изотоп, от НВР по меньшей мере на пять аминокислотных остатков, например по меньшей мере на шесть аминокислотных остатков.

В одном воплощении аминокислотной последовательности i):

X<sub>3</sub> выбран из A, G, P;

X<sub>6</sub> представляет собой E;

X<sub>9</sub> представляет собой L;

X<sub>13</sub> представляет собой D;

X<sub>14</sub> представляет собой R;

X<sub>15</sub> выбран из L и V;

X<sub>18</sub> выбран из S и A;

X<sub>20</sub> выбран из F, Y и A;

X<sub>28</sub> представляет собой A;

X<sub>33</sub> представляет собой G;

X<sub>35</sub> выбран из K и R;

X<sub>37</sub> представляет собой L;

X<sub>39</sub> выбран из F и L;

X<sub>40</sub> представляет собой E; и

X<sub>43</sub> выбран из H, P и R.

В одном воплощении НВР содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной 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 HLTRGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILYALP (SEQ ID NO:16); и

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

В одном воплощении НБР содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

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

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

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

или состоит из нее.

В одном воплощении радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  и

$^{67}\text{Ga}$ .

В одном воплощении радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  и  $^{111}\text{In}$ .

В одном воплощении радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$  и  $^{110\text{m}}\text{In}$ , и сканирование представляет собой PET.

В одном воплощении радиоактивный изотоп представляет собой  $^{18}\text{F}$  или  $^{68}\text{Ga}$ , и сканирование представляет собой PET.

В одном воплощении радиоактивный изотоп конъюгирован с НВР посредством хелатора или простетической группы, образующей ковалентную связь с радиоактивным изотопом.

В одном воплощении визуализирующий агент содержит менее 73 аминокислотных остатков, например менее 68 аминокислотных остатков.

В одном воплощении визуализирующей агент вводят внутривенно.

В одном воплощении вышеуказанное сканирование осуществляют в течение 4 часов от введения визуализирующего агента, например в течение 3 часов от введения визуализирующего агента.

В одном воплощении вышеуказанное сканирование осуществляют в течение от 1 до 3 часов после введения визуализирующего агента, например в течение от 1,5 до 2,5 часов после введения визуализирующего агента.

В одном воплощении радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$  и  $^{110\text{m}}\text{In}$ , и сканирование представляет собой PET, осуществляемую в промежутке от 1 до 3 часов после введения визуализирующего агента, например в промежутке от 1,5 до 2,5 часов после введения визуализирующего агента.

В одном воплощении пациент страдает раком молочной железы или гастроэзофагеальным раком.

В воплощении вышеуказанная доза составляет 400-600 мкг, такую как 450-550 мкг, такую как примерно 500 мкг. Аналогично, количество визуализирующего агента в однократной дозе может составлять 400-600 мкг, например 450-550 мкг, например примерно 500 мкг.

В одном воплощении визуализирующей агент приготовлен в виде композиции, адаптированной для внутривенного введения. Объем композиции может составлять 1-

15 мл, например 1-10 мл, например 8-10 мл. Композиция может быть на водной основе, например на основе солевого раствора. Композиция на водной основе может быть забуферена, например забуферена фосфатом.

Также предложен продукт, содержащий контейнер и вышеуказанную однократную дозу, где однократная доза находится в контейнере. Контейнер может представлять собой флакон или ампулу. Объем контейнера может составлять 1-15 мл, например 1-10 мл, например 8-10 мл.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 приведены изображения всего тела пациента 1 через 2, 4, 6 и 24 ч после инъекции ему 500 мкг  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 в разделе «Примеры» ниже.

На Фиг. 2 показана кинетика выведения  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 из крови.

На Фиг. 3 показано отношение первичная опухоль-к-контралатеральной зоне через 2 ч после инъекции 250 мкг  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 На Фиг. 3 также показано отношение первичная опухоль-к-контралатеральной зоне через 2, 4 и 6 ч после инъекции 500 и 1000 мкг  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6.

На Фиг. 4 показаны репрезентативные изображения передней части тела пациентов с HER2-отрицательными и HER2-положительными опухолями после инъекции 250, 500 или 1000 мкг  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6.

На Фиг. 5 показана визуализация опухолевых очагов при помощи плоскостной сцинтиграфии у пациента 4: (А)  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6; (В)  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфат во время визуализации с использованием  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6; (С)  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфат через 6 месяцев после инъекции ADAPT6.

На Фиг. 6 показано отношение опухоль-к-печени через 2, 4 и 6 ч после инъекции 500 и 1000 мкг  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В качестве первого аспекта данного изобретения предложен визуализирующий агент для применения в способе визуализации экспрессии HER2 у пациентов-людей, где пациент обычно страдает раком молочной железы или гастроэзофагеальным раком. Это также может быть пациент с подозрением на рецидивирующий рак молочной железы или гастроэзофагеальный рак.

Способ включает введение пациенту визуализирующего агента в дозе 400-700 мкг. Предпочтительно, доза составляет 400-600 мкг, такая как 450-550 мкг, такая как примерно 500 мкг. Путь введения обычно является внутривенным.



После введения визуализирующего агента пациенту проводят сканирование для определения, визуализации и/или количественного определения экспрессии HER2. Визуализирующий агент по данному изобретению обеспечивает высококонтрастную визуализацию относительно быстро, что сокращает время пребывания пациента в клинике (что в свою очередь сокращает расходы и улучшает качество жизни пациента). Следовательно, пациент представляет собой пациента, которому проводят сканирование предпочтительно в течение 4 часов от введения визуализирующего агента, например в течение 3 часов от введения визуализирующего агента. В одном воплощении сканирование осуществляют в промежутке от 1 до 3 часов после введения визуализирующего агента, например в течение от 1,5 до 2,5 часов после введения визуализирующего агента. Сканирование обычно представляет собой томографию, предпочтительно позитронную эмиссионную томографию (PET) или однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT). Для последней можно использовать камеру с CZT(теллурид кадмия-цинка) -детектором.

Визуализирующий агент представляет собой конъюгат, содержащий радиоактивный изотоп и HER2-связывающий белок (НВР).

В одном воплощении радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{67}\text{Ga}$ . Предпочтительная группа состоит из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  и  $^{111}\text{In}$ . Другая предпочтительная группа состоит из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  и  $^{111}\text{In}$ .

Для радиоактивного мечения  $^{18}\text{F}$  простетическая группа (образующая ковалентную связь с  $^{18}\text{F}$ ) может быть присоединена к НВР (возможно через линкерную аминокислотную последовательность, как обсуждается ниже). Примерами образующихся структур являются N-(2-(4-[ $^{18}\text{F}$ ]-фторбензамидо)этил)малеимидо ([ $^{18}\text{F}$ ]FBEM), 4-[ $^{18}\text{F}$ ]-фторбензальдегид ([ $^{18}\text{F}$ ]-FBA) и [ $^{18}\text{F}$ ]-фторфенилоксадиазолметилсульфон ([ $^{18}\text{F}$ ]-FPOS. Другим вариантом является [ $^{18}\text{F}$ ]алюминия монофторид в комбинации с триаза-хелатором.

Также в случае радиоактивного мечения  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  и  $^{76}\text{Br}$  может применяться простетическая группа. Примерами образующихся структур являются иод-/бром-бензоат и иод-/бром-гидроксифенилэтилмалеимид.

Для радиоактивного мечения  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$  и  $^{111}\text{In}$  предпочтительно присоединять хелатор к НВР (возможно через линкерную аминокислотную последовательность, как обсуждается ниже). Примерами хелаторов

являются DOTA, NOTA, NODAGA и DOTAGA, а также их производные.

Для  $^{61}\text{Cu}$  и  $^{64}\text{Cu}$  лучшим вариантом является хелатор с поперечным мостиком, такой как СВ-TE2A.

Для радиоактивного мечения с применением  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  можно применять различные хелаторы, такие как гексагистидин (H<sub>6</sub>), и хелаторы на основе цистеин- или меркаптоацетил-содержащего пептида.

В случае  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$  и  $^{110\text{m}}\text{In}$  технология сканирования предпочтительно представляет собой PET.

В случае  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  или  $^{67}\text{Ga}$  технология сканирования предпочтительно включает СПЕКТ, например с использованием камеры с CZT-детектором.

Радиоактивный изотоп предпочтительно присоединен к концу НВР, такому как N-конец НВР. В одном воплощении визуализирующий агент дополнительно содержит линкерную аминокислотную последовательность, и радиоактивный изотоп присоединен к концу НВР посредством линкерной аминокислотной последовательности. Число аминокислотных остатков в линкерной аминокислотной последовательности обычно составляет 5 - 30, предпочтительно 5 - 25 или 5 - 20.

