### (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки2023.11.29
- (22) Дата подачи заявки 2022.03.31

**C07K 16/28** (2006.01) (51) Int. Cl. A61K 9/08 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01) **A61K 47/42** (2017.01) A61K 47/68 (2017.01) A61K 47/69 (2017.01) A61K 51/02 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) **C07K** 7/00 (2006.01) **C07K 7/08** (2006.01) **C07K 19/00** (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01) C12P 21/08 (2006.01) **G01T 1/161** (2006.01)

## (54) РАДИОАКТИВНЫЙ КОМПЛЕКС АНТИ-EGFR АНТИТЕЛА И РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО

- (31) 2021-062104; 2021-179348; 2022-021670
- (32) 2021.03.31; 2021.11.02; 2022.02.15
- (33) JP
- (86) PCT/JP2022/016647
- (87) WO 2022/211051 2022.10.06
- (71) Заявитель:

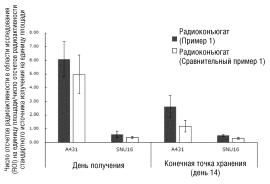
НИХОН МЕДИ-ФИЗИКС КО., ЛТД. (JP) **(72)** Изобретатель:

Каватани Минору, Ханада Такахиса, Тоноя Гота, Такеда Такуя (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает конъюгат, обладающий более хорошей стабильностью, чем у обычных конъюгатов, без ухудшения эффективности. Конъюгат по настоящему изобретению представляет собой конъюгат анти-EGFR антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.



#### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579481EA/081

# РАДИОАКТИВНЫЙ КОМПЛЕКС АНТИ-EGFR АНТИТЕЛА И РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО

[Область техники, к которой относится изобретение] [0001]

Настоящее изобретение относится к радиоконъюгату анти-EGFR антитела и радиофармацевтическому средству.

[Предпосылки создания изобретения]

[0002]

**EGFR** (рецептор эпидермального фактора роста) является рецептором тирозинкиназного типа, который распознает фактор роста, контролирующий пролиферацию и рост клеток, и осуществляет сигнальную трансдукцию, и представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой около 170 кДа. Его также называют HER1 или ErbB1.

[0003]

В качестве анти-EGFR антитела известен цетуксимаб. Цетуксимаб представляет собой моноклональное антитело, которое ингибирует действие EGFR, используемое в качестве противоракового средства, и является одним из молекулярно-таргетных лекарственных препаратов, которые нацелены на определенные молекулы, участвующие в росте рака и т.п.

[0004]

Известно, что цетуксимаб представляет собой антитело, используемое в ADC (конъюгатах антитело-лекарственное средство), представленных на рынке. Примеры ADC с использованием цетуксимаба включают лекарственное средство, в котором полезная нагрузка (лекарственное средство), которая представляет собой химиотерапевтическое средство или фоточувствительное вещество, ковалентно связана с антителом через линкер.

Лекарственные средства на основе антител обладают высокой селективностью к мишени и относительно небольшим количеством побочных эффектов, однако их эффективность иногда оказывается недостаточной. Химиотерапевтические средства как один из типов полезной нагрузки обладают высокой эффективностью, но их низкая селективность к мишени увеличивает минимальную эффективную дозу, необходимую для уничтожения раковых клеток, и снижает максимально переносимую дозу, поскольку из-за токсичности дозу невозможно значительно увеличить, что создает проблему узкого диапазона терапевтической дозировки.

Что касается ADC, более высокие количества химиотерапевтических средств могут селективно доставляться к раковым клеткам. Ожидается, что это приведет к расширению диапазона терапевтических доз, поскольку более низкие дозы обеспечивают достижение эффектов, уменьшаются количества химиотерапевтических средств, которые достигают

нормальных клеток, а максимально переносимые дозы увеличиваются.

[0005]

Одним из подходов к ADC является радиоиммуноконъюгат. В радиоиммуноконъюгатах вместо полезных нагрузок используются радионуклиды.

[0006]

Патентная литература 1 описывает радиоактивную фармацевтическую композицию, в которой цетуксимаб модифицирован радиоактивной медью с использованием бифункционального хелатирующего агента, такого как 3,6,9,15-тетраазабицикло[9.3.1]-пентадека-1(15),11,13-триен-3,6,9-триуксусная кислота (РСТА) и т.п.

[0007]

Кроме того, радиоиммуноконъюгаты с использованием в качестве радионуклидов испускающих гамма-излучение и позитрон-испускающих радионуклидов можно использовать для исследований в области ядерной медицины. Патентная литература 2 описывает, что цетуксимаб можно модифицировать путем введения DTPA в пептид, который сайт-специфически модифицирует Fc-область антитела, и пометить нуклидом радиоактивного металла.

[Перечень цитируемых документов]

[Патентная литература]

[8000]

[PTL 1]

JP-A-2017-214308

[PTL 2]

WO 2017/217347

[Сущность изобретения]

[0009]

Однако на основании результатов, полученных авторами настоящего изобретения, выяснилось, что обычные радиоконъюгаты анти-EGFR антитела имеют такие проблемы, как низкая стабильность.

[0010]

Патентная литература 1 не описывает сайт-специфическую модификацию анти-EGFR антитела пептидами. Кроме того, она не раскрывает и не предполагает такую проблему анти-EGFR антитела, как образование тиомочевинной связи.

[0011]

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой коньюгат анти-EGFR антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.

[0012]

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее указанный выше конъюгат в качестве активного ингредиента.

[0013]

Кроме того, другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-EGFR антитела в качестве активных ингредиентов, при этом связь между анти-EGFR антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней.

[0014]

"Связь" в настоящем изобретении означает как непосредственное связывание, так и опосредованное связывание, если не указано иное.

[0015]

Согласно настоящему изобретению представлен радиоконъюгат анти-EGFR антитела, который имеет улучшенную стабильность по сравнению с обычными коньюгатами без ухудшения эффективности.

[Краткое описание чертежей]

[0016]

[Фиг. 1]

График, показывающий результаты оценки антигенсвязывающих свойств радиоконьюгатов, полученных как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1. Вертикальная ось указывает значения, полученные путем нормализации значения, полученного путем деления числа отсчетов в области исследования (ROI), установленной на используемом срезе опухоли, на площадь ROI, к значению, полученному путем деления числа отсчетов от стандартного источника излучения на площадь стандартного источника излучения. Горизонтальная ось указывает тип клеток среза опухоли, используемого для оценки. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение каждого образца (n=10).

[Фиг. 2]

Диаграммы, показывающие репрезентативные ПЭТ-изображения (МІР-изображения) радиоконъюгата, полученного в соответствии с Примером 2, у мышей с опухолями. Стрелки указывают опухоли, происходящие из клеток A431, используемых для опухоленосителей.

[Фиг. 3]

Диаграммы, показывающие репрезентативные ПЭТ-изображения (МІР-изображения) радиоконъюгата, полученного в соответствии со Сравнительным примером 2, у мышей с опухолями. Стрелки указывают опухоли, происходящие из клеток A431, используемых для опухоленосителей.

[Фиг. 4]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с опухолями в каждой группе введения радиоконъюгата (Пример 1), группе введения радиоконъюгата (Сравнительный пример 1), контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает относительные значения, когда объем опухоли во время введения каждого лекарственного средства установлен равным 1, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, "\*\*" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от контрольной группы введения антитела, "†" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,05) от группы введения носителя.

[Фиг. 5]

График, показывающий изменения массы тела с течением времени у мышей с опухолями в группе введения радиоконьюгата (Пример 1), группе введения радиоконьюгата (Сравнительный пример 1), контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает относительные значения, когда масса тела во время введения каждого лекарственного средства установлена равной 1, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение массы тела в каждой группе.

[Фиг. 6]

График, показывающий результаты оценки специфичности радиоконъюгатов, полученных как описано в Примере 6, для EGFR. Вертикальная ось указывает значения, полученные путем нормализации значения, полученного путем деления числа отсчетов в ROI, установленной на используемом срезе опухоли, на площадь ROI, к значению, полученному путем деления числа отсчетов от стандартного источника излучения на площадь стандартного источника излучения. Горизонтальная ось указывает тип клеток среза опухоли, используемого для оценки. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение каждого образца (n=10).

[Фиг. 7А]

Графики, демонстрирующие цитотоксический эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба на клетки COLO205 (верхний ряд) и клетки HCT-116 (нижний ряд). Немеченый панитумумаб добавляли в качестве объекта сравнения. Вертикальная ось показывает относительное значение, когда количество жизнеспособных клеток в условиях, когда антитело не добавляли, установлено равным 1, а горизонтальная ось показывает концентрацию добавленного антитела. Графики показывают среднее значение ± стандартное отклонение в каждой группе.

[Фиг. 7В]

Графики, демонстрирующие цитотоксический эффект <sup>225</sup>Ac комплекс-меченного

панитумумаба на клетки SW48 (верхний ряд) и клетки MIAPaCa-2 (нижний ряд). Немеченый панитумумаб добавляли в качестве объекта сравнения. Вертикальная ось показывает относительное значение, когда количество жизнеспособных клеток в условиях, когда антитело не добавляли, установлено равным 1, а горизонтальная ось показывает концентрацию добавленного антитела. Графики показывают среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в каждой группе.

[Фиг. 7С]

График, показывающий цитотоксический эффект <sup>225</sup>Ac комплекс-меченного панитумумаба на клетки NCI-H358. Немеченый панитумумаб добавляли в качестве объекта сравнения. Вертикальная ось показывает относительное значение, когда количество жизнеспособных клеток в условиях, когда антитело не добавляли, установлено равным 1, а горизонтальная ось показывает концентрацию добавленного антитела. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение в каждой группе.

[Фиг. 8]

Графики, показывающие эффективность  $^{225}$ Ас комплекс-меченного панитумумаба для индукции апоптоза в клетках COLO205 и клетках SW48. Немеченый панитумумаб добавляли в качестве объекта сравнения. Вертикальная ось показывает относительное значение, когда активность каспазы-3/7 в условиях, когда антитело не добавляли, установлена равной 1, а горизонтальная ось показывает концентрацию добавленного антитела. Графики показывают среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в каждой группе.

[Фиг. 9А]

Диаграмма, показывающая индуцирующий двухцепочечный разрыв ДНК эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба в клетках SW48. Ядра клеток окрашивали и обнаруживали при помощи DAPI (верхнее изображение), и γH2AX окрашивали и обнаруживали (нижнее изображение).

[Фиг. 9В]

Диаграмма, показывающая индуцирующий двухцепочечный разрыв ДНК эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба в клетках MIAPaCa-2. Ядра клеток окрашивали и обнаруживали при помощи DAPI (верхнее изображение), и γH2AX окрашивали и обнаруживали (нижнее изображение).

[Фиг. 9С]

Диаграмма, показывающая индуцирующий двухцепочечный разрыв ДНК эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба в клетках NCI-H358. Ядра клеток окрашивали и обнаруживали при помощи DAPI (верхнее изображение), и γH2AX окрашивали и обнаруживали (нижнее изображение).

[Фиг. 10]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с опухолями (клетки COLO205) в группе введения радиоконъюгата (Пример 6) с высокой радиоактивностью, группе введения радиоконъюгата (Пример 6) с низкой

радиоактивностью, группе перитонеального введения антитела, контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает средний объем опухоли в каждой группе, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, "\*" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,05) от контрольной группы введения антитела; "\*\*" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от контрольной группы введения антитела, "†" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,05) от группы введения носителя, и "§" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от группы перитонеального введения антитела.

[Фиг. 11]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с опухолями (клетки НСТ-116) в группе введения радиоконъюгата (Пример 6) с высокой радиоактивностью, группе введения радиоконъюгата (Пример низкой радиоактивностью, группе перитонеального введения антитела, контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает средний объем опухоли в каждой группе, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, "\*\*" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от контрольной группы введения антитела, "‡" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от группы введения носителя, "§" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от группы перитонеального введения антитела, и "ІІ" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (р<0,05) от группы введения радиоконъюгата (Пример 6) с высокой радиоактивностью.

[Фиг. 12]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с опухолями (клетки SW48) в группе введения радиоконъюгата (Пример 6) с высокой радиоактивностью, группе введения радиоконъюгата (Пример низкой радиоактивностью, группе перитонеального введения антитела, контрольной группе введения антитела и группе введения носителя. Вертикальная ось указывает средний объем опухоли в каждой группе, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, "\*\*" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от контрольной группы введения антитела, и "‡" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от группы введения носителя.