В одном воплощении по меньшей мере часть линкерной аминокислотной последовательности образует хелатор радиоактивного изотопа. В качестве примера хелатор-образующая часть может содержать последовательность НННННН (SEQ ID NO:3), которая может связываться с  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Альтернативой НННННН является НЕНЕНЕ (SEQ ID NO:5).

Линкерная аминокислотная последовательность предпочтительно отделяет любой хелатор или иную группировку, связывающую радиоактивный изотоп, от НВР, например по меньшей мере на пять аминокислотных остатков, например по меньшей мере на шесть аминокислотных остатков. Таким образом, можно избежать какой-либо интерференции со связыванием HER2 или по меньшей мере уменьшить ее. В одном воплощении линкерная аминокислотная последовательность для такого отдаления содержит последовательность DEAVDANS (SEQ ID NO:4) на С-концевой стороне хелатора или группировки, связывающей радиоактивный изотоп. Соответственно, линкерная аминокислотная последовательность может содержать и SEQ ID NO:3, и SEQ ID NO:4, например образуя SEQ ID NO:2.

НВР содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

1) LAX<sub>3</sub>AKX<sub>6</sub>TX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>Y HLX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>G<sub>V</sub>X<sub>18</sub>DX<sub>20</sub> YKX<sub>23</sub>LIDKX<sub>28</sub>KT  
 VEX<sub>33</sub>VX<sub>35</sub>AX<sub>37</sub>YX<sub>39</sub>X<sub>40</sub> ILX<sub>43</sub>ALP, где независимо друг от друга

X<sub>3</sub> выбран из A, G, P, S и V, предпочтительно A, G и P;

X<sub>6</sub> выбран из D и E, предпочтительно E;

X<sub>8</sub> выбран из A и V;

X<sub>9</sub> выбран из L и N, предпочтительно L;

X<sub>13</sub> выбран из D и T, предпочтительно D;

X<sub>14</sub> выбран из K и R, предпочтительно R;

X<sub>15</sub> выбран из I, L, M, T и V, предпочтительно L и V;

X<sub>18</sub> выбран из S и A;

X<sub>20</sub> выбран из F, Y и A;

X<sub>23</sub> выбран из D и R;

X<sub>28</sub> выбран из A и V, предпочтительно A;

X<sub>33</sub> выбран из G, S и D, предпочтительно G;

X<sub>35</sub> выбран из K, M и R, предпочтительно K и R;

X<sub>37</sub> выбран из L и R, предпочтительно L;

X<sub>39</sub> выбран из A, F и L, предпочтительно F и L;

X<sub>40</sub> выбран из A и E, предпочтительно E; и

X<sub>43</sub> выбран из A, H, K, P, R, T, Q и Y, предпочтительно H, P и R;

и 2) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, определенной в (1), или состоит из нее.

Данные, подтверждающие связывающую активность (1) и (2) в отношении HER2, представлены в WO2014076179, Nilvebrant 2014 и в разделе «Примеры» ниже.

В предпочтительном воплощении аминокислотной последовательности (1)

X<sub>3</sub> выбран из A, G, P, предпочтительно A и G;

X<sub>6</sub> представляет собой E;

X<sub>8</sub> представляет собой A и V;

X<sub>9</sub> представляет собой L;

X<sub>13</sub> представляет собой D;

X<sub>14</sub> представляет собой R;

X<sub>15</sub> выбран из L и V;

X<sub>18</sub> выбран из S и A;

X<sub>20</sub> выбран из F, Y и A;  
 X<sub>23</sub> выбран из D и R;  
 X<sub>28</sub> представляет собой A;  
 X<sub>33</sub> представляет собой G;  
 X<sub>35</sub> выбран из K и R;  
 X<sub>37</sub> представляет собой L;  
 X<sub>39</sub> выбран из F и L;  
 X<sub>40</sub> представляет собой E; и  
 X<sub>43</sub> выбран из H, P и R.

В другом предпочтительном воплощении НВР 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),

или состоит из нее.

Особенно предпочтительная группа состоит из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:13. SEQ ID NO:9 и 13 в Nilvebrant 2014 были идентифицированы как посредством фагового дисплея, так и посредством FACS, что авторы изобретения считают полезным. SEQ ID NO:6 используют в разделе «Примеры» ниже. НВР и вышеуказанная линкерная аминокислотная последовательность могут быть слиты, составляя SEQ ID NO:1.

В одном воплощении визуализирующий агент содержит менее 73 аминокислотных остатков, например менее 68 аминокислотных остатков. Такой относительно малый размер облегчает высокий захват опухолью (дополнительно обсуждается ниже) и, следовательно, визуализацию с высоким контрастом. Общая молекулярная масса конъюгата терапевтического назначения предпочтительно составляет менее 12,0 кДа, предпочтительно менее 8,0 кДа, например менее 7,1 кДа.

В одном воплощении экспрессию HER2 у пациента количественно определяют после сканирования и, если обнаруживается, что количественно определенная экспрессия HER2 выше клинически значимого референсного значения, применяют HER2-таргетное лечение. Если количественно определенная экспрессия HER2 ниже референсного значения, может быть принято решение воздержаться от HER2-таргетного лечения.

В качестве второго аспекта настоящего изобретения предложена однократная доза, содержащая визуализирующий агент по первому аспекту в количестве 400-700 мкг. Предпочтительно, количество составляет 400-600 мкг, например 450-550 мкг, такое как примерно 500 мкг. Воплощения по первому аспекту с необходимыми изменениями относятся ко второму аспекту. Однократная доза по второму аспекту облегчает способ по первому аспекту.

Визуализирующей агент по второму аспекту предпочтительно приготовлен в виде композиции, адаптированной для внутривенного введения.

Композиция обычно имеет водную основу, такую как солевая основа. Композиция на водной основе может быть забуферена, например забуферена фосфатом. Соответственно, композиция может содержать фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). В качестве примера, буфер на основе PBS является подходящим

буфером, когда радиоактивный изотоп представляет собой  $^{99m}\text{Tc}$ . В качестве другого примера рН композиции предпочтительно составляет примерно 5, когда радиоактивным изотопом является  $^{111}\text{In}$ .

Однократная доза по второму аспекту может быть готовой для введения, предпочтительно для внутривенного введения. Альтернативно, лекарственная форма может быть подвергнута очистке перед введением. Такую очистку обычно осуществляют в клинике или в непосредственной близости от нее.

Необходимость очистки может зависеть от природы радиоактивной метки. Радиоактивные галогены обычно требуют очистки. Мечение с применением радиоактивных металлов может быть оптимизировано до такой степени, что очистка продукта не требуется. Примерами радиоактивных металлов, для которых очистка обычно не требуется, являются  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{110m}\text{In}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{67}\text{Ga}$ .

Очистка может включать стадии: загрузки раствора визуализирующего агента в одноразовую стерилизуемую колонку (картридж) для эксклюзионной хроматографии с последующим элюированием подходящим растворителем, например PBS. Колонка (картридж) должна быть предварительно откалибрована для определения мертвого объема и объема элюента, необходимого для элюирования высокомолекулярной фракции без низкомолекулярной фракции. Элюат, содержащий высокомолекулярную фракцию, собирают.

Вводимый объем обычно составляет 1-15 мл, например 1-10 мл, такой как 8-10 мл. Соответственно, объем композиции может составлять 1-15 мл, например 1-10 мл, такой как 8-10 мл, в частности, когда очистка не требуется.

Воплощения второго аспекта с необходимыми изменениями относятся к первому аспекту.

В качестве третьего аспекта настоящего изобретения предложен продукт, содержащий контейнер и однократную дозу по второму аспекту, где однократная доза находится в контейнере. Такой продукт, который обычно представляет собой продукт для однократного применения (один продукт на пациента и визуализацию), облегчает процедуры в клинике. Контейнер обычно представляет собой флакон или ампулу. Объем контейнера может составлять 1-15 мл, например 1-10 мл, такой как 8-10 мл.

В качестве четвертого аспекта настоящего изобретения предложен способ визуализации экспрессии HER2 у пациента-человека, включающий введение пациенту

визуализирующего агента в дозе 400-700 мкг и последующее сканирование пациента для визуализации экспрессии HER2. Визуализирующий агент является таким же, как в первом аспекте. Воплощения четвертого аспекта выведены из вышеприведенного описания первого аспекта.

### **ПРИМЕРЫ**

В исследовании на людях визуализирующий агент (далее упоминаемый как «<sup>99m</sup>Tc-ADAPT6») оценивали на пациентах с первичным HER2-положительным и HER2-отрицательным раком молочной железы.

Главными задачами исследования были:

- а. Оценка распределения <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6 в нормальных тканях и опухолях во времени;
- б. Дозиметрическая оценка <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6;
- в. Получение начальной информации, касающейся безопасности и переносимости <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6 после однократной внутривенной инъекции:

Второстепенной задачей было сравнение данных по визуализации опухоли с данными, относящимися к экспрессии HER2, полученными посредством иммуногистохимии (ИГ) или анализа флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) биопсийных образцов.

В исследовании пациентам-людям осуществляли инъекции 250, 500 или 1000 мкг <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6. Оценку посредством плоскостной сцинтиграфии и PET-визуализации осуществляли через 2, 4, 6 и 24 ч после инъекции. Однако у пациентов, которым инъецировали 250 мкг, оценку проводили только через 2 ч.

### **Материалы и методы**

#### **Пациенты**

Исследование представляло собой проспективное открытое нерандомизированное диагностическое исследование 1 фазы на пациентах с нелеченым первичным раком молочной железы. Протокол был одобрен Научным комитетом Института исследования рака Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. Все пациенты подписывали информированное согласие. В исследование включали двадцать восемь (28) пациентов (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристики пациентов до инъекции <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6.

№ пациента	Возраст (лет)	HER2-Статус первичной опухоли	ER/PgR первичной опухоли	Стадия
500 мкг; средний размер опухоли 23±8 мм				
1	36	3+ (IHC)	ER +/PgR -	IIБ (T2N1M0)
2	63	3+ (IHC)	ER -/PgR -	IIIА (T3N1M0)
3	50	3+ (IHC)	ER +/PgR -	IIIА (T2N2M0)
4	61	3+ (IHC)	ER -/PgR -	IIБ (T2N1M0)
5	64	2+ (IHC)/FISH+	ER-/PgR -	IIIБ (T2N1M0) /IV (T2N3M1) *
6	34	0 (IHC)	ER +/PgR +	I (T1N0M0)
7	47	0 (IHC)	ER +;/PgR +	IIА (T2N0M0)
8	41	0 (IHC)	ER +/PgR +	IIА (T2N0M0)
9	63	1+ (IHC)	ER +/PgR +	IIБ (T2N1M0)
10	59	1+ (IHC)	ER +/PgR -	IIА (T2N0M0)
11	40	0 (IHC)	ER -/PgR -	IIIА (T3N1M0)
1000 мкг; средний размер опухоли 31±11 мм				
12	34	3+ (IHC)	ER +/PgR -	IIА (T2N0M0)
13	37	3+ (IHC)	ER +/PgR -	IIА (T1N1M0)
14	43	2+ (IHC)/FISH+	ER +/PgR +	IIА (T2N0M0)
15	36	3+ (IHC)	ER +/PgR +	IIА (T1N1M0)
16	33	3+ (IHC)	ER -/PgR -	IIА (T2N0M0)
17	58	3+ (IHC)/FISH- **	ER +/PgR +	I (T1N0M0)
18	51	1+ (IHC)	ER+/PgR -	IIА (T2N0M0)
19	63	1+ (IHC)	ER +/PgR +	IIА (T2N0M0)
20	62	0 (IHC)	ER -/PgR -	IIА (T2N0M0)
21	71	1+ (IHC)	ER +/PgR -	IIА (T2N0M0)
22	42	0 (IHC)	ER+/PgR +	IIА (T2N0M0)
250 мкг; средний размер опухоли 30±10 мм				
23	51	2+ (IHC)/FISH+	ER +/PgR -;	IIА (T2N0M0)
24	48	2+ (IHC)/FISH+	ER +/ PgR -	IIА (T2N0M0)
25	61	2+ (IHC)/FISH+	ER +/ PgR +	IIА (T4N1M0)



26	39	3+ (ИHC)	ER +/- PgR -	IIA (T2N0M0)
27	29	2+ (ИHC)/FISH-	ER +/- PgR +	IIA (T2N0M0)
28	62	1+ (ИHC)	ER +/- PgR +	I (T1N0M0)

\* стадия изменилась, поскольку визуализация выявила отдаленные метастазы;

\*\* анализ методом FISH после визуализации подтвердил HER2-отрицательный статус.

Брали образцы биоптата первичных опухолей и определяли уровень экспрессии HER2 при помощи иммуногистохимии (ИHC) с применением Herceptest (ДАКО). Для опухолей с баллом 2+ или в случае сомнительных результатов оценивали амплификацию HER2 с использованием флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Опухоли классифицировали как HER2-положительные (балл HercepTest 3+ или балл HercepTest 2+ и FISH-положительные) или HER2-отрицательные (балл HercepTest 0 или 1+ или балл 2+, но FISH-отрицательные) в соответствии с рекомендациями Американского общества клинической онкологии (Wolff 2013).

В качестве местного стандартного лечения всем пациентам проводили маммографию (Giotto Image), остеосцинтиграфию (Siemens E.Cam 180) с использованием  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфата, КТ (компьютерную томографию) органов грудной клетки (Siemens Somatom Emotions 16 ECO) и ультразвуковое исследование (GE LOGIQ E9). Пациенту 4 дополнительно проводили МРТ-исследование (Siemens Magnetom Essenza 1.5T).

#### **Протокол визуализации**

Мечение ADAPT6 осуществляли в асептических условиях согласно способу, описанному ранее (Lindbo 2016). В кратком изложении,  $^{99m}\text{Tc}$  превращали в  $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$  с использованием набора CRS (Центра радиофармацевтических наук). PBS (100 мкл) и  $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$  (400 мкл,  $1,3 \pm 0,3$  ГБк) добавляли во флаконы, содержащие 250, 500 или 1000 мкг лиофильно высушенного белка, имеющего последовательность GSSHNNHND EAVDANSLAA AKETALYHLD RLGVADAYKD LIDKAKTVEG VKARYFEILH ALP (SEQ ID NO:1), представляющего собой ADAPT6 (SEQ ID NO:6) с N-концевым удлинением GSSHNNHND EAVDANS (SEQ ID NO:2). В последовательности N-концевого удлинения гексагистидиновая подпоследовательность (NNNNN (SEQ ID NO:3)) является хелатором для радиоактивного изотопа ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Последовательность DEAVDANS (SEQ ID NO:4) служит спейсером между хелатирующей группировкой и HER2-связывающим белком. Кроме того, она облегчает получение белка. Флаконы инкубировали в течение 60 мин

при 50°C и очищали радиоактивно меченный белок («<sup>99m</sup>Tc-ADAPT6») посредством эксклюзионной хроматографии. Выход составлял 77±9%, а радиохимическая чистота составляла 99±1%.

<sup>99m</sup>Tc-ADAPT6 инъецировали в виде внутривенного болюса (высокомолекулярная фракция после очистки посредством эксклюзионной хроматографии (раствор в PBS), разведенная стерильным солевым раствором до объема 10 мл). Пациентам 1-11 инъецировали 500 мкг ADAPT6 (416±135 МБк), а пациентам 12-22 инъецировали 1000 мкг (349±133 МБк). Визуализацию осуществляли при помощи сканера (Siemens E.Cam 180). Плоскостную визуализацию всего тела и SPECT-сканирование осуществляли через 2, 4, 6 и 24 ч. Пациентам 23-28 инъецировали 250 мкг ADAPT6 (165±29 МБк), а плоскостную визуализацию всего тела и SPECT-сканирование осуществляли через 2 ч.

Мониторинг показателей жизнедеятельности и возможных побочных эффектов осуществляли во время визуализирующего исследования (0 - 24 ч после инъекции) и через 3 - 7 суток после инъекции. Анализы крови и мочи осуществляли через 5 и 14 суток после инъекции.

#### **Оценка распределения и дозиметрия**

На изображениях всего тела в передней и задней проекциях обводили зоны интереса (ROI) над представляющими интерес органами и всем телом пациента, получившего инъекцию 500 и 1000 мкг <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6; для каждой ROI рассчитывали среднее геометрическое значение через 2, 4, 6 и 24 ч. Для количественного определения использовали подсчет известной активности <sup>99m</sup>Tc в заполненном водой фантоме в комбинации с коррекцией по Chang. Для оценки кинетики в крови ROI размещали над содержимым сердца. Данные аппроксимировали односторонней экспоненциальной функцией, и время удержания рассчитывали как площадь под аппроксимирующей кривой с использованием программы Prism 8 для Windows (GraphPad Software, LLC). Поглощенные дозы рассчитывали при помощи OLINDA/EXM 1.1 с использованием фантома взрослой женщины.