[Фиг. 13]

График, показывающий изменения объема опухоли с течением времени у мышей с

опухолями COLO205 в группе введения радиоконъюгата (Пример 6), группе введения оксалиплатина и группе введения носителя.

[Фиг. 14]

Графики, показывающие результаты измерения маркеров гепатотоксичности (верхний график и средний график) и почечной токсичности (нижний график) в последний день наблюдения у мышей с опухолями COLO205 в группе введения радиоконьюгата (Пример 6), группе введения оксалиплатина и группе введения носителя.

[Фиг. 15]

Диаграмма, показывающая репрезентативные ПЭТ-изображения (МІР-изображение) у мышей с клетками опухоли COLO205, которым вводили радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 2.

[Описание вариантов осуществления]

[0017]

#### (1) Радиоконъюгат

Настоящее изобретение направлено на конъюгат анти-EGFR антитела, сайтспецифически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и линкер (L) не содержит тиомочевинную связь (далее также называемый "радиоконъюгат по настоящему изобретению").

[0018]

#### (1-1) Радионуклид металла

Радионуклид металла, содержащийся в радиоконъюгате по настоящему изобретению, представляет собой испускающий α-излучение радионуклид, испускающий β-излучение радионуклид, позитрон-испускающий радионуклид или испускающий γ-излучение радионуклид. Когда радиоконъюгат по настоящему изобретению используют для терапии рака, предпочтительно использовать испускающий α-излучение радионуклид или испускающий β-излучение радионуклид. Когда радиоконъюгат по настоящему изобретению используют для диагностики или обнаружения рака, предпочтительно использовать позитрон-испускающий радионуклид или испускающий γ-излучение радионуклид. Примеры испускающего α-излучение радионуклида включают Ві-212, Ві-213, Ас-225 и Тh-227. Примеры испускающего β-излучение радионуклида включают Сu-64, Y-90 и Lu-177. Примеры позитрон-испускающего радионуклида включают Сu-64, Ga-68, Y-86 и Zr-89. Примеры испускающего γ-излучение радионуклида включают Тс-99m и In-111. Радионуклид металла, который должен содержаться в радиоконъюгате по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой Ga-68, Zr-89, Y-90, In-111, Lu-177 или Ac-225, еще более предпочтительно Zr-89, Y-90, Lu-177 или Ac-225.

[0019]

#### (1-2) Антитело

Антитело, которое должно содержаться в радиоконъюгате по настоящему изобретению, представляет собой иммуноглобулин, который специфически связывается с

EGFR (далее также указано как "антитело, используемое в настоящем изобретении"). настоящем изобретении, Антитело, используемое в может представлять собой поликлональное моноклональное предпочтительно антитело или антитело, моноклональное антитело. Происхождение антитела конкретно не ограничено, и примеры включают антитела животных, отличных от человека, млекопитающих, отличных от человека, и человека, предпочтительны антитела человека, крысы, мыши и кролика. Когда антитело происходит от вида, отличного от человека, его предпочтительно химеризируют или гуманизируют с использованием хорошо известных методов. Антитело, используемое изобретении, настоящем может представлять собой химерное антитело, гуманизированное антитело или человеческое антитело. Антитело, используемое в настоящем изобретении, может представлять собой биспецифическое антитело. Антитело, используемое в настоящем изобретении, например, представляет собой IgG, например IgG1, IgG2 (например, IgG2a или IgG2b), IgG3 или IgG4.

[0020]

Антитело, используемое в радиоконъюгате по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой цетуксимаб или панитумумаб.

Цетуксимаб представляет собой химерное человеческое-мышиное моноклональное антитело подкласса  $IgG_1$ , которое специфически распознает EGFR, и известно, что ингибирование активации и димеризации EGFR оказывает подавляющее рост опухоли действие на колоректальный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак желудка и т.п.

Химическое (номенклатура) цетуксимаба представляет собой название гликопротеин, состоящий из двух молекул легкой цепи, состоящих из аминокислотных остатков ( $C_{1025}H_{1595}N_{281}O_{338}S_5$ ; молекулярная масса: 23422,64) и двух молекул тяжелой цепи, состоящих из 449 аминокислотных остатков ( $C_{2208}H_{3400}N_{582}O_{674}S_{15}$ ; молекулярная масса: 49363,09), который получают с использованием мышиной гибридомной клеточной линией SP2/0-Ag14 путем введения кДНК, кодирующей химерное человеческое/мышиное моноклональное антитело, состоящее из вариабельной области моноклонального антитела мыши против рецептора эпидермального фактора роста человека и константной области IgG<sub>1</sub> человека.

В настоящем описании цетуксимаб представляет собой антитело, описанное в JP-A-2005-047934, и в частности гуманизированное антитело, содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 1):

[0021]

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS 60
RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0022]

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2):

[0023]

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYN 60

TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTALYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAA 120

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG 180

LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP 240

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS 300

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM 360

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ 420

QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0024]

Цетуксимаб используется клинически в качестве противоопухолевого средства, показанного при неоперабельном распространенном/рецидивирующем колоректальном раке и раке головы и шеи с геном RAS дикого типа, и доступен под торговой маркой Эрбитукс (зарегистрированная торговая марка).

[0025]

Панитумумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG2, специфически распознающее EGFR. Его химическое название (номенклатура) представляет собой гликопротеин (молекулярная масса: около 147000), состоящий из двух молекул легкой цепи, состоящих из 214 аминокислотных остатков ( $C_{1028}H_{1588}N_{274}O_{336}S_6$ ; молекулярная масса: 23353,63) и двух молекул тяжелой цепи, состоящих из 445 аминокислотных остатков ( $C_{2171}H_{3355}N_{573}O_{672}S_{18}$ ; молекулярная масса: 48811,47), который получают с использованием клеток яичника китайского хомячка, в которые введена геномная ДНК, кодирующая IgG2, который представляет собой моноклональное антитело человека против EGFR человека, в котором в основном компоненте субъединицы тяжелой

цепи отсутствует С-концевой лизин.

Аминокислотная последовательность панитумумаба показана следующим образом в обзорном отчете Агентства по фармацевтике и медицинскому оборудованию для внутривенных инъекций Вектибикс 100 мг "Takeda Bio".

```
легкая цепь (SEQ ID NO: 3):

[0026]

Asp. IIe — Gin — Met — Thr — Gin — Ser — Pro — Ser — Ser — Leu — Ser — Ala — Ser — Val — Giy — Asp. Arg — Val — Thr—
IIIe — Thr — Cys — Gin — Ala — Ser — Gin — Asp. IIIe — Ser — Asn — Tyr — Leu — Asn — Trp — Tyr — Gin — Gin — Lys — Pro —

Giy — Lys — Ala — Pro — Lys — Leu — Lieu — IIIe — Tyr — Asp. — Ala — Ser — Asn. — Leu — Giu — Thr — Giy — Val — Pro — Ser —

Arg — Phe — Ser — Giy — Ser — Giy — Ser — Giy — Thr — Asp. — Phe — Thr — Phe — Thr — IIe — Ser — Ser — Leu — Gin — Pro —

Giu — Asp — IIIe — Ala — Thr — Tyr — Phe — Cys — Gin — His — Phe — Asp. — His — Leu — Pro — Leu — Ala — Phe — Giy — Giy —

Giy — Thr — Lys — Val — Giu — IIIe — Lys — Arg — Thr — Val — Ala — Ala — Pro — Ser — Val — Phe — IIIe — Phe — Pro — Pro —

Ser — Asp — Giu — Gin — Leu — Lys — Ser — Giy — Trr — Ala — Ser — Val — Cys — Leu — Leu — Asn — Asn — Phe — Tyr —

Pro — Arg — Giu — Ala — Lys — Val — Gin — Trp — Lys — Val — Asp — Asn — Ala — Leu — Gin — Ser — Giy — Asn — Ser — Gin —

Giu — Ser — Val — Thr — Giu — Gin — Asp — Ser — Lys — Asp — Ser — Thr — Tyr — Ser — Leu — Ser — Ser — Thr — Leu — Thr —

Leu — Ser — Lys — Ala — Asp — Tyr — Giu — Lys — His — Lys — Val — Tyr — Ala — Cys — Giu — Val — Thr — His — Gin — Giy —

[0027]
```

[0027] тяжелая цепь (SEQ ID NO: 4): [0028]

```
Gint - Val - Cin - Ciu - Cin - Ciu - Ser - Ciy - Pro - Ciy - Leu - Val - Lys - Pro - Ser - Ciu - Thr - Leu - Ser - Leu -
Thr - Cys - Thr - Val - Ser - City - City - Ser - Val - Ser - Ser - City - Asp - Tyr - Trp - Trp - Trp - Ite - Arg -
Gin - Ser - Pro - Gly - Lys - Gly - Leu - Glu - Tro - Ite - Gly - His - Ite - Tyr - Tyr - Ser - Gly - Asn - Thr - Asn -
Tyr - Asn - Pro - Ser - Leu - Lys - Ser - Arg - Leu - Thr - He - Ser - He - Asp - Thr - Ser - Lys - Thr - Gin - Phe-
Ser - Leu - Lys - Leu - Ser - Ser - Val - Thr - Ala - Ala - Asp - Thr - Ala - Ile - Tyr - Tyr - Cys - Val - Arg - Asp -
Arg - Val - Thr - Gly - Ala - Phe - Asp - Ile - Trp - Sly - Gln - Gly - Thr - Met - Val - Thr - Val - Ser - Ser - Ala -
Ser - Thr - Lys - Gly - Pro - Ser - Val - Phie - Pro - Leu - Ala - Pro - Cys - Ser - Arg - Ser - Thr - Ser - Glu - Ser -
Thr - Ala - Ala - Leu - Gly - Cys - Leu - Val - Lys - Asp - Tyr - Phe - Pro - Gu - Pro - Val - Thr - Val - Ser - Trp -
Asn - Ser - Gly - Ala - Leu - Thr - Ser - Gly - Val - His - Thr - Phe - Pro - Ala - Val - Leu - Gln - Ser - Ser - Gly -
Leu - Tyr - Ser - Leu - Ser - Ser - Val - Val - Thr - Val - Pro - Ser - Ser - Asn - Phe - Gly - Thr - Gh - Thr - Tyr-
Thr - Cys - Asn - Val - Asp - His - Lys - Pro - Ser - Asn - Thr - Lys - Val - Asp - Lys - Thr - Val - Glu - Arg - Lys -
Cys - Cys - Val - Glu - Cys - Pro - Pro - Cys - Pro - Ala - Pro - Pro - Val - Ala - Gly - Pro - Ser - Val - Phe- Leu -
Phe- Pro - Pro - Lys - Pro - Lys - Asp - Thr - Leu - Met - He - Ser - Arg - Thr - Pro - Glu - Val - Thr - Cys - Val -
Val - Val - Asp - Val - Ser - His - Glu - Asp - Pro - Glu - Val - Gln - Phe - Asn - Trp - Tyr + Val - Asp - Gly - Val -
Giu - Val - His - Asn - Ala - Lys - Thr - Lys - Pro - Arg - Giu - Giu - Gin - Phe - Asn - Ser - Thr - Phe - Arg - Val -
Val - Ser - Val - Leu - Thr - Val - Val - His - Gin - Asp - Trp - Leu - Asn - Gly - Lys - Glu - Tyr - Lys - Cys - Lys -
Val - Ser - Asn - Lys - Gty - Leu - Pro - Ala - Pro - Ile - Gtu - Lys - Thr - Ile - Ser - Lys - Thr - Lys - Gty - Gth -
Pro - Arg - Glu - Pro - Gln - Val - Tyr - Thr - Leu - Pro - Pro - Ser - Arg - Glu - Glu - Met - Thr - Lys - Asri - Gln -
Val - Ser - Lieu - Thr - Cys - Lieu - Val - Lys - Gly - Phe - Tyr - Pro - Ser - Asp - Ile - Ala - Val - Glu - Trp - Glu -
Ser - Ash - Gly - Gln - Pro - Glu - Ash - Ash - Tyr - Lys - Thr - Thr - Pro - Pro - Leu - Ash - Ser - Ash - Gly -
Ser - Phe - Phe - Leu - Tyr - Ser - Lys - Leu - Thr - Val - Asp - Lys - Ser - Arg - Trp - Gin - Gin - Giy - Asn - Val -
Phe - Ser - Cys - Ser - Val - Met - His - Glu - Ala - Leu - His - Asn - His - Tyr - Thr - Gin - Lys - Ser - Leu - Ser -
Leu - Ser - Pro - Gly - Lys**
```

[0029]

Внутримолекулярные дисульфидные связи показаны сплошными линиями. Межмолекулярные дисульфидные связи образуются между Cys222 остатком тяжелой цепи и Cys214 остатком легкой цепи, между Cys225 остатками тяжелых цепей и между Cys228 остатками тяжелых цепей.