Для расчёта отношений опухоль-к-контралатеральной молочной железе и опухоль-к-печени на томографическом изображении в области наибольшего захвата опухолью обводили интересующую объемную зону (VOI) 3,5 см<sup>3</sup> и регистрировали показатели. Затем указанную VOI копировали на контралатеральную молочную железу и печень для получения показателей в референсных зонах.

### Статистический анализ

Значения представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Значимость различий между захватом в органах в разные моменты времени анализировали с использованием однофакторного ANOVA. Значимость различий между значениями отношений опухоль-к-контралатеральной молочной железе и опухоль-к-печени для HER2-положительных и HER2-отрицательных опухолей анализировали с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Двухстороннее значение P менее 0,05 считали значимым.

### Результаты

#### Безопасность и переносимость

$^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 вводили двадцати восьми пациентам. Введение хорошо переносилось. Во время визуализации или периода последующего наблюдения нежелательные не наблюдались никакие реакции, связанные с лекарственным средством, или изменения показателей жизнедеятельности. Не было выявлено никаких изменений в анализах крови и мочи.

#### Распределение и дозиметрия

Наибольший захват в нормальных органах наблюдалось в почках, печени и легких (Фиг. 1 и Таблица 2). В содержимом желудочно-кишечного тракта наблюдалась умеренная активность. Также визуализировался захват в слюнных и слезных железах. Распределение активности после инъекции 500 мкг и 1000 мкг было очень похожим. Единственное значимое различие ( $p < 0,05$ ) между двумя дозами обнаружили при сравнении захвата в содержимом кишечника через 6 и 24 ч после инъекции, при этом захват был меньше при дозе 500 мкг. В почках, печени, легких и содержимом кишечника захват с коррекцией на распад выходил на плато через 2 ч после инъекции.

Таблица 2. Накопление  $^{99m}\text{Tc}$  в безопухолевых областях органов с наибольшим захватом на изображениях SPECT после инъекции  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 (с коррекцией на распад). Данные представлены в процентах от радиоактивности, введенной при инъекции, на орган (средние значения и стандартные отклонения (SD) для всех пациентов).

	Почки			Легкие		
	250 мкг	500 мкг	1000 мкг	250 мкг	500 мкг	1000 мкг
2 ч	26 $\pm$ 10	27 $\pm$ 10	35 $\pm$ 9	2,7 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,8	2,7 $\pm$ 0,6
4 ч		31 $\pm$ 12	36 $\pm$ 10		2,5 $\pm$ 0,8	2,2 $\pm$ 0,4

6 ч		32±9	45±11		2,0±0,6 <sup>c</sup>	2,0±0,4 <sup>c</sup>
24 ч		29±10	38±8		1,4±0,5 <sup>b</sup>	1,2±0,4 <sup>b</sup>
	Печень			Тонкая кишка		
	250 мкг	500 мкг	1000 мкг	250 мкг	500 мкг	1000 мкг
2 ч	3,1±0,3	3,2±1,1	2,4±0,8	1,8±0,4	0,8±0,3	1,0±0,3
4 ч		2,8±1,1	2,4±1,0		0,9±0,3	1,3±0,5
6 ч		2,6±0,8	2,0±0,7		0,8±0,3 <sup>a</sup>	1,3±0,5
24 ч		2,4±1,0	1,8±0,8		0,6±0,2 <sup>a</sup>	1,0±0,3

<sup>a</sup> Значимо ( $p < 0,05$ ) более низкий захват в содержимом кишечника после инъекции 500 мкг по сравнению с 1000 мкг;

<sup>b</sup> Значимо ( $p < 0,05$ ) более низкий захват в легких через 24 ч после инъекции по сравнению с 2 и 4 ч;

<sup>c</sup> Значимо ( $p < 0,05$ ) более низкий захват в легких через 6 ч после инъекции по сравнению с 2 ч.

Кинетика <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6 в крови показана на Фиг. 2. Скорости выведения для 500 мкг (время полужизни 3,1 ч, ДИ (доверительный интервал) 95% от 2,4 до 4,0 ч) и 1000 мкг (время полужизни 3,0 ч, ДИ 95% от 2,3 до 3,9 ч) были похожими.

Расчетные поглощенные дозы представлены в Таблице 3. Органом с наибольшим поглощением были почки. Поглощение в надпочечниках, стенке желчного пузыря, печени, селезенке и поджелудочной железе также были заметными, хотя они и были в несколько раз ниже чем доза в почках. Дозы в надпочечниках, стенке желудка, селезенке, щитовидной железе и матке были значимо ( $p < 0,05$ ) выше для 1000 мкг, однако абсолютная разница была заметной только в случае надпочечников и щитовидной железы. Общая эффективная доза составляла  $0,009 \pm 0,002$  мЗв/МБк для 500 мкг и  $0,010 \pm 0,003$  мЗв/МБк для 1000 мкг. В случае типичной введенной посредством инъекции активности в данном исследовании, 380 МБк, это будет означать эффективную дозу 3,4 и 3,8 мЗв.

Таблица 3. Поглощенные дозы после инъекции 500 и 1000 мкг.

	500 мкг	1000 мкг
Надпочечники	$0,023 \pm 0,005^*$	$0,032 \pm 0,009$
Головной мозг	$0,001 \pm 0,000$	$0,001 \pm 0,000$
Молочные железы	$0,007 \pm 0,002$	$0,009 \pm 0,005$

Стенка желчного пузыря	0,013±0,008	0,012±0,003
Нижняя стенка толстой кишки	0,005±0,001	0,005±0,001
Тонкая кишка	0,006±0,001	0,008±0,002
Стенка желудка	0,006±0,001*	0,008±0,002
Верхняя стенка толстой кишки	0,007±0,001	0,008±0,002
Стенка сердца	0,004±0,001	0,004±0,001
Почки	0,135±0,042	0,191±0,047
Печень	0,011±0,008	0,008±0,002
Легкие	0,005±0,001	0,006±0,001
Мышцы	0,003±0,000	0,003±0,001
Яичники	0,008±0,002	0,010±0,003
Поджелудочная железа	0,011±0,002	0,014±0,004
Красный костный мозг	0,004±0,001	0,005±0,001
Остеогенные клетки	0,006±0,001	0,008±0,002
Кожа	0,001±0,000	0,002±0,000
Селезенка	0,011±0,003*	0,015±0,004
Тимус	0,005±0,002	0,006±0,002
Щитовидная железа	0,009±0,004*	0,014±0,005
Стенка мочевого пузыря	0,012±0,007	0,012±0,006
Матка	0,005±0,001*	0,007±0,002
Все тело	0,004±0,001	0,005±0,001
Эквивалент эффективной дозы (мЗв/МБк)	0,017±0,004	0,022±0,005
Эффективная доза (мЗв/МБк)	0,009±0,002	0,010±0,003

Данные представлены как среднее, выраженное в мГр/МБк ± SD (n = 9).

\* Значимое (p < 0,05) различие между дозами после инъекции 500 и 1000 мкг.

### **Различение опухолей с высокой и низкой экспрессией HER2**

Неожиданно, все опухоли и пораженные лимфоузлы, как с высокой, так и с низкой экспрессией HER2, отчетливо визуализировались уже через 2 ч после инъекции 250, 500 или 1000 мкг <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6 и оставались видимыми на протяжении всего исследования (Фиг. 1 и 4).

Также неожиданным оказалось то, что наилучшее различение опухолей с высокой и низкой экспрессией HER2 обеспечивалось в случае инъекции 500 мкг <sup>99m</sup>Tc-ADAPT6. Среднее значение отношения опухоль-к-контралатеральной молочной железе

для HER2-положительных опухолей уже через 2 ч после инъекции составляло  $37 \pm 19$ , что было значимо ( $p < 0,001$ , тест Манна-Уитни) выше значения для HER2-отрицательных опухолей ( $5 \pm 2$ ) (Фиг. 3). Наблюдалась тенденция к увеличению отношения со временем (Фиг. 3), однако разница между моментами времени не была значимой. Отношение опухоль-к-контралатеральной молочной железе для 500 мкг было значимо ( $p < 0,05$ ) выше, чем для 1000 мкг через 2, 4 и 6 ч. Кроме того, в любой момент времени разница в значениях отношений опухоль-к-контралатеральной молочной железе между HER2-положительными и HER2-отрицательными опухолями в случае инъекции 1000 мкг не были значимыми ( $p > 0,05$ , тест Манна-Уитни) (Фиг. 3). Отношение опухоль-к-контралатеральной молочной железе для 250 мкг через 2 ч ( $7,8 \pm 4,9$ ) также было значимо ( $p < 0,05$ ) ниже, чем для 500 мкг (Фиг. 3).