Подчеркнутый Asn (<u>Asn</u>) представляет собой положение связывания сахарной цепи, а Gln, отмеченный звездочкой (Gln\*), частично циклизован до пироглутаминовой кислоты. Lys, отмеченный двумя звездочками (Lys\*\*), практически полностью отсутствует.

Структура сахарной цепи показана ниже. [0030]

[0031]

Fuc представляет собой L-фукозу, (Gal)0-2 представляет собой 0, 1 или 2 молекулы

D-галактозы, GlucNac представляет собой D-N-ацетилглюкозамин, и Man представляет собой D-маннозу.

Панитумумаб используется клинически в качестве противоопухолевого средства, показанного при неоперабельном распространенном/рецидивирующем колоректальном раке с геном KRAS дикого типа, и доступен под торговой маркой Вектибикс (зарегистрированная торговая марка).

[0032]

#### (1-3) Хелатирующий агент

В настоящем изобретении хелатирующий агент конкретно не ограничивается при условии, что он имеет сайт в своей структуре, где координируется радионуклид металла. Примеры хелатирующего CB-TE2A агента включают (1.4.8.11тетраазабицикло[6.6.2] гексадекан-4,11-диуксусную кислоту), СДТА (циклогексан-транс-1,2-диамин тетрауксусную кислоту), СРТРА (4-циано-4-[[(додецилтио)тиоксометил]тио]кислоту), DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную пентановую кислоту), DOTMA ((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha''$ ,-тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10тетраазациклододекан), **DOTPA** (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10тетрапропионовую кислоту), 1,4,7,10-тетракис(пиридин-2-илметил)-1,4,7,10- $(L^{py}),$ DOTA-GA (α-(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10тетраазациклододекан тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), DOTP (((1,4,7,10тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраил)тетракис(метилен))тетрафосфоновую кислоту), DOTMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(метиленфосфоновую кислоту)), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10тетракис(ацетамидометиленфосфоновую D<sub>0</sub>2P кислоту), (тетраазациклододекандиметанфосфоновую кислоту), дефероксамин (DFO), **DTPA** (глицин, N,N-бис[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил]-), СНХ-А"-DTPA (2,2'-((2-(((1S,2R)-2-(бис(карбоксиметил)амино)циклогексил)(карбоксиметил)амино)этил) азандиил) диуксусную кислоту), DTPA-BMA (5,8-бис(карбоксиметил)-11-[2-(метиламино)-2-оксоэтил]-3-оксо-2,5,8,11-тетраазатридекан-13-овую кислоту), ЕDTA (2,2',2",2""-(этан-1,2-диилбис(азантриил))тетрауксусную кислоту), NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7триуксусную **NOTP** (1,4,7-триазациклононан-1,4,7кислоту), триилтрис(метиленфосфоновую кислоту)), ТЕТРА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовую кислоту), **TETA** (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-N,N',N",N"-тетрауксусную кислоту), TTHA (3,6,9,12-Тетракис(карбоксиметил)-3,6,9,12тетраазатетрадекандиовую кислоту), **HEHA** (1,2,7,10,13-гексаазациклооктадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусную 1,2-HOPO (N,N',N",N"-тетра(1,2-дигидро-1кислоту), гидрокси-2-оксопиридин-6-карбонил)-1,5,10,14-тетраазатетрадекан), РЕРА (1,4,7,10,13пентаазациклопентадекан-N,N',N",N"",-пентауксусную кислоту), H4octapa (N,N'бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-этилендиамин-N,N'-диуксусную кислоту), H2bispa2 (6,6'-({9-гидрокси-1,5-бис(метоксикарбонил)-2,4-ди(пиридин-2-ил)-3,7диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил}бис(-метилен)) дипиколиновую кислоту), H2dedpa (1,2-[{6-(карбокси)-пиридин-2-ил}-метиламино]этан), H2macropa (6-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-N,N'-метил)пиколиновую кислоту), H5decapa (N,N"-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-диэтилентриамин-N,N',N"-триуксусную кислоту), H6phospa (N,N'-(метиленфосфонат)-N,N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтан), HP-D03A (гидроксипропилтетраазациклододекантриуксусную кислоту) и порфирин. Предпочтительным является соединение, представленное следующей формулой (A).

[0033]

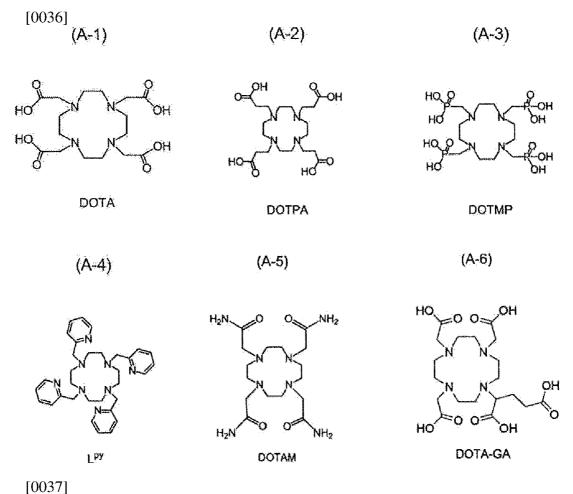
[0034]

В формуле (A) каждый из  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  и  $R_{14}$  независимо представляет собой группу, состоящую из -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CONH<sub>2</sub> или - (CHCOOH)(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>COOH,  $R_{15}$  представляет собой атом водорода, и р представляет собой целое число не менее 0 и не более 3.

[0035]

Соединение, представленное формулой (А), предпочтительно представляет собой соединение, содержащее структуру, полученную из 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTA) или ее производного. В частности, соединение в своей структуре может содержать структуру, полученную из одного хелатирующего агента, выбранного из DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты), DOTMA ((1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha''$ ,-тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты), DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-**DOTPA** (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10тетраазациклододекана), тетрапропионовой кислоты), 1,4,7,10-тетракис(пиридин-2-илметил)-1,4,7,10- $(L^{py}),$ тетраазациклододекана DOTA-GA (α-(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной DOTP кислоты), (((1,4,7,10тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраил)тетракис(метилен))тетрафосфоновой кислоты), DOTMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(метиленфосфоновой кислоты)), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10тетракис(ацетамидометиленфосфоновой D<sub>0</sub>2P кислоты) И (тетраазациклододекандиметанфосфоновой кислоты). Более предпочтительно, можно указать соединения, представленные следующими формулами (А-1)-(А-6). Хелатирующий

агент для использования в радиоконъюгате по настоящему изобретению более предпочтительно представляет собой DOTA-GA (соединение, представленное формулой (A-6)). Хелатирующий агент, используемый в радиоконъюгате по настоящему изобретению, еще более предпочтительно представляет собой DOTA-GA (соединение, представленное формулой (A-6)). Когда используемый хелатирующий агент представляет собой DOTA-GA, указанный выше хелатирующий агент может быть стереоизомером (S-форма, R-форма) или рацематом. Стереоизомеры S-формы и R-формы могут быть смешаны в любом соотношении.



Хелатирующий агент, используемый в настоящем изобретении, связан с пептидом через линкер (L). В радиоконъюгате по настоящему изобретению хелатирующий агент и линкер (L) предпочтительно соединены ковалентной связью. Следовательно, в радиоконъюгате по настоящему изобретению некоторые группы в соединении указанного выше хелатирующего агента могут быть замещены группами, которые образуют ковалентные связи с линкером (L). Например, когда хелатирующий агент, используемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение, представленное формулой (A),  $R_{12}$  или  $R_{15}$  могут быть замещены группой, которая образует ковалентную связь с линкером (L). Предпочтительно, когда  $R_{12}$  замещен группой, которая образует ковалентную связь с линкером (L),  $R_{15}$  представляет собой атом водорода, когда  $R_{12}$  представляет собой группу, состоящую из -(CH<sub>2</sub>)<sub>р</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>р</sub>C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, -(CH<sub>2</sub>)<sub>р</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -

 $(CH_2)_pCONH_2$  или - $(CHCOOH)(CH_2)_pCOOH$ ,  $R_{15}$  замещен группой, которая образует ковалентную связь с линкером (L).

[0038]

Ковалентная связь между хелатирующим агентом и линкером (L) только не должна включать тиомочевинную связь, и она может быть представлена углерод-углеродной связью, амидной связью, эфирной связью, сложноэфирной связью и т.п.

[0039]

Соединение между хелатирующим агентом и линкером (L) может быть образовано, например, взаимодействием группы N-гидроксисукцинимидного сложного эфира (NHS) следующей формулы (A-7) или (A-8) или 2,6-диоксотетрагидро-2H-пиранильной группы следующей формулы (A-9) с первичным амином линкера (L).

[0040]

[0041]

#### (1-4) Модифицирующий антитело пептид

В настоящем изобретении пептид конкретно не ограничивается при условии, что он сайт-специфически модифицирует антитело, предпочтительно сайт-специфически модифицирует Fc-область, более предпочтительно сайт-специфически модифицирует лизиновый остаток в Fc-области антитела. В результате можно поддерживать активность самого антитела (действие по распознаванию антигена, нейтрализующее действие, действие по активации комплемента и/или опсонизирующее действие).

[0042]

Пептид для использования в настоящем изобретении может представлять собой цепочечный пептид или циклический пептид, причем циклический пептид является предпочтительным. Более предпочтительно, он содержит аминокислотную последовательность, состоящую из не менее 13 и не более 17 аминокислотных остатков, представленную следующей формулой (i) (далее также указан как "модифицирующий антитело пептид"), и модифицирован сшивающим агентом. В пояснении для формулы (i) левая сторона показанной на листе аминокислотной последовательности представляет собой N-концевую сторону, а правая сторона показанной на листе аминокислотной последовательности представляет собой С-концевую сторону.

[0043]

(Xa)-Xaa1-(Xb)-Xaa2-(Xc)-Xaa3-(Xd)···(i)

В формуле (i) каждый Xа, Xb, Xc и Xd представляет собой последовательные X в количестве X в ко

X представляет собой аминокислотный остаток, не имеющий ни тиоловой группы, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

а, b, c и d каждый независимо представляет собой целое число не менее 1 и не более 5, и удовлетворяют условию a+b+c+d≤14,

Хаа1 и Хаа3 каждый независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу в боковой цепи, или аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, где либо Хаа1, либо Хаа3 представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу, предпочтительно Хаа1 и Хаа3 связаны с образованием кольцевой структуры, и

Хаа2 представляет собой лизиновый остаток, аргининовый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, предпочтительно лизиновый остаток, и Хаа2 модифицирован сшивающим агентом.

[0044]

Примеры аминокислотного остатка, который может содержаться в X в указанной выше формуле (i), включают аминокислотные остатки, полученные из аминокислот, таких как глицин, аланин, фенилаланин, пролин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, серин, треонин, тирозин, метионин и т.п., и X может представлять собой аминокислотный остаток, состоящий из аминокислот одного и того же типа или аминокислот разных типов.

[0045]

В формуле (i) a, b, c и d конкретно не ограничиваются при условии, что они представляют собой числа в пределах указанного выше диапазона. С точки зрения стабильности связывания между пептидом и анти-EGFR антителом должно удовлетворяться условие  $a+b+c+d \le 14$ , и a предпочтительно представляет собой целое число не менее 1 и не более 3, b предпочтительно представляет собой целое число не менее 3 и не более 5, и d предпочтительно представляет собой целое число не менее 3 и не

[0046]

По меньшей мере один из Xaa1 и Xaa3 представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу в боковой цепи, и Xaa1 и Xaa3 могут быть одинаковыми или отличными друг от друга. Примеры аминокислот, имеющих тиоловую группу в боковой цепи, включают цистеин и гомоцистеин. Такие аминокислотные остатки предпочтительно связаны дисульфидной

связью, или с ними предпочтительно связана сульфидная группа посредством структуры, показанной следующей формулой (4). В формуле (4) волнистой линией обозначена связывающаяся часть с сульфидной группой.