Пациента 17 включили в данное исследование, поскольку первоначальная оценка посредством ИНС анализируемого биоптата позволила предположить уровень экспрессии 3+. Однако визуализация показала необычайно низкое отношение опухоль-к-контралатеральной молочной железе ( $1,33$  через 2 ч). Образцы биоптата были исследованы дополнительно и было обнаружено, что они FISH-отрицательные. В результате лечение скорректировали и HER2-таргетную терапию отменили.

У пациента 4 визуализация выявила, помимо первичной опухоли и дополнительных метастазов, очаг накопления в 5 ребре и два очага в позвонках Th8 и Th9 (Фиг. 5A). КТ-визуализация и остеосцинтиграфия с применением  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфата (Фиг. 5B) не выявила никаких метастазов. Однако дальнейшее исследование посредством МРТ подтвердило наличие метастазов в Th8 и Th9. В результате этих находок тактику лечения пациента 4 изменили, начав химиотерапию и таргетную анти-HER2 терапию вместо хирургического лечения. Остеосцинтиграфия с применением  $^{99m}\text{Tc}$ -пирофосфата (Фиг. 5C) подтвердила наличие метастатических поражений в 5 ребре и позвонках Th8 и Th9 через шесть месяцев после визуализации с применением  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6.

Инъекции  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 приводили к более высокому захвату в опухолях по сравнению с печенью, независимо от вводимой дозы (Фиг. 6). Для дозы инъецированного белка 50 мкг наблюдались немного более высокие отношения опухоль-к-печени.

### **Обсуждение**

Результаты данного исследования демонстрируют, что инъекции  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6

безопасны и хорошо переносятся. Средняя эффективная доза 0,010 мЗв/МБк в данном исследовании соответствует 3,8 мЗв на пациента. Это немного ниже по сравнению с дозами, о которых сообщалось при визуализации с применением молекулы  $^{68}\text{Ga}$ -ABY<sub>25</sub> аффитела (5,6 мЗв) (Sandström 2016) или  $^{68}\text{Ga}$ -нанотела (4,6 мЗв) (Keyaerts 2016), и значительно ниже чем эффективные дозы для  $^{89}\text{Zr}$ -трастузумаба (18-38 мЗв) (Dijkers 2010; Laforest 2016) или  $^{89}\text{Zr}$ -пертузумаба (39 мЗв) (Ulaner 2018). Следует отметить, что четкое различие HER2-положительных и HER2-отрицательных опухолей уже через 2 ч после инъекции может позволить дополнительно уменьшить инъецируемую активность в два раза.

Различение HER2-положительных и HER2-отрицательных очагов является главной задачей молекулярной визуализации. Однако термин «HER2-отрицательный», то есть неподходящий для HER2-таргетной терапии, вводит в заблуждение. Опухоли молочной железы с баллом ИHC 3+ (и FISH-отрицательные) считаются HER2-отрицательными, однако они могут экспрессировать до 500 000 рецепторов HER2 на клетку (Ross 2004). Таким образом, некоторое накопление визуализирующих зондов ожидается даже в HER2-отрицательных очагах. Исследования на мышах продемонстрировали, что увеличение инъецируемой дозы  $^{68}\text{Ga}$ -меченного ADAPT6 с 1 до 15 мкг улучшало различие человеческих ксенографтов с высокой и низкой экспрессией HER2, хотя и ценой немного более низкого захвата в опухолях с высокой экспрессией (Garousi 2015). Однако перенос на человека результатов, полученных на мышах, является достаточно непредсказуемым. В связи с этим оценивали инъекции  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ADAPT6 с разными уровнями доз. Неожиданно, 500 мкг обеспечивали превосходное различие уже через 2 ч после инъекции (Фиг. 3), и отношение опухоль-к-контралатеральной молочной железе имело тенденцию к увеличению с течением времени. Напротив, инъекция 1000 мкг не обеспечивала различие между HER2-положительными и HER2-отрицательными опухолями. Для проверки, позволит ли дальнейшее уменьшение инъецированного количества улучшить различие, дополнительной меньшей когорте пациентов инъецировали 250 мкг  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ADAPT6. Однако контрастность при такой визуализации явным образом уступала контрастности при визуализации с применением 500 мкг  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ADAPT6 (Фиг. 3). Таким образом, инъецируемая доза 500 мкг является оптимальной, и отклонение от указанной дозы приведет к ухудшению как чувствительности, так и специфичности визуализации экспрессии HER2. Доза 500 мкг позволяет достичь баланса между насыщением HER2 в

печени, что увеличивает биодоступность радиоактивно меченного ADAPT6, и насыщением HER2 в опухолях, что снижает захват  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 в HER2-положительных очагах. Способность  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 обеспечивать четкое различие уже через 2 ч после введения является неожиданной. Например, меченая  $^{68}\text{Ga}$  молекула аффитела обеспечивает такое различие через 4 ч (Sörensen 2016). Возможность ранней визуализации позволяет уменьшить инъецируемую активность, и, следовательно, снизить эффективную дозу для пациентов. Очевидно, что клиническую визуализацию с применением  $^{99m}\text{Tc}$ -ADAPT6 предпочтительно осуществляют примерно через 2 ч после инъекции. Увеличение временного интервала между инъекцией и визуализацией может потребовать либо увеличения инъецированной активности (и, следовательно, эффективной дозы), либо уменьшения статистики счета во время инъекции (и, следовательно, уменьшения достоверности реконструкции).

PET считается методом визуализации, обеспечивающим наилучшее разрешение и чувствительность. Однако современные методы PET/КТ в основном используют в Европе и Северной Америке, тогда как в Азии и в Южной Африке наиболее распространенным методом визуализации является SPECT. Таким образом, в указанных регионах существует потребность в  $^{99m}\text{Tc}$ -меченных таргетных белках и пептидах (Briganti 2019). Кроме того, разработка камер с CZT-детектором существенно улучшает разрешение и чувствительность SPECT-визуализации (Desmonts 2020; Goshen 2018). Таким образом, можно предугадать повышенное использование CZT SPECT для молекулярной визуализации даже в Европе и США. Способ визуализации по настоящему изобретению представляет собой подходящий вариант для таких применений.

По причинам, указанным ниже, ожидается, что доза примерно 500 мкг будет оптимальной также в случае замены  $^{99m}\text{Tc}$  другим радиоактивным изотопом.

Основными факторами, определяющими захват в опухоли, являются: инъецированная доза белка; скорость экстравазации в опухолях; скорость диффузии в опухолях; скорость выведения визуализирующего агента, не связавшегося с опухолью или HER2 в нормальной ткани; связывание с HER2 в опухоли; и связывание с HER2, экспрессируемым нормальными гепатоцитами в печени. Скорости экстравазации, диффузии и выведения определяются преимущественно размером агента. Тип радиоактивной метки не оказывает какого-либо существенного влияния на этот размер. Связывание HER2 (в опухоли или гепатоцитах) определяется аффинностью, которая в



основном определяется HER2-связывающим белком. Не ожидается, что тип радиоактивной метки будет оказывать какое-либо значительное влияние на аффинность, в частности, когда радиоактивный изотоп отделен от HER2-связывающей области спейсерной областью.

### **Литература**

[0001] Bartley AN, Washington MK, Colasacco C, et al. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2017 Feb;35(4):446-464

[0002] Bensch F, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN, de Jong JR, van der Veegt B, Sleijfer S, et al. <sup>89</sup>Zr-trastuzumab PET supports clinical decision making in breast cancer patients, when HER2 status cannot be determined by standard work up. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;45:2300–6.

[0003] Briganti V, Cuccurullo V, Di Stasio GD, Mansi L. Gamma Emitters in Pancreatic Endocrine Tumors Imaging in the PET Era: Is there a Clinical Space for <sup>99m</sup>Tc-peptides? *Curr Radiopharm*. 2019;12(2):156-170

[0004] Desmouts C, Bouthiba MA, Enilorac B, Nganoa C, Agostini D, Aide N. Evaluation of a new multipurpose whole-body CzT-based camera: comparison with a dual-head Anger camera and first clinical images. *EJNMMI Phys*. 2020 Mar 17;7(1):18.

[0005] Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, de Jong JR, et al. Biodistribution of <sup>89</sup>Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87:586–92.

[0006] Garousi J, Lindbo S, Nilvebrant J, et al. ADAPT, a Novel Scaffold Protein-Based Probe for Radionuclide Imaging of Molecular Targets That Are Expressed in Disseminated Cancers. *Cancer Res*. 2015;75:4364–4371

[0007] Gebhart G, Flamen P, De Vries EG, Jhaveri K, Wimana Z. Imaging Diagnostic and Therapeutic Targets: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2. *J Nucl Med*. 2016 Feb;57 Suppl 1:81S-8S

[0008] Gebhart G, Lamberts LE, Wimana Z, Garcia C, Emonts P, Ameye L, et al. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial. *Ann Oncol* 2016;27:619–24.