[0047]

[0048]

Вместо указанной выше комбинации Xaa1 и Xaa3, один из Xaa1 и Xaa3 может представлять собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу в боковой цепи, а другой может представлять собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи. Они связаны тиоэфирной связью. Концевая часть галогенацетильной группы замещена галогеном, таким как йод или т.п., и галоген удаляют реакцией с тиоловой группой в другой боковой цепи, в результате чего образуется тиоэфирная связь.

[0049]

Конкретные примеры аминокислотной последовательности модифицирующего антитело пептида, представленного формулой (i), включают пептиды, описанные в WO 2016/186206, WO 2017/217347 и WO 2018/230257, и их также можно использовать.

Предпочтительно, модифицирующий антитело пептид, используемый в настоящем изобретении, представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из 13-17 аминокислотных остатков, представленную следующей формулой (i)'.

В формуле (i)' каждый X независимо представляет собой любой аминокислотный остаток, отличный от цистеина,

С представляет собой цистеиновый остаток,

Н представляет собой гистидиновый остаток,

Xaa1' представляет собой лизиновый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту,

G представляет собой глициновый остаток,

Хаа2' представляет собой остаток глутаминовой кислоты или аспарагиновый остаток,

L представляет собой лейциновый остаток,

V представляет собой валиновый остаток,

W представляет собой триптофановый остаток,

Xаа3' представляет собой аланиновый остаток, сериновый остаток или треониновый остаток, и

Хаа4' представляет собой тирозиновый остаток или триптофановый остаток.

В указанной выше формуле (i)' N-концевой или С-концевой  $X_{1-3}$  означает, что любые 1-3 аминокислотных остатка X, отличных от цистеина (C или Cys), являются независимо последовательными, и представляет собой последовательность, состоящую из одинаковых или разных аминокислотных остатков, предпочтительно всех трех разных аминокислотных остатков.

[0051]

Среди них аминокислотная последовательность модифицирующего антитело пептида предпочтительно имеет любую из следующих последовательностей (1)-(14), более предпочтительно из следующих последовательностей (1), (2), (13) или (14). В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) (Хаа2) представляет собой лизиновый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту, предпочтительно лизиновый остаток, (Хаа2) предпочтительно модифицирован сшивающим агентом, и каждый (Хаа1) и (Хаа3) представляет собой гомоцистеиновый остаток. В следующих аминокислотных последовательностях (1)-(14) аминокислоты, отличные от (Хаа1), (Хаа2) и (Хаа3), обозначены однобуквенными сокращениями.

[0052]

- (1) DCAYH(Xaa2)GELVWCT (SEQ ID NO: 5)
- (2) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 6)
- (3) RCAYH(Xaa2)GELVWCS (SEQ ID NO: 7)
- (4) GPRCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (SEQ ID NO: 8)
- (5) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 9)
- (6) GDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 10)
- (7) GPSCAYH(Xaa2)GELVWCTFH (SEQ ID NO: 11)
- (8) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCSFH (SEQ ID NO: 12)
- (9) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTHH (SEQ ID NO: 13)
- (10) GPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 14)
- (11) SPDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 15)
- (12) SDDCAYH(Xaa2)GELVWCTFY (SEQ ID NO: 16)
- (13) RGNCAYH(Xaa2)GQLVWCTYH (SEQ ID NO: 17)
- (14) G(Xaa1)DCAYH(Xaa2)GELVWCT(Xaa3)H (SEQ ID NO: 18) [0053]

Пептид, представленный указанной выше формулой (i) или (i)', или пептид, имеющий последовательности (1)-(14), предпочтительно имеет линкер (L), введенный на N-конце, и амидирован на C-конце. Кроме того, Xaa2 (или часть, соответствующая Xaa2) этих пептидов модифицирован сшивающим агентом, который позволяет пептидам ковалентно связываться с Fc-областью анти-EGFR антитела посредством сшивающего агента. В формуле (i)' часть, соответствующая Xaa2, представляет собой Xaa1'.

[0054]

Сшивающий агент может быть соответствующим образом выбран специалистами в

данной области и может представлять собой соединение, имеющее по меньшей мере два сайта, которые могут связываться с желаемыми аминокислотами (например, лизином, цистеином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, 2-аминосубериновой кислотой, диаминопропионовой кислотой, аргинином и т.д.). Его примеры включают, но не ограничиваются этим, сшивающий агент, предпочтительно содержащий две или более DSG сукцинимидильных групп, такой как (дисукцинимидил (дисукцинимидил суберат) и т.п., сшивающий агент, предпочтительно содержащий две или более имидокислотные группы, такой как DMA (диметиладипимидат·2HCl, дигидрохлорид), **DMP** (диметилпимелимидат·2HCl, диметиладипимидат дигидрохлорид), **DMS** (диметилсуберимидат 2HCl, диметилпимелимидат диметилсуберимидат дигидрохлорид) и т.п., и сшивающий агент, содержащий SS связь, **DTBP** (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат·2HCl, такой диметил дитиобиспропионимидат дигидрохлорид) и DSP (дитиобис(сукцинимидилпропионат)) и т..п., и SBAP (сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат). Сшивающий агент, содержащий сукцинимидильную группу, такой как DSS или DSG, реагирует с первичным амином, присутствующим на N-конце. Следовательно, при блокировании N-конца и взаимодействии с DSS или DSG только аминогруппа Xaa2 может быть специфически модифицирована посредством DSS или DSG. Например, линкер (L) может быть предварительно введен на N-конце модифицирующего антитело пептида и с последующим взаимодействием с DSS или DSG. Анти-EGFR антитело сайт-специфически модифицируется пептидом, когда сукцинимидильная группа DSS или DSG реагирует, например, с Lys248 остатком или Lys250 остатком, предпочтительно Lys250 остатком, в соответствии с Eu-нумерацией, в цетуксимабе в качестве анти-EGFR антитела, и, например, Lys244 остатком или Lys246 остатком, предпочтительно Lys246 остатком, в соответствии с Eu-нумерацией, в панитумумабе в качестве анти-EGFR антитела. Эти Lys остатки присутствуют в Fc-области IgG человека, и даже если антитело представляет собой анти-EGFR антитело, отличное от цетуксимаба, специалисты в данной области могут осуществить выравнивание аминокислотной последовательности антитела и идентифицировать соответствующий Lys остаток.

[0055]

(1-5) Линкер (L)

Линкер (L) конкретно не ограничивается при условии, что он может связывать хелатирующий агент и пептид в радиоконъюгате по настоящему изобретению. Линкер (L), используемый в настоящем изобретении, конкретно не ограничивается при условии, что он не содержит тиомочевинную связь. Его примеры включают замещенную или незамещенную алкильную группу, замещенную или незамещенную гетероалкильную группу, группу полиэтиленгликоля (ПЭГ), пептиды, сахарную цепь, дисульфидную группу, амидную группу, их комбинации и т.п.

В настоящем описании линкер (L) представляет собой общий термин для линкеров, используемых для соединения анти-EGFR антитела, модифицированного пептидом, и

хелатирующего агента, и включает линкер для модификации антитела  $(L_1)$  и хелатный линкер  $(L_2)$ . Линкер для модификации антитела  $(L_1)$ , который подробно описан ниже, вводят в N-концевую часть пептида, описанного в (1-4), а хелатный линкер (L2), который подробно описан ниже, вводят в функциональную группу хелатирующего агента, описанного в (1-3).

[0056]

Линкер (L), используемый в настоящем изобретении, может содержать сайт связывания, образованный клик-реакцией, и предпочтительно модифицирующий антитело линкер ( $L_1$ ) и хелатный линкер ( $L_2$ ) связаны клик-реакцией. В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы между сайтом связывания, образованным клик-реакцией, и хелатирующим агентом не содержалась тиомочевинная связь. Другими словами, предпочтительно, чтобы хелатный линкер ( $L_2$ ) не содержал тиомочевинную связь. Как используется в настоящей заявке, сайт связывания, образованный клик-реакцией, предпочтительно представляет собой структуру, содержащую триазольный скелет, представленную следующей формулой (10a) или (10b), или можно рассматривать структуру, содержащую пиридазиновый скелет, представленную следующей формулой (10c). Поскольку формула (10a) и формула (10b) являются изомерами, они могут содержаться в любом соотношении.

[0057]
$$R_{1A}$$

$$R_{1A}$$

$$R_{2A}$$

$$R_{2A}$$

$$R_{3A}$$

$$R_{3A}$$

$$R_{3A}$$

$$R_{4A}$$

$$R_{4A}$$

$$R_{4A}$$

$$R_{4A}$$

$$R_{4A}$$

$$R_{4A}$$

[0058]

В формуле (10a) и формуле (10b)  $R_{1A}$  представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и  $R_{2A}$  представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом. В формуле (10c) один из  $R_{3A}$  и  $R_{4A}$  представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридильную группу, а другой представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и  $R_{5A}$  представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом. В формуле (10a), формуле (10b) и формуле (10c) сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом связан с пептидом через модифицирующий антитело линкер ( $L_1$ ), и сайт связывания с хелатирующим агентом через хелатный линкер ( $L_2$ ).

[0059]

В радиоконъюгате по настоящему изобретению антитело сайт-специфически

модифицировано пептидом, и пептид и хелатирующий агент связаны через линкер (L). Таким образом, одна молекула или две молекулы хелатирующего агента конъюгированы с одной молекулой анти-EGFR антитела.

[0060]

(1-6) Способ получения конъюгата

Способ получения радиоконъюгата по настоящему изобретению включает две стадии, которые представляют собой стадию конъюгации хелатирующего агента и анти-EGFR антитела и стадию образования комплекса, заключающуюся в образовании комплекса радионуклида металла и хелатирующего агента. Стадию конъюгации можно осуществить до стадии образования комплекса или после стадии образования комплекса.

[0061]

На стадии конъюгации Fc-область антитела сайт-специфически модифицируют хелатирующим агентом или линкером (L), имеющим модифицирующий антитело пептид, показанный в указанной выше формуле (i).

[0062]

На стадии образования комплекса хелатирующий агент хелатируют с радионуклидом металла (образование комплекса). Используемый на этой стадии радионуклид металла предпочтительно используют таким образом, чтобы обеспечить возможность ионизации, более предпочтительно в форме иона, с точки зрения повышения эффективности образования комплекса. На стадии комплексообразования порядок добавления радионуклида металла к хелатирующему агенту не имеет значения при условии, что может быть образован комплекс с радионуклидом металла. Например, в качестве радионуклида можно использовать раствор, в котором ионы радиоактивных металлов растворены в растворителе, состоящем в основном из воды.

После образования комплекса полученный комплекс можно очистить, используя фильтрационный фильтр, мембранный фильтр, колонку, заполненную различными наполнителями, хроматографию или т.п.

[0063]

В способе получения радиоконъюгата по настоящему изобретению стадию конъюгации предпочтительно осуществляют после стадии образования комплекса.

В более предпочтительном варианте осуществления на стадии образования комплекса (A) образуется комплекс между радионуклидом металла и хелатирующим агентом, имеющим первую атомную группу, способную к клик-реакции, в качестве заместителя, обеспечивающего образование конъюгата с антителом. Затем на стадии конъюгации (B) с использованием модифицирующего антитело пептида, показанного указанной выше формулой (i), и модифицирующего антитело линкера( $L_1$ ), имеющего вторую атомную группу, способную к клик-реакции, осуществляют клик-реакцию между пептид-модифицированным антителом, в котором Fc-область сайт-специфически модифицирована, и хелатирующим агентом с образовавшимся комплексом, полученным на стадии (A), с получением радиоконъюгата по настоящему изобретению.

Стадии (A) и (B) подробно описаны ниже. [0064]

В качестве комбинации первой атомной группы и второй атомной группы, способной к клик-реакции, подходящую комбинацию выбирают в соответствии с типом клик-реакции. Например, можно указать комбинацию алкина и азида, комбинацию 1,2,4,5-тетразина и алкена и т.п. В этих атомных группах первая атомная группа содержит одну из указанной выше комбинации атомных групп, и вторая атомная группа содержит одну атомную группу, которая отличается от первой атомной группы из указанной выше комбинации атомных групп. Для достижения как стабильности хелатирующего агента и антитела, так и улучшения эффективности их связывания, хелатный линкер ( $L_2$ ) предпочтительно представляет собой алкин, а модифицирующий антитело линкер ( $L_1$ ) предпочтительно представляет собой азид, или хелатный линкер ( $L_2$ ) предпочтительно представляет собой азид, или хелатный линкер ( $L_1$ ) предпочтительно представляет собой алкен. Конкретные примеры клик-реакции с такими комбинациями атомных групп включают реакцию циклоприсоединения Хьюсгена, реакцию Дильса-Альдера с обратными электронными требованиями и т.п.

[0065]

Конкретные примеры комбинации атомных групп, способных к клик-реакции включают, как показано в следующих формулах, комбинацию атомной группы, содержащей дибензилциклооктин (DBCO) в качестве алкина первой атомной группы (формула (1a)), и атомной группы, содержащей азидную группу в качестве азида второй атомной группы (формула (2a)), или же комбинацию атомной группы, содержащей 1,2,4,5-тетразин в качестве первой атомной группы (формула (1b)), и атомной группы, содержащей транс-циклооктен (TCO) в качестве алкена второй атомной группы (формула (2b)). Предпочтительной является комбинация формулы (1a) и формулы (2a).

[0066]

$$(1a)$$
  $(2a)$   $0 N N R_2$  азид

[0067]

В формуле (1a)  $R_1$  представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и в формуле (2a)  $R_2$  представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептилом.

[0068]

1,2,4,5-тетразин

[0069]

В формуле (1b) один из  $R_3$  и  $R_4$  представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом или модифицирующим антитело пептидом, а другой представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридильную группу. Когда атомная группа в формуле (2b) связана с хелатирующим агентом,  $R_5$  представляет собой сайт связывания с модифицирующим антитело пептидом, и когда атомная группа в формуле (2b) связана с модифицирующим антитело пептидом,  $R_5$  представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом.

[0070]

Когда используют атомную группу, содержащую дибензилциклооктин (DBCO), представленный указанной выше формулой (1а) в качестве алкина первой атомной группы, можно указать различные коммерчески доступные DBCO реагенты. В частности, быть выбраны DBCO-C6-Кислота, Дибензилциклооктин-Амин, например, МОГУТ Дибензилциклооктин Малеимид, DBCO-PEG кислота, DBCO-PEG-Спирт, DBCO-PEGамин, DBCO-PEG-NH-Boc, Карбоксиродамин-PEG-DBCO, Сульфородамин-PEG-DBCO, TAMRA-PEG-DBCO, DBCO-PEG-Биотин, DBCO-PEG-DBCO, DBCO-PEG-Малеимид, TCO-PEG-DBCO. DBCO-mPEG предпочтительно т.п., использовать Дибензилциклооктин Малеимид.

[0071]

На стадии образования комплекса (A) более предпочтительно использовать соединение, имеющее структуру, представленную следующей формулой (ii).

В формуле (ii) А представляет собой указанный выше хелатирующий агент, и общий термин В и С представляет собой хелатный линкер ( $L_2$ )

[0072]

В формуле (ii) В представлен следующей формулой (iib). [0073]

(iib) 
$$*-L_a \left(O \right)_t L_b = **$$

[0074]

В формуле (iib) La и Lb, каждый независимо, представляет собой связующий линкер, содержащий по меньшей мере амидную связь и не менее 1 и не более 50 атомов углерода, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, s имеет значение 0 или 1, \* представляет собой сайт связывания с A и \*\* представляет собой сайт связывания с C.

[0075]

В формуле (ii) С представляет собой либо производное алкина, представленное следующей формулой (iic), либо производное тетразина, представленное формулой (iid).

[0076]

$$(iic) \begin{vmatrix} R_{f} & R_{g} & ** * \\ X & & \\ Y & & \\ R_{h} & R_{i} & & \\ R_{i} & &$$

[0077]

В формуле (iic) X представляет собой CHRk—\*\* или N-\*\*, Y представляет собой CHRk или C=O, Rk независимо представляет собой атом водорода или алкильную группу, имеющую не менее 1 и не более 5 атомов углерода, когда X представляет собой CHRk—\*\* и Y представляет собой CHRk, тогда фрагменты Rk могут быть объединены с образованием циклоалкильной группы, Rf, Rg, Rh и Ri каждый независимо представляет собой атом водорода, атом галогена или алкильную группу, имеющую не менее 1 и не более 5 атомов углерода, Rf и Rg могут быть объединены, или Rh и Ri могут быть объединены с образованием углеводородного кольца, \*\* представляет собой сайт связывания с B, в формуле (iid) \*\* представляет собой сайт связывания с B, и Rj представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридильную группу.

[0078]

В качестве хелатирующего агента, используемого на стадии (A), более предпочтительным является производное DOTA указанной выше формулы (A), где  $R_{11}$  -  $R_{14}$  представляют собой - $(CH_2)_pCOOH$ , р имеет значение 1,  $R_{15}$  представляет собой сайт связывания с B; или производное DO3A или производное DOTAGA, где  $R_{11}$  -  $R_{14}$  представляют собой - $(CH_2)_pCOOH$ , р имеет значение 1,  $R_{12}$  представляет собой сайт связывания (\*) с B и  $R_{15}$  представляет собой атом водорода.

[0079]

В формуле (ii) предпочтительным является DO3A-PEGt-DBCO, где А представляет собой указанный выше DO3A, в В La представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, s имеет значение 0 или 1, когда s имеет значение 1, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не

менее 1 и не более 50 атомов углерода, и С представляет собой производное алкина, представленное формулой (iic), где в формуле (iic) Х представляет собой N—\*\*, У представляет собой CHRk, Rk представляет собой атом водорода, Rf и Rg объединены с образованием бензольного кольца, Rh и Ri объединены с образованием бензольного кольца и \*\* представляет собой сайт связывания с В.

[0080]

В формуле (ii) предпочтительным является производное DOTAGA-PEGt-DBCO, где А представляет собой указанное выше производное DOTAGA, в В La представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, в имеет значение 0 или 1, когда в имеет значение 1, t представляет собой целое число не менее 0 и не более 30, Lb представляет собой связующий линкер, содержащий амидную связь и имеющий не менее 1 и не более 50 атомов углерода, и С представляет собой производное алкина, представленное формулой (iic), где в формуле (iic) X представляет собой N—\*\*, Y представляет собой CHRk, Rk представляет собой атом водорода, Rf и Rg объединены с образованием бензольного кольца и \*\* представляет собой сайт связывания с В. Более предпочтительным является следующий DOTAGA-DBCO.

[0081]

DOTAGA-DBCO

[0082]

В молярном соотношении хелатирующего агента и радионуклида металла, в виде хелатного центра/радионуклида металла, нижний предел составляет предпочтительно не менее 10/1, более предпочтительно не менее 100/1, еще более предпочтительно не менее 500/1, и верхний предел составляет предпочтительно не более 10000/1, более предпочтительно не более 8000/1, еще более предпочтительно не более 7000/1. Например, предпочтительным является диапазон не менее 100/1 и не более 7000/1, и более предпочтительным является не менее 500/1 и не более 7000/1.

[0083]

Реакцию комплексообразования предпочтительно осуществляют в растворителе. В качестве растворителя можно использовать воду, физиологический раствор, буферы, такие как натрий-ацетатный буфер, ацетатно-аммонийный буфер, фосфатный буфер, физиологический раствор с фосфатным буфером, трис гидроксиметиламинометановый

буфер (Трис-буфер), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES буфер), тетраметиламмонийно-ацетатный буфер и т.п.

[0084]

Хотя количество растворителя конкретно не ограничивается, с точки зрения практичности на стадии получения нижний предел в начале стадии (A) составляет не менее 0,01 мл, предпочтительно не менее 0,1 мл, более предпочтительно не менее 1,0 мл, еще более предпочтительно не менее 100 мл, а верхний предел составляет предпочтительно не более 1000 мл, более предпочтительно не более 100 мл, еще более предпочтительно не более 100 мл, еще более предпочтительно не более 1,0 мл. Например, оно находится в диапазоне не менее 0,01 мл и не более 100 мл.

[0085]

Что касается концентрации хелатирующего агента в реакционной смеси реакции комплексообразования, то с точки зрения выхода желаемого хелатирующего агента нижний предел в начале стадии (А) составляет, каждый независимо, предпочтительно не менее 0,001 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 0,01 мкмоль/л, еще более предпочтительно не менее 1 мкмоль/л, а верхний предел составляет предпочтительно не более 1000 мкмоль/л, более предпочтительно не более 100 мкмоль/л, еще более предпочтительно не более 10 мкмоль/л. Например, она находится в диапазоне не менее 1 мкмоль/л и не более 100 мкмоль/л.

[0086]

Температура реакции комплексообразования может быть, например, комнатной температурой (25°С), или реакцию можно осуществлять в условиях нагревания. Чтобы одновременно добиться подавления разложения хелатирующего агента и повышения эффективности образования комплекса, нижний предел составляет предпочтительно не менее  $30^{\circ}$ С, еще более предпочтительно не менее  $35^{\circ}$ С, еще более предпочтительно не менее  $37^{\circ}$ С, особенно предпочтительно не менее  $45^{\circ}$ С. Верхний предел составляет предпочтительно не более  $150^{\circ}$ С, более предпочтительно не более  $120^{\circ}$ С, еще более предпочтительно не более  $100^{\circ}$ С, еще более предпочтительным является диапазон не менее  $30^{\circ}$ С и не более  $100^{\circ}$ С, и более предпочтительным является диапазон не менее  $30^{\circ}$ С и не более  $100^{\circ}$ С, и более предпочтительным является диапазон не менее  $35^{\circ}$ С и не более  $90^{\circ}$ С.

[0087]

Антитело, используемое на стадии (В), представляет собой пептид-модифицированное антитело, в котором Fc-область (константная область) анти-EGFR антитела, как подробно описано в представленном выше разделе "(1-2) Антитело", сайт-специфически модифицирована с использованием модифицирующего антитело пептида, показанного в указанной выше формуле (i), и модифицирующего антитело линкера( $L_2$ ), имеющего вторую атомную группу, способную к клик-реакции.

[0088]

Модифицирующий антитело пептид можно получить с использованием комбинации аминокислот независимо от того, являются ли они природными аминокислотами или неприродными аминокислотами, путем применения таких способов пептидного синтеза, как способ жидкофазного синтеза, способ твердофазного синтеза, способ автоматического синтеза пептидов, метод рекомбинации генов, метод фагового дисплея и т.п. При синтезе пептида, где это необходимо, функциональные группы используемых аминокислот могут быть защищены. Эти способы можно осуществить согласно способу, описанному, например, в WO 2017/217347 и WO 2018/230257.

[0089]

Модифицирующий антитело линкер ( $L_2$ ) может быть линкером, в котором связаны модифицирующий антитело пептид и линкер ( $L_2$ ), представленный следующей формулой (S1).

\*-
$$((L_i)_m$$
- $Z)_k$ - $L_{ii}$ - $AG2$ ···(S1)

где \* представляет собой сайт связывания с N-концом или С-концом пептида,

L<sub>i</sub> представляет собой линкерную группу полиэтиленгликоля (ПЭГ),

т представляет собой целое число не менее 1 и не более 50,

Z представляет собой вторую линкерную группу, которая связывает ( $L_i$ )<sub>m</sub> и  $L_{ii}$ ,

k имеет значение 0 или 1,

 $L_{ii}$  представляет собой вторую линкерную группу ПЭГ, и

AG2 представляет собой вторую атомную группу.

[0090]

В указанной выше формуле (S1) структура Z конкретно не ограничивается при условии, что она представляет собой линкерную структуру, которая связывает ( $L_i$ )<sub>т</sub> и  $L_{ii}$  друг с другом, и включает, например, аминокислотную последовательность, состоящую из не менее 1 и не более 5 аминокислотных остатков. В этом случае аминокислотная последовательность, содержащаяся в Z, предпочтительно содержит цистеиновый остаток и более предпочтительно связана с L2 через тиоэфирную группу, образованную связью между тиоловой группой цистеинового остатка и малеимидной группой.