[0009] Goshen E, Beilin L, Stern E, Kenig T, Goldkorn R, Ben-Haim S. Feasibility

study of a novel general purpose CZT-based digital SPECT camera: initial clinical results. *EJNMMI Phys.* 2018 Mar 14;5(1):6

[0010] Keyaerts M, Xavier C, Heemskerk J, Devoogdt N, Everaert H, Ackaert C, Vanhoeij M, Duhoux FP, Gevaert T, Simon P, Schallier D, Fontaine C, Vaneycken I, Vanhove C, De Greve J, Lamote J, Caveliers V, Lahoutte T. Phase I Study of <sup>68</sup>Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *J Nucl Med.* 2016 Jan;57(1):27-33

[0011] Laforest R, Lapi SE, Oyama R, Bose R, Tabchy A, Marquez-Nostra BV, et al. [<sup>89</sup>Zr]Trastuzumab: Evaluation of Radiation Dosimetry, Safety, and Optimal Imaging Parameters in Women with HER2-Positive Breast Cancer. *Mol Imaging Biol.* 2016;18:952–9

[0012] Lindbo S, Garousi J, Åstrand M, Honarvar H, Orlova A, Hober S, Tolmachev V. Influence of Histidine-Containing Tags on the Biodistribution of ADAPT Scaffold Proteins. *Bioconjug Chem.* 2016 Mar 16;27(3):716-26.

[0013] Mankoff DA, Edmonds CE, Farwell MD, Pryma DA. Development of Companion Diagnostics. *Semin Nucl Med* 2016;46:47-56.

[0014] Mortimer JE, Bading JR, Colcher DM, Conti PS, Frankel PH, Carroll MI, et al. Functional imaging of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer using (<sup>64</sup>Cu-DOTA-trastuzumab PET. *J Nucl Med* 2014;55:23–9.

[0015] Nilvebrant J, Hober S. The albumin-binding domain as a scaffold for protein engineering. *Comput Struct Biotechnol J.* 2013;6:1–8.

[0016] Nilvebrant J, Åstrand M, Georgieva-Kotseva M, Björnmalm M, Löfblom J, Hober S. Engineering of bispecific affinity proteins with high affinity for ERBB2 and adaptable binding to albumin. *PLoS One.* 2014 Aug 4;9(8):e103094.

[0017] Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:379–398.

[0018] Sandström M, Lindskog K, Velikyan I, Wennborg A, Feldwisch J, Sandberg D, Tolmachev V, Orlova A, Sörensen J, Carlsson J, Lindman H, Lubberink M. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Anti-HER2 Affinity Molecule <sup>68</sup>Ga-ABY-025 in Breast Cancer Patients. *J Nucl Med.* 2016 Jun;57(6):867-71.

[0019] Sörensen J, Velikyan I, Sandberg D, Wennborg A, Feldwisch J, Tolmachev V, Orlova A, Sandström M, Lubberink M, Olofsson H, Carlsson J, Lindman H. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using [<sup>68</sup>Ga]ABY-025 Affinity Molecule PET/CT. *Theranostics.* 2016 Jan 1;6(2):262-71.

[0020] Tolmachev V. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy. *Curr Pharm Des* 2008;14:2999-3019.

[0021] Ulaner GA, Hyman DM, Lyashchenko SK, Lewis JS, Carrasquillo JA. <sup>89</sup>Zr-Trastuzumab PET/CT for Detection of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastases in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Primary Breast Cancer. *Clin Nucl Med*. 2017;42:912–7.

[0022] Ulaner GA, Lyashchenko SK, Riedl C, Ruan S, Zanzonico PB, Lake D, et al. First-in-Human Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeted Imaging Using <sup>89</sup>Zr-Pertuzumab PET/CT: Dosimetry and Clinical Application in Patients with Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2018;59:900–6.

[0023] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997-4013.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Визуализирующий агент для использования в способе визуализации экспрессии HER2 (рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста) у пациента-человека, где способ включает введение пациенту визуализирующего агента в дозе 400-700 мкг и последующее сканирование пациента для визуализации экспрессии HER2, где визуализирующий агент представляет собой конъюгат, содержащий радиоактивный изотоп и HER2-связывающий белок (НВР), и где НВР содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

1)  $LAX_3AKX_6TX_8X_9Y$   $HLX_{13}X_{14}X_{15}GVX_{18}DX_{20}$   $YKX_{23}LIDKX_{28}KT$   
 $VEX_{33}VX_{35}AX_{37}YX_{39}X_{40}$   $ILX_{43}ALP$ , 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 2) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, определенной в (1), или состоит из такой аминокислотной последовательности.

2. Визуализирующий агент для использования по п. 1, где радиоактивный изотоп присоединен к концу НВР, такому как N-конец НВР.

**3.** Визуализирующий агент для использования по п. 2, где визуализирующий агент дополнительно содержит линкерную аминокислотную последовательность и радиоактивный изотоп присоединен к концу НВР посредством линкерной аминокислотной последовательности.

**4.** Визуализирующий агент для использования по п. 3, где число аминокислотных остатков в линкерной аминокислотной последовательности составляет 5 - 30, например 5 - 20.

**5.** Визуализирующий агент для использования по п. 3 или 4, где по меньшей мере часть линкерной аминокислотной последовательности образует хелатор радиоактивного изотопа.

**6.** Визуализирующий агент для использования по п. 5, где хелатор содержит последовательность ННННН (SEQ ID NO:3).

**7.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 3 - 6, где линкерная аминокислотная последовательность отделяет любой хелатор или иную группировку, связывающую радиоактивный изотоп, от НВР по меньшей мере на пять аминокислотных остатков, например по меньшей мере на шесть аминокислотных остатков.

**8.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-7, где в аминокислотной последовательности (1):

X<sub>3</sub> выбран из A, G, P;

X<sub>6</sub> представляет собой E;

X<sub>9</sub> представляет собой L;

X<sub>13</sub> представляет собой D;

X<sub>14</sub> представляет собой R;

X<sub>15</sub> выбран из L и V;

X<sub>18</sub> выбран из S и A;

X<sub>20</sub> выбран из F, Y и A;

X<sub>28</sub> представляет собой A;

X<sub>33</sub> представляет собой G;

X<sub>35</sub> выбран из K и R;

X<sub>37</sub> представляет собой L;

X<sub>39</sub> выбран из F и L;

X<sub>40</sub> представляет собой E;

и

X<sub>43</sub> выбран из H, P и R.

**9.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-8, где HBP 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),

или состоит из такой аминокислотной последовательности.

**10.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-9, где HBP содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

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

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

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

или состоит из такой аминокислотной последовательности.

**11.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-10, где радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{67}\text{Ga}$ .

**12.** Визуализирующий агент для использования по п. 10, где радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{67}\text{Ga}$ .

**13.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-12, где радиоактивный изотоп конъюгирован с НВР посредством хелатора или простетической группы, образующей ковалентную связь с радиоактивным изотопом.

**14.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-13, который содержит менее 73 аминокислотных остатков, например менее 68 аминокислотных остатков.

**15.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-14, где визуализирующий агент вводят внутривенно.

**16.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-15, где сканирование осуществляют в пределах 4 часов от введения визуализирующего агента, например в пределах 3 часов от введения визуализирующего агента.

**17.** Визуализирующий агент для использования по п. 15, где сканирование осуществляют в пределах от 1 до 3 часов после введения визуализирующего агента, например в пределах от 1,5 до 2,5 часов после введения визуализирующего агента.

**18.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-17, где пациент страдает раком молочной железы или гастроэзофагеальным раком.

**19.** Визуализирующий агент для использования по любому из пп. 1-18, где доза составляет 400-600 мкг, например 450-550 мкг, например примерно 500 мкг.

**20.** Единичная доза, содержащая визуализирующий агент в количестве 400-700 мкг, где визуализирующий агент представляет собой конъюгат, содержащий радиоактивный изотоп и HER2-связывающий белок (НВР), и где НВР содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

1) LAX<sub>3</sub>AKX<sub>6</sub>TX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>Y HLX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GVX<sub>18</sub>DX<sub>20</sub> YKX<sub>23</sub>LIDKX<sub>28</sub>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 2) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, определенной в (1).

**21.** Единичная доза по п. 20, где визуализирующей агент приготовлен в виде композиции, адаптированной для внутривенного введения.