[0091]

В настоящем изобретении полиэтиленгликолевая линкерная группа (ПЭГ), составляющая  $L_{ii}$ , предпочтительно имеет структуру, показанную следующей формулой (Р2). В формуле (Р2) п представляет собой целое число, предпочтительно не менее 1 и не более 50, более предпочтительно не менее 1 и не более 20, еще более предпочтительно не менее 2 и не более 6.

[0092]

[0093]

Один конец структуры линкерной группы ПЭГ может быть модифицирован структурой, полученной из коммерчески доступного реагента для пегилирования, или структурой, полученной из реагента, обычно используемого для пегилирования. Их примеры, хотя и не имеют особых ограничений, включают структуры, полученные из дигликолевой кислоты или ее производного, а также малеимида или его производного.

[0094]

В качестве способа введения указанной выше второй атомной группы в модифицирующий антитело линкер ( $L_2$ ) можно указать способ введения, включающий получение модифицирующего антитело пептида, имеющего желаемую аминокислотную последовательность, указанным выше способом, растворение пептида в растворе, содержащем солюбилизирующий агент и восстановитель и, при необходимости, кислоту, добавление к этому раствору раствора атомной группы, содержащей азидную группу или транс-циклооктен (TCO) в качестве второй атомной группы, в органическом растворителе и перемешивание смеси при комнатной температуре.

[0095]

Когда атомную группу, содержащую азидную группу, вводят в качестве второй атомной группы, азидную группу вводят непосредственно на N-конце или С-конце пептида путем использования коммерчески доступного реагента для введения азидной группы в соответствии с обычным способом, или атомная группа, содержащая азидную группу, может быть введена через указанную выше линкерную структуру. Примеры используемого реагента для введения азидной группы включают силилазид, азидфосфат, азид алкиламмония, неорганический азид, сульфонилазид, ПЭГ азид и т.п.

[0096]

Когда атомную группу, содержащую TCO, вводят в качестве второй атомной группы, TCO вводят непосредственно N-конце или C-конце пептида путем использования коммерчески доступного реагента клик-химии, содержащего TCO, в соответствии с обычным способом, или атомная группа, содержащая TCO, может быть введена через указанную выше линкерную структуру.

[0097]

Способ связывания модифицирующего антитело пептида с анти-EGFR антителом с получением модифицированного пептидом антитела можно осуществить, например, путем диспергирования указанного выше модифицирующего антитело пептида, антисшивающего агента и при необходимости антитела, катализатора в соответствующем буфере, согласно описанию WO 2017/217347. В качестве сшивающего агента можно использовать указанные выше агенты. Кроме того, при связывании модифицирующего антитело пептида и анти-EGFR антитела, при необходимости, замену обработку буфера, включая раствора, содержащего анти-EGFR ультрафильтрационным фильтром и т.д., и диспергирование его в буфере можно осуществить один или два раза перед связыванием с модифицирующим антитело пептидом.

[0098]

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата модифицирующего антитело пептида и анти-EGFR антитела, включающему стадию смешивания модифицирующего антитело пептида, модифицированного сшивающим агентом, и анти-EGFR антитела. На этой стадии может происходить реакция перекрестного связывания между модифицирующим антитело пептидом, модифицированным сшивающим агентом, и анти-EGFR антителом. Например, в цетуксимабе реакция перекрестного связывания может происходить сайт-специфически между указанным выше аминокислотным остатком Хаа2 модифицирующего антитело пептида и Lys248 остатком или Lys250 остатком, предпочтительно Lys250 остатком, в соответствии с Eu-нумерацией, в Fc IgG человека. Например, в панитумумабе она может происходить сайт-специфически между указанным выше аминокислотным остатком Хаа2 модифицирующего антитело пептида и Lys244 или Lys246 остатком, предпочтительно Lys246 остатком, в соответствии с Eu-нумерацией, в Fc IgG человека.

[0099]

Условия стадии смешивания конкретно не ограничиваются при условии, что реакция перекрестного связывания происходит между модифицирующим антитело пептидом и анти-EGFR антителом. Например, реакцию можно осуществить путем модифицирующего антитело пептида и анти-EGFR смешивания антитела в соответствующем буфере при комнатной температуре (например, от около 15°C до 30°C). Стадию смешивания можно осуществить путем добавления по мере необходимости соответствующего который способствует количества катализатора, реакции перекрестного связывания.

[0100]

В одном варианте осуществления растворитель, содержащий по меньшей мере воду, добавляют для растворения анти-EGFR антитела. Растворитель, отличный от воды, включает, например, диметилсульфоксид, ацетонитрил, физиологический раствор и буферы, такие как натрий-ацетатный буфер, ацетатно-аммонийный буфер, фосфатный буфер, физиологический раствор с фосфатным буфером, Трис-буфер, НЕРЕЅ буфер, тетраметиламмонийно-ацетатный буфер, гистидиновый буфер и подобные. При использовании буфера рН при 25°С предпочтительно устанавливают на уровне 4,0 или более и 10,0 или менее, более предпочтительно 5,5 или более и 8,5 или менее, с точки зрения стабильности антитела. В начале реакции перекрестного связывания концентрацию антитела предпочтительно устанавливают на 1,0 мкмоль/л или более в качестве нижнего предела, и 1000 мкмоль/л или менее, более предпочтительно 500 мкмоль/л или менее, в качестве верхнего предела.

[0101]

Затем добавляют модифицирующий антитело пептид, модифицированный сшивающим агентом, и, при необходимости, катализатор и смесь диспергируют при  $10^{\circ}$ С или выше и  $30^{\circ}$ С или ниже.

Соотношение компонентов смеси модифицирующего антитело пептида и анти-EGFR антитела на стадии смешивания конкретно не ограничивается. Молярное соотношение модифицирующего антитело пептида к анти-EGFR антителу может быть устанавлено, например, от 1:1 до 20:1, предпочтительно от 2:1 до 20:1 или от 5:1 до 10:1.

[0102]

В предпочтительном варианте осуществления молярное отношение модифицирующего антитело пептида к анти-EGFR антителу на указанной выше стадии смешивания может составлять от 0,5 до 2,2, предпочтительно от 0,8 до 1,8. Таким способом можно эффективно получить антитело, в котором одна молекула модифицирующего антитело пептида связана с одной молекулой анти-EGFR антитела (далее указано как "моновалентное антитело").

[0103]

Время смешивания (время реакции) на стадии смешивания конкретно не ограничивается при условии, что происходит реакция перекрестного связывания между модифицирующим антитело пептидом и анти-EGFR антителом. Например, оно составляет от 1 минуты до 5 часов, предпочтительно от 10 минут до 2 часов.

[0104]

Модифицированное пептидом антитело, полученное посредством вышеуказанных стадий, представляет собой смесь, содержащую антитело, в котором одна молекула модифицирующего антитело пептида связана с одной молекулой анти-EGFR антитела (т.е. моновалентного антитела), и антитело, в котором две молекулы модифицирующего антитело пептида связаны с одной молекулой анти-EGFR антитела (далее указано как "двухвалентное антитело"), в любом соотношении. Ее можно использовать как таковую для последующих стадий, или же немодифицированное антитело, моновалентное антитело и двухвалентное антитело разделяют и очищают методом с использованием фильтрационного фильтра, мембранного фильтра, колонки, заполненной различными наполнителями, различных видов хроматографии и т.п., и только антитело, имеющее какую-либо валентность, может быть подвергнуто последующим стадиям. Если немодифицированное антитело невозможно отделить от антитела, имеющего другую валентность в результате очистки, содержащую их смесь можно подвергнуть последующим стадиям.

Когда немодифицированное антитело, моновалентное антитело и двухвалентное антитело разделяют и очищают, для разделения и очистки можно использовать любой из вышеуказанных способов очистки. Возможно использование колонки с различными наполнителями. Например, можно использовать колонку с наполнителем, где белок, такой как белок А, белок G или указанный выше модифицирующий антитело пептид, связан с носителем. Форма носителя для наполнителя такой колонки включает гель (например, гель для колоночной хроматографии), частицу, шарик, наночастицу, микрочастицу, макрошарик и т.п. Материалы носителя включают магнитное вещество, латекс, агарозу, стекло, целлюлозу, сефарозу, нитроцеллюлозу, полистирол и другие полимерные

материалы. Конкретным примером является колонка IgG-BP, в которой указанный выше модифицирующий антитело пептид связан с гелем в колонке (см. WO 2021/080008).

[0105]

Колонка IgG-BP представляет собой колонку, в которой иммобилизован IgGсвязывающий пептид. Двухвалентное антитело не может связываться с колонкой, поскольку сайты связывания уже заняты IgG-связывающими пептидами, и только моновалентные антитела проявляют сродство к колонке. Используя колонку IgG-BP и используя разницу во взаимодействии с соответствующими модифицирующими антитело пептидами, первая композиция антител, содержащая относительно большие количества немодифицированного антитела и моновалентного антитела, и вторая композиция антител, содержащая относительно большое количество двухвалентного антитела, могут быть соответствующим образом разделены и очищены. В одном предпочтительном варианте осуществления молярное соотношение немодифицированного антитела к моновалентному антителу в первой композиции антител составляет 4-47:53-96, 4-30:70-96, более предпочтительно 4-20:80-96, предпочтительно еще более предпочтительно 4-10:90-96.

[0106]

Первую композицию антител или вторую композицию антител, выделенную и очищенную таким способом, можно использовать как таковую для клик-реакции на последующей стадии (В) или можно использовать для клик-реакции на стадии (В) после регулирования концентрации белка содержащегося пептид-модифицированного антитела.

[0107]

Клик-реакцию на стадии (В) осуществляют между способной к клик-реакции первой атомной группой, которая содержится в хелатирующем агенте, и способной к клик-реакции второй атомной группой, которая содержится в модифицированном пептидом антителе. В результате такой клик-реакции образуется связывающая группа (заместитель, способный к конъюгации с антителом), которая связывает хелатирующий агент и антитело.

[0108]

Когда модифицированное пептидом антитело и комплекс, полученный на стадии (А), способны к клик-реакции, порядок их добавления не имеет значения. Например, один из комплекса и пептид-модифицированного антитела добавляют в реакционный контейнер, содержащий растворитель, а затем добавляют другой для осуществления реакции, или один из хелатирующего агента и антитела диспергируют в растворителе, а другой добавляют к дисперсии для осуществления реакции. Альтернативно, их можно одновременно добавить в реакционный контейнер, содержащий растворитель, для осуществления реакции.

[0109]

В качестве растворителя, используемого для клик-реакции на стадии (В), можно использовать растворитель, содержащий воду. Например, можно использовать воду,

физиологический раствор, буферы, такие как натрий-ацетатный буфер, ацетатно-аммонийный буфер, фосфатный буфер, физиологический раствор с фосфатным буфером, Трис-буфер, НЕРЕЅ буфер, тетраметиламмонийно-ацетатный буфер и т.п. При использовании буфера для одновременного достижения стабильности комплекса и антитела, а также эффективности их связывания рН при 25°С предпочтительно устанавливают на уровне не менее 4,0 и не более 10,0, еще более предпочтительно не менее 5,5 и не более 8,5.

[0110]

Хотя количество реакционной смеси конкретно не ограничивается, с точки зрения практичности на стадии получения нижний предел в начале стадии (В) предпочтительно составляет не менее 0,001 мл, более предпочтительно не менее 0,01 мл, еще более предпочтительно не менее 1 мл, а верхний предел предпочтительно не более 1000 мл, более предпочтительно не более 100 мл, еще более предпочтительно не более 10 мл, еще более предпочтительно не более 1 мл. Например, предпочтительным является диапазон не менее 0,001 мл и не более 1000 мл, и более предпочтительным является диапазон не менее 0,1 мл и не более 10 мл.

[0111]

Что касается концентраций хелатирующего агента и антитела в реакционной смеси, каждая независимо, имеет нижний предел в начале стадии (В) предпочтительно не менее 0,001 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 0,01 мкмоль/л, более предпочтительно не менее 1,0 мкмоль/л, а верхний предел предпочтительно составляет не более 1000 мкмоль/л, более предпочтительно не более 100 мкмоль/л. Например, предпочтительным является диапазон не менее 0,1 мкмоль/л и не более 1000 мкмоль/л, а более предпочтительным является диапазон не менее 1 мкмоль/л и не более 100 мкмоль/л, с точки зрения выхода желаемого коньюгата.