**22.** Единичная доза по п. 21, где объем композиции составляет 1-15 мл, например 1-10 мл, такой как 8-10 мл.

**23.** Единичная доза по п. 21 или 22, где композиция имеет водную основу, такую как солевой раствор.

**24.** Единичная доза по п. 23, где композиция на водной основе забуферена, например забуферена фосфатом.

**25.** Единичная доза по любому из пп. 20 - 24, где количество составляет 400-600 мкг, например 450-550 мкг, такое как примерно 500 мкг.

**26.** Продукт, содержащий контейнер и единичную дозу по любому из пп. 20 - 25, где единичная доза содержится в контейнере.

**27.** Продукт по п. 26, где контейнер представляет собой флакон или ампулу.



**28.** Продукт по п. 26 или 27, где объем контейнера составляет 1-15 мл, например 1-10 мл, такой как 8-10 мл.

**29.** Способ визуализации экспрессии HER2 у пациента-человека, включающий введение пациенту визуализирующего агента в дозе 400-700 мкг и последующее сканирование пациента для визуализации экспрессии HER2, где визуализирующий агент представляет собой конъюгат, содержащий радиоактивный изотоп и HER2-связывающий белок (НВР), и где НВР содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

(1) LAX<sub>3</sub>AKX<sub>6</sub>TX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>Y HLX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GVX<sub>18</sub>DX<sub>20</sub> YKX<sub>23</sub>LIDKX<sub>28</sub>KT  
VEX<sub>33</sub>VX<sub>35</sub>AX<sub>37</sub>YX<sub>39</sub>X<sub>40</sub> ILX<sub>43</sub>ALP, где независимо друг от друга

X<sub>3</sub> выбран из A, G, P, S и V;

X<sub>6</sub> выбран из D и E,

X<sub>8</sub> выбран из A и V;

X<sub>9</sub> выбран из L и N;

X<sub>13</sub> выбран из D и T;

X<sub>14</sub> выбран из K и R;

X<sub>15</sub> выбран из I, L, M, T и V;

X<sub>18</sub> выбран из S и A;

X<sub>20</sub> выбран из F, Y и A;

X<sub>23</sub> выбран из D и R;

X<sub>28</sub> выбран из A и V;

X<sub>33</sub> выбран из G, S и D;

X<sub>35</sub> выбран из K, M и R;

X<sub>37</sub> выбран из L и R;

X<sub>39</sub> выбран из A, F и L;

X<sub>40</sub> выбран из A и E; и

X<sub>43</sub> выбран из A, H, K, P, R, T, Q и Y;

и 2) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, определенной в (1),

или состоит из такой аминокислотной последовательности.

**30.** Способ по п. 29, где радиоактивный изотоп присоединен к концу НВР, такому как N-конец НВР.

**31.** Способ по п. 30, где визуализирующий агент дополнительно содержит

линкерную аминокислотную последовательность и радиоактивный изотоп присоединен к концу НВР посредством линкерной аминокислотной последовательности.

**32.** Способ по п. 31, где число аминокислотных остатков в линкерной аминокислотной последовательности составляет 5 - 30, например 5 - 20.

**33.** Способ по п. 31 или 32, где по меньшей мере часть линкерной аминокислотной последовательности образует хелатор радиоактивного изотопа.

**34.** Способ по п. 33, где хелатор содержит последовательность НННННН (SEQ ID NO:3).

**35.** Способ по любому из пп. 31 - 34, где линкерная аминокислотная последовательность отделяет любой хелатор или иную группировку, связывающую радиоактивный изотоп, от НВР по меньшей мере на пять аминокислотных остатков, например по меньшей мере на шесть аминокислотных остатков.

**36.** Способ по любому из пп. 29 - 35, где в аминокислотной последовательности (1):

X<sub>3</sub> выбран из А, G, P;

X<sub>6</sub> представляет собой E;

X<sub>9</sub> представляет собой L;

X<sub>13</sub> представляет собой D;

X<sub>14</sub> представляет собой R;

X<sub>15</sub> выбран из L и V;

X<sub>18</sub> выбран из S и A;

X<sub>20</sub> выбран из F, Y и A;

X<sub>28</sub> представляет собой A;

X<sub>33</sub> представляет собой G;

X<sub>35</sub> выбран из K и R;

X<sub>37</sub> представляет собой L;

X<sub>39</sub> выбран из F и L;

X<sub>40</sub> представляет собой E; и

X<sub>43</sub> выбран из H, P и R.

**37.** Способ по любому из пп. 29 - 36, где НВР 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 HLTRGVSDY YKDLIDKAK TVEGVRALYFE ILYALP (SEQ ID NO:16); и

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

или состоит из такой аминокислотной последовательности.

**38.** Способ по любому из пп. 29 - 37, где НБР содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

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

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

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

или состоит из такой аминокислотной последовательности

**39.** Способ по любому из пп. 29 - 38, где радиоактивный изотоп выбран из

группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{41}\text{Ti}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  и  $^{111}\text{In}$ .

**40.** Способ по п. 39, где радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  и  $^{111}\text{In}$ .

**41.** Способ по любому из пп. 29 - 40, где радиоактивный изотоп конъюгирован с НВР посредством хелатора или простетической группы, образующей ковалентную связь с радиоактивным изотопом.

**42.** Способ по любому из пп. 29 - 41, где визуализирующий агент содержит менее 73 аминокислотных остатков, например менее 68 аминокислотных остатков.

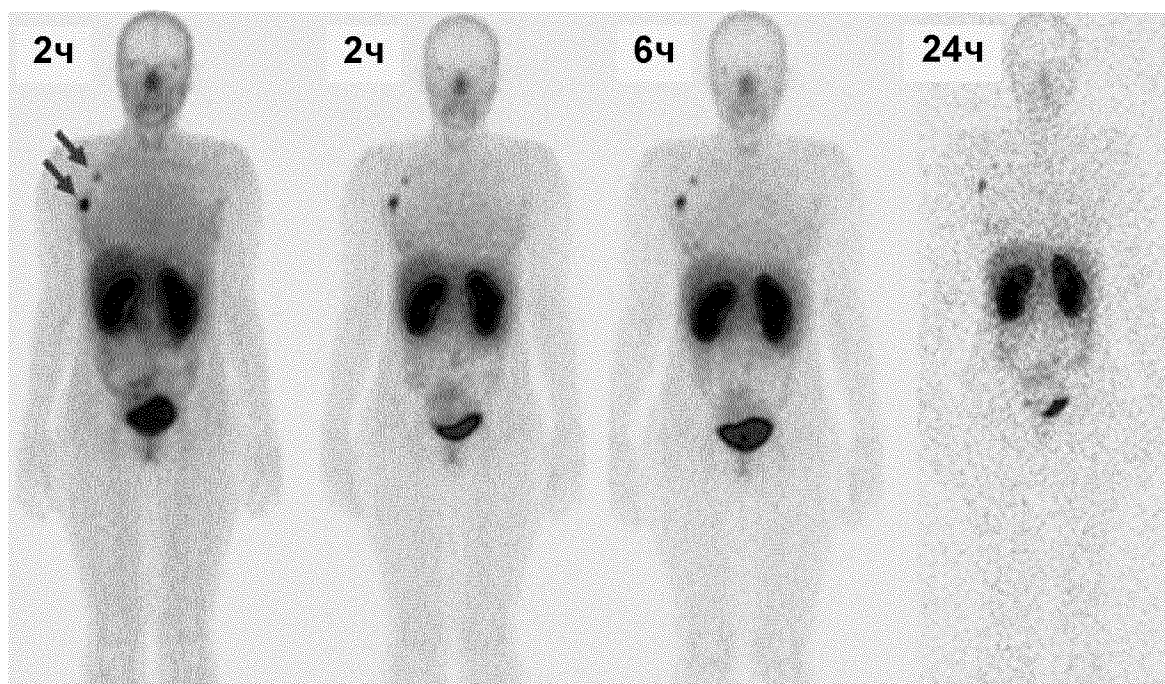
**43.** Способ по любому из пп. 29 - 42, где введение является внутривенным.

**44.** Способ по любому из пп. 29 - 43, где сканирование осуществляют в пределах 4 часов от введения визуализирующего агента, например в пределах 3 часов от введения визуализирующего агента.