[0112]

Чтобы предотвратить непреднамеренную денатурацию антитела и повысить эффективность реакции, верхний предел температуры реакции в клик-реакции на стадии (В) составляет предпочтительно не более 50°С, более предпочтительно не более 40°С. Нижний предел температуры реакции конкретно не ограничивается при условии, что реакция осуществляется, и предпочтительно составляет не менее 15°С. Время реакции в клик-реакции, при условии, что она соответствует указанной выше температуре реакции, предпочтительно составляет не менее 5 минут, более предпочтительно не менее 10 минут, предпочтительно не более 24 часов, более предпочтительно не более 20 часов. Например, предпочтительным является диапазон не менее 5 минут и не более 24 часов, а более предпочтительным является диапазон не менее 10 минут и не более 20 часов.

[0113]

Полученный конъюгат можно использовать как таковой или очистить при помощи фильтрационного фильтра, мембранного фильтра, колонки, заполненной различными

наполнителями, хроматографии или т.п.

[0114]

В конъюгате, полученном на стадиях (А) и (В), лизиновый остаток в Fc-области анти-EGFR антитела специфически модифицирован хелатирующим агентом. Этот конъюгат включает одну или две молекулы указанного выше хелатирующего агента на одну молекулу антитела. Хелатирующий агент сайт-специфически модифицирует Fcобласть антитела по настоящему изобретению через линкер (L). Линкер (L) состоит из хелатного линкера (L2), который соединяется с хелатирующим агентом, первой атомной группы, которая соединяется с линкером  $(L_2)$ , второй атомной группы, которая может осуществлять клик-реакцию с первой атомной группой, и модифицирующего антитело линкера( $L_1$ ), который соединяется co второй атомной группой (включая модифицирующий антитело пептид, представленный указанной выше формулой (i)). Следовательно, линкер (L) имеет химическую структуру, состоящую из первой атомной группы и второй атомной группы. В качестве такой химической структуры можно рассматривать структуру, содержащую триазольный скелет, представленную указанной выше формулой (10а) или (10b), или структуру, содержащую пиридазиновый скелет, представленную указанной выше формулой (10с). Поскольку формула (10а) и формула (10b) являются изомерами, они могут содержаться в любом соотношении.

[0115]

#### (1-7) Радиофармацевтическое средство (Радиофармацевтическое средство (1))

Радиофармацевтическое средство относится к композиции, которая содержит радиоконъюгат по настоящему изобретению и находится в форме, подходящей для введения субъекту in vivo. Радиофармацевтическое средство может представлять собой, например, радиоконъюгат, полученный способом, показанным выше (1-6), как он есть, или может быть получено путем его очистки и растворения в растворителе, в основном содержащем воду И изотоничном живому организму. этом случае радиофармацевтическое средство предпочтительно находится в форме водного раствора и при необходимости может содержать другие фармацевтически приемлемые компоненты. Эффективное количество радиофармацевтического средства вводят в живой организм перорально или парентерально, например, внутривенно, подкожно, интраперитонеально, внутримышечно и т.п. и используют для лечения рака, диагностики рака, обнаружения поражения или т.п.

В контексте настоящей заявки субъектом введения является человек или животное, такое как мышь, крыса, обезьяна, морская свинка, шимпанзе, овца, коза, собака, кошка, свинья, крупный рогатый скот, лошадь и т.п, но конкретно не ограничивается. Предпочтительно субъектом является человек.

Предпочтительным целевым заболеванием является рак, который сверхэкспрессирует EGFR. Тип рака со сверхэкспрессией EGFR, который подлежит лечению, диагностике или обнаружению в настоящем изобретении, конкретно не ограничивается при условии, что он сверхэкспрессирует EGFR. Примеры включают

колоректальный рак (особенно неоперабельный распространенный/рецидивирующий рак с геном RAS дикого типа) и рак головы и шеи. Рак со сверхэкспрессией EGFR также может представлять собой рак любой стадии и может быть локализованным или метастатическим, первичным или рецидивирующим. В контексте настоящей заявки "сверхэкспрессия" относится к состоянию, при котором, при измерении известным методом тестирования, наблюдается значительная амплификация гена EGFR в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью или значительное усиление экспрессии белка EGFR по сравнению с неопухолевой тканью.

В контексте настоящей заявки "эффективное количество" представляет собой количество, которое может обеспечить полезный диагностический или терапевтический эффект у субъекта, которому осуществляют введение. Эффективное количество для введения субъекту варьируется в зависимости от типа субъекта, массы тела субъекта, лекарственной формы (таблетка, инъекция и т.д.) и способа введения (пероральное введение, парентеральное введение и т.д.), тяжести заболевания (например, рак) и т.п. Врачи и ветеринары могут учитывать эти факторы и определять подходящее эффективное количество.

[0116]

Радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению при хранении при комнатной температуре имеет радиохимическую чистоту определенного уровня или выше на момент истечения периода, который является не менее чем 1- и не более чем 5-кратным периоду полураспада, в расчете на период полураспада радионуклида металла, составляющего радиофармацевтическое средство. Когда указанный выше радионуклид металла представляет собой β-излучающий нуклид (например, Lu-177 или Y-90), радиохимическая чистота конъюгата предпочтительно составляет не менее 90%, более предпочтительно не менее 93%, при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после изготовления. Когда радионуклид металла представляет собой α-излучающий нуклид (например, Ac-225), радиохимическая чистота конъюгата после хранения в течение 14 дней при комнатной температуре с момента завершения изготовления предпочтительно составляет не менее 90%, более предпочтительно не менее более 94%. "Комнатная температура" в настоящем описании предпочтительно относится к "обычной температуре", определенной в Японской Фармакопее, которая составляет, в частности, от 15 до 25°C.

В контексте настоящей заявки радиохимическая чистота относится к проценту пиковой радиоактивности (число отсчетов), соответствующей конъюгату, по отношению к общей радиоактивности (число отсчетов), определенной при анализе образца с использованием коммерчески доступного детектора излучения. Для анализа радиохимической чистоты можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию и тонкослойную хроматографию, предпочтительно использовать тонкослойную хроматографию. Более предпочтительно использование тонкослойной хроматографии в условиях, описанных в приведенных ниже Примерах.

Как описано выше, радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению предпочтительно находится в форме водного раствора. Более предпочтительно оно находится в форме буфера с точки зрения поддержания радиохимической чистоты, как описано выше. В качестве буфера можно использовать любой буфер, используемый в лекарственном средстве на основе антител, содержащем анти-EGFR антитело или ADC анти-EGFR антитела в качестве активного ингредиента. В качестве неограничивающего примера можно использовать цитратный или ацетатный буфер. Цитратный буфер состоит из лимонной кислоты и ее соли, и он может состоять, например, из лимонной кислоты и ее натриевой соли. Ацетатный буфер состоит из уксусной кислоты и ее соли, и он может состоять, например, из уксусной кислоты и ее натриевой соли. Радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению может содержать любую аминокислоту, такую как глицин, и также может содержать солюбилизатор, такой как полисорбат 80.

[0117]

Радиофармацевтическое настоящему изобретению средство ПО онжом использовать для радионуклидной терапии рака путем выбора радионуклидов металлов, оказывающих терапевтический эффект, в частности радионуклида, испускающего α-лучи, или нуклида, испускающего β-лучи (предпочтительно Ac-225, Y-90, Lu-177, более предпочтительно Ас-225). При этой радионуклидной терапии радиофармацевтическое средство по настоящему изобретению вводят внутривенной инъекцией или перорально, чтобы вызвать накопление радиоконъюгата по настоящему изобретению в участке поражения, таком как первичное раковое поражение или метастатическое поражение, и раковые клетки в месте поражения разрушаются под действием радиации, испускаемой радионуклидом металла. Количество, которое необходимо вводить, радиофармацевтического средства по настоящему изобретению соответствующим образом определяется эффективностью активного ингредиента, способом и путем введения, стадией прогрессирования рака, конституцией организма, массой тела и возрастом пациента, и типом и количеством терапевтического препарата, используемого в комбинации для лечения других заболеваний.

[0118]

Кроме того, выбрав в качестве радионуклида металла радионуклид, излучающий позитроны, или радионуклид, излучающий γ-лучи (предпочтительно, Ga-68, Zr-89, In-111, более предпочтительно Zr-89), его можно использовать для диагностики рака или обнаружения поражений. Радиофармацевтическое средство, использующее радионуклид, который излучает позитроны, предпочтительно может использоваться для исследования ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография), а радиофармацевтическое средство, использующее радионуклид, который излучает γ-лучи, может предпочтительно использоваться для исследования SPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография). Это также можно использовать в сочетании с диагностикой рака или обнаружением поражений в указанной выше радионуклидной терапии рака. Радиофармацевтическое средство для диагностики рака по настоящему изобретению

можно использовать для диагностики перед проведением радионуклидной терапии рака или можно использовать для диагностики после проведения радионуклидной терапии рака. Используя радиофармацевтическое средство для диагностики перед проведением радионуклидной терапии рака, выбор лечения можно осуществлять на основе того, радионуклидную терапию следует ЛИ проводить рака c использованием радиофармацевтического средства по настоящему изобретению, содержащего нуклид металла, излучающий α-лучи. При использовании радиофармацевтического средства для диагностики после проведения радионуклидной терапии рака, кроме того, можно оценить, является ли радионуклидная терапия рака с использованием радиофармацевтического средства по настоящему изобретению эффективной, и можно оптимизировать план лечения, включающий увеличение или уменьшение дозы и т.п.

[0119]

(2) Радиофармацевтическое средство (Радиофармацевтическое средство (2))

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-EGFR антитела в качестве активного ингредиента, причем связь между анти-EGFR антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, при хранении при комнатной температуре он имеет радиохимическую чистоту определенного уровня или выше на момент истечения периода, который является не менее чем 1- и не более чем 5-кратным периоду полураспада, в расчете на период полураспада радионуклида металла, составляющего радиофармацевтическое средство. Когда указанный выше радионуклид металла представляет собой β-излучающий нуклид (например, Lu-177 или Y-90), радиохимическая чистота указанного выше конъюгата составляет предпочтительно не менее 90%, более предпочтительно не менее 93% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после изготовления. Кроме того, когда радионуклид металла представляет собой аизлучающий нуклид (например, Ас-225), радиохимическая чистота конъюгата составляет предпочтительно не менее 90%, более предпочтительно не менее 94% при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после изготовления. Комнатная температура соответствует указанной для описанного выше радиофармацевтического средства (1).

Для радиофармацевтического средства (2) также можно использовать следующие способы (a)-(d) для конъюгирования хелатирующего агента и анти-EGFR антитела, в дополнение к методу сайт-специфической модификации с использованием пептида. Поскольку остальная часть такая же, как и в радиофармацевтическом средстве (1), пояснение опускается.

- (а) способ модификации сульфгидрильной (SH) группы, полученной путем частичного восстановления дисульфидной связи (SS-связи) между полипептидными цепями в шарнирном сайте антитела, при помощи хелатирующего агента или линкера (L), содержащего малеимидную группу, реагирующую с группой SH
  - (b) способ модификации цистеина, нововведенного в антитело путем

аминокислотной мутации генно-инженерным методом, с использованием хелатирующего агента или линкера (L), содержащего малеимидную группу

- (c) способ модификации азидной группы азидизированного лизина, нововведенного в антитело путем аминокислотной мутации генно-инженерным методом, с использованием хелатирующего агента или линкера (L), содержащего алкин (например, дибензоциклооктин: DBCO), путем использования клик-реакции
- (d) способ модификации глутамина, введенного в определенное положение антитела, при помощи хелатирующего агента или линкера (L), имеющего боковую цепь лизина, путем использования трансглутаминазы

[0120]

В настоящем изобретении пептид, который сайт-специфически модифицирует анти-EGFR антитело, и хелатирующий агент связаны без использования тиомочевинной связи. Таким образом, можно получить радиоконъюгат и радиофармацевтическое средство, которые стабильны даже при комнатной температуре. Поскольку сайтспецифическая модификация антитела может содержать моновалентное антитело или двухвалентное антитело или оба из них в любой пропорции, в отличие от случайной модификации, можно получить радиоконъюгат и радиофармацевтическое средство стабильного качества. Кроме того, радиоконъюгат по настоящему изобретению сохраняет эффективность, эквивалентную обычной. Следовательно, согласно настоящему изобретению, можно обеспечить конъюгат анти-EGFR антитела и содержащее его при радиофармацевтическое средство более высокого качества сохранении эффективности.

[0121]

Следующие варианты осуществления также охватываются техническим замыслом настоящего изобретения.

- [1] Конъюгат анти-EGFR антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где указанный выше хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, указанный выше пептид и хелатирующий агент связаны при помощи линкера (L), и указанный выше линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.
- [2] Конъюгат варианта осуществления [1], где указанный выше хелатирующий агент представляет собой DOTAGA ( $\alpha$ -(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту).
- [3] Конъюгат варианта осуществления [1] или [2], где указанный выше пептид представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из не менее 13 и не более 17 аминокислотных остатков, и представлен следующей формулой (i):

в формуле (i) Xa, Xb, Xc и Xd представляют собой последовательные X в количестве a, последовательные X в количестве b, последовательные X в количестве c и последовательные X в количестве d, соответственно,

X представляет собой аминокислотный остаток, не имеющий ни тиоловой, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

а, b, c и d каждый независимо представляют собой целое число не менее 1 и не более 5 и удовлетворяют условию a+b+c+d≤14,

Хаа1 и Хаа3 каждый независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу в боковой цепи, или аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, при условии, что один из Хаа1 и Хаа3 представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу в боковой цепи,

Хаа1 и Хаа3 объединены с образованием кольцевой структуры, и

Хаа2 представляет собой лизиновый остаток, аргининовый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту и модифицирован сшивающим агентом.

- [4] Конъюгат по любому из вариантов осуществления [1]-[3], где указанный выше радионуклид металла представляет собой Ac-225, Y-90, Lu-177 или Zr-89.
- [5] Конъюгат по любому из вариантов осуществления [1]-[4], где указанный выше линкер (L) включает формулу (10а), формулу (10b) или формулу (10c):

 $R_{1A}$   $R_{1A}$  R

[0123]

[0122]

В формуле (10a) и формуле (10b)  $R_{1A}$  представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и  $R_{2A}$  представляет собой сайт связывания с указанным выше пептидом. В формуле (10c) один из  $R_{3A}$  и  $R_{4A}$  представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридильную группу, а другой представляет собой сайт связывания с указанным выше хелатирующим агентом, и  $R_{5A}$  представляет собой сайт связывания с указанным выше пептидом.

- [6] Конъюгат варианта осуществления [5], включающий полиэтиленгликолевую группу между сайтом связывания с указанным выше пептидом и указанным выше пептидом.
  - [7] Конъюгат по любому из вариантов осуществления [1]-[6], который

конъюгирован путем клик-реакции анти-EGFR антитела, сайт-специфически модифицированного указанным выше пептидом, имеющим азидную группу, введенную на N-конце, и комплекса радиоактивного металла DOTAGA-DBCO, представленного следующей формулой:

[0124]

#### DOTAGA-DBCO

[0125]

- [8] Конъюгат по любому из вариантов осуществления [1]-[7], где указанное выше анти-EGFR антитело представляет собой цетуксимаб.
- [9] Конъюгат по любому из вариантов осуществления [1]-[7], указанное выше анти-EGFR антитело представляет собой панитумумаб.
- [10] Радиофармацевтическое средство, включающее конъюгат по любому из вариантов осуществления [1]-[9] в качестве активного ингредиента.
- [11] Радиофармацевтическое средство варианта осуществления [10], которое используют в радионуклидной терапии рака.
- [12] Радиофармацевтическое средство варианта осуществления [10], который используют в диагностике рака.
- [13] Радиофармацевтическое средство варианта осуществления [12], который используют в комбинации с радионуклидной терапией рака с использованием радиофармацевтического средства в соответствии с [11].
- [14] Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-EGFR антитела в качестве активного ингредиента, причем связь между анти-EGFR антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней.
- [15] Радиофармацевтическое средство варианта осуществления [14], где указанный выше конъюгат представляет собой любой из [1]-[9].
- [16] Радиофармацевтическое средство варианта осуществления [15], которое используют в радионуклидной терапии рака.
- [17] Радиофармацевтическое средство варианта осуществления [15], которое используют в диагностике рака.
  - [18] Радиофармацевтическое средство варианта осуществления [17], которое

используют в комбинации с радионуклидной терапией рака с использованием радиофармацевтического средства в соответствии с [16].

- [19] Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-EGFR антитела в качестве активного ингредиента, и удовлетворяющее следующему условию (1) или (2), причем связь между анти-EGFR антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь:
- (1) указанный выше радионуклид металла представляет собой  $^{177}$ Lu или  $^{90}$ Y, и указанный выше конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней
- (2) указанный выше радионуклид металла представляет собой <sup>225</sup>Ас, и указанный выше конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней.
- [20] Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-EGFR антитела в качестве активного ингредиента, причем связь между анти-EGFR антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% на момент истечения периода, который является не менее чем 1- и не более чем 5-кратным периоду полураспада, в расчете на период полураспада указанного выше радионуклида металла.

[Пример]

[0126]

Настоящее изобретение описано более подробно ниже при помощи примеров. Однако объем настоящего изобретения не ограничивается примерами. В Таблицах ниже столбец с "-" указывает, что характеристики не определены.

[0127]

[Пример 1] Получение конъюгата с цетуксимабом путем использования <sup>225</sup>Асмеченного DOTAGA-DBCO

#### (1. Стадия модификации антитела)

Пептид, содержащий 17 аминокислотных остатков, представленный следующей формулой (P3) (SEQ ID NO: 19), получали способом, описанным в WO 2017/217347. последовательность была Аминокислотная этого пептида такой последовательность, в которой Xaa2 из SEQ ID NO: (2) представлял собой лизиновый остаток, а концевая аминогруппа боковой цепи лизинового остатка была модифицирована показанной R<sub>1</sub>. Кроме того, два цистеиновых остатка образуют структурой, дисульфидную связь друг с другом, а к N-концу пептида был добавлен этилазид в качестве атомной группы, содержащей азидную группу, которая является второй атомной группой, через линкерную (L<sub>1</sub>) структуру, содержащую дигликолевую кислоту и восемь ПЭГ.

[0128]

$$R_i = \begin{pmatrix} C_i \\ C_j \\ C_$$

[0129]

В формуле (Р3) Gly - глицин, Pro - пролин, Asp - аспарагиновая кислота, Cys - цистеин, Ala - аланин, Tyr - тирозин, His - гистидин, Lys - лизин, Glu - глутаминовая кислота, Leu - лейцин, Val - валин, Trp - триптофан, Thr - треонин и Phe - фенилаланин.

[0130]

Раствор, содержащий цетуксимаб (произведен Merck) подвергали замене буфера с использованием ультрафильтрационного фильтра (Amicon Ultra-15) при добавлении 0,02 моль/л буфера уксусная кислота/ацетат натрия (рН 6,0). Эту процедуру повторяли два раза.

Смесь указанного выше пептида и цетуксимаба после замены буфера в 0,02 моль/л буфере уксусная кислота/ацетат натрия (рН 6,0) подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 30 минут с получением раствора, содержащего модифицированное пептидом антитело. Модифицированное пептидом антитело имеет Fcобласть антитела, сайт-специфически модифицированную указанным выше пептидом.

[0131]

Затем раствор пропускали через колонку IgG-BP с получением первой композиции антител, содержащей относительно большие количества немеченого антитела и моновалентного антитела. Концентрацию моновалентного антитела, содержащегося в выделенной фракции, доводили при помощи 0,01 моль/л цитратного буфера (pH 5,5), содержащего 0,1 моль/л хлорида натрия и 0,1 моль/л глицина, так, чтобы концентрация составляла 15 мг/мл. Полученный раствор, содержащий первую композицию антител, подвергали описанной ниже стадии мечения.

[0132]

#### (2. Стадия образования комплекса)

DOTAGA-DBCO, представленный следующей формулой, получали на основе способа, описанного в Bernhard et al. DOTAGA-Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents Chem. Eur. J. 2012, 18, 7834-7841. Этот хелатирующий агент диспергировали в 0,1 моль/л натрий-ацетатном буфере (рН 6,0) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 1,7 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,01 мл), 0,1 моль/л натрий-ацетатного буфера (рН 6,0, 0,15 мл) и раствора, содержащего ионы <sup>225</sup>Ас (0,2 моль/л водного раствора хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 358 МБк/мл, получен из раствора, произведенного Oak Ridge National Laboratory, количество жидкости 0,01 мл) около 3,6 МБк (рассчитано по затуханию от уровня радиоактивности на дату и время

испытания) в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора  $^{225}$ Ac комплекса. Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент : ион  $^{225}$ Ac=около 2290:1, и температуру нагрева реакционной смеси устанавливали на  $70^{\circ}$ C, а время нагрева устанавливали на 30 мин.

[0133]

#### DOTAGA-DBCO

[0134]

Радиохимическую чистоту (RCP) полученного  $^{225}$ Ac комплекса измеряли следующим способом. Часть раствора комплекса  $^{225}$ Ac выделяли при помощи тонкослойной хроматографии (произведен Agilent, номер модели: SGI0001, элюент: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)) и затем измеряли при помощи радиоанализатора  $\gamma$ -TLC (произведен raytest, MODEL GITA Star). Процент радиоактивности (число отсчетов) пика, обнаруженного вблизи источника, относительно обнаруженной общей радиоактивности (число отсчетов) определяли как RCP (%) комплекса  $^{225}$ Ac. В результате, RCP комплекса  $^{225}$ Ac составляла 91%. Полученный раствор комплекса  $^{225}$ Ac использовали непосредственно на стадии мечения.

[0135]

#### (3. Стадия мечения)

К раствору неочищенного комплекса <sup>225</sup>Ас, полученного на указанной выше стадии (2), добавляли раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученное на указанной выше стадии (1), и клик-реакцию осуществляли при 37°С в течение 120 минут с получением антитела, меченного комплексом <sup>225</sup>Ас. Количество комплекса <sup>225</sup>Ас и количество пептид-модифицированного антитела (моновалентного антитела) составляли 17 нмоль и 20 нмоль, соответственно, и молярное соотношение группы DBCO и азидной группы составляло около 1:1,2. Скорость реакции (%) неочищенного антитела, меченного комплексом <sup>225</sup>Ас, показана в следующей Таблице 1. В данном случае скорость реакции (%) означает RCP <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела относительно скорости мечения (%) на стадии образования комплекса, и скорость мечения (%) означает долю (%) радиоактивности комплекса <sup>225</sup>Ас по отношению к уровню загруженной радиоактивности.

Кроме того, раствор <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела, полученного в результате

реакции при  $37^{\circ}$ С в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (произведен Merck, номер модели: UFC505096). RCP и радиохимический выход (RCY)  $^{225}$ Ас комплекс-меченного антитела после очистки показаны в следующей Таблице 1.

[0136]

Способ измерения RCP и RCY <sup>225</sup>Ac комплекс-меченного антитела был следующим. Тонкослойную хроматографию (производитель Agilent, номер модели: SGI0001, проявителем был смешанный раствор ацетонитрил:0,1 ммоль/л раствор EDTA (объемное соотношение 1:1)) осуществляли с использованием радиоанализатора у-ТLС (производитель raytest, MODEL GITA Star) и процент радиоактивности (число отсчетов) пика, обнаруженного вблизи источника, по отношению к общей обнаруженной радиоактивности (число отсчетов) определяли как RCP (%). Кроме того, процент радиоактивности (уровень радиоактивности, рассчитанный по числу отсчктов, измеренным при помощи у-спектрометра (полупроводниковый детектор Ge: GMX10P4-70 (производитель ORTEC), многоканальный анализатор: M7-000 (производитель SEIKO EG&G), обработка данных: Spectrum Navigator:DS-P300 (производитель SEIKO EG&G) и Gamma Studio:DS-P600 (производитель SEIKO EG&G)), восстановленной после ультрафильтрационной очистки, по отношению к общей радиоактивности (аналогично вышеизложенному, уровень радиоактивности, рассчитанный по числу отсчетов, измеренным при помощи у-спектрометра), добавленной в начале стадии мечения, определяли как RCY (%).

[0137]

Таблица 1

	хелатирующий агент