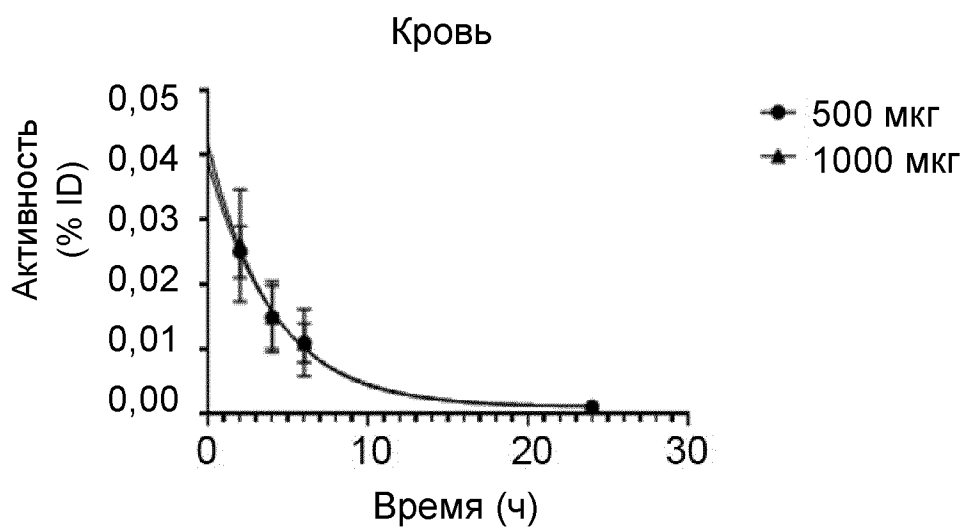
**45.** Способ по п. 44, где сканирование осуществляют в пределах от 1 до 3 часов после введения визуализирующего агента, например в пределах от 1,5 до 2,5 часов после введения визуализирующего агента.

**46.** Способ по любому из пп. 29-45, где пациент страдает раком молочной железы или гастроэзофагеальным раком.

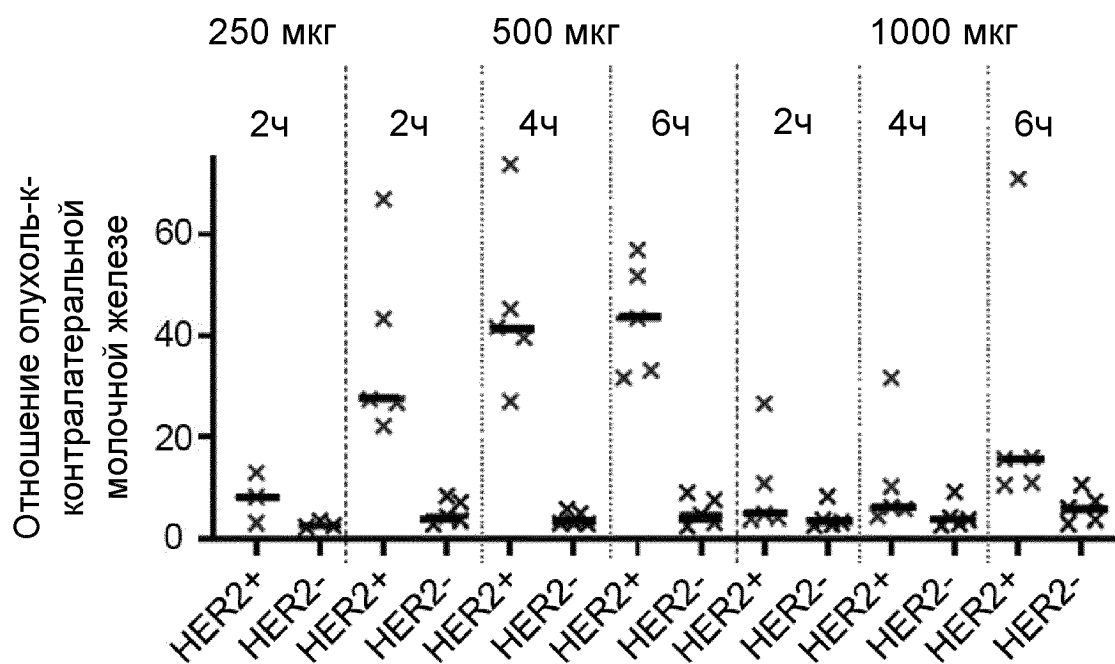
**47.** Способ по любому из пп. 29 - 46, где доза составляет 400-600 мкг, например 450-550 мкг, например примерно 500 мкг.



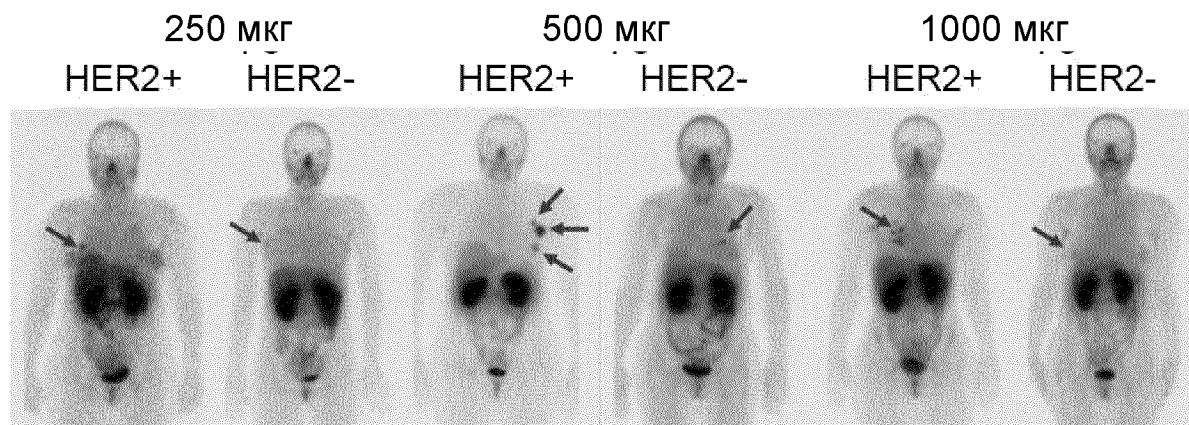
Фиг. 1



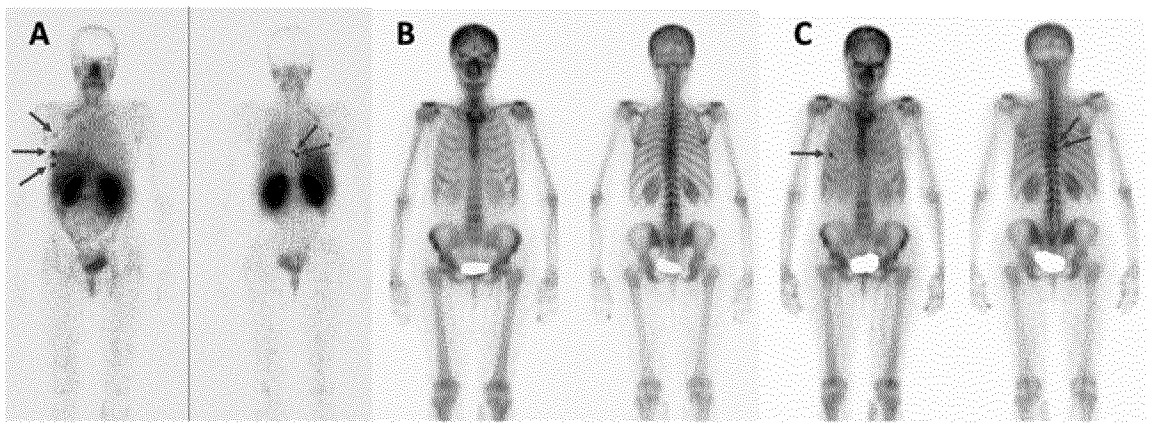
Фиг. 2



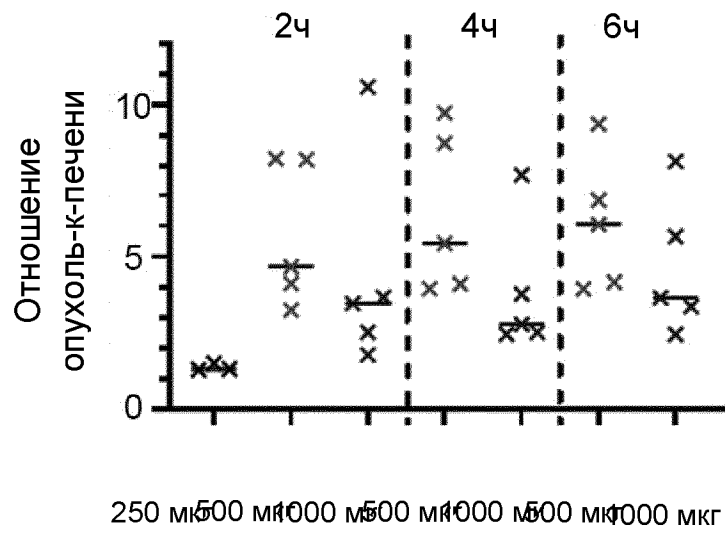
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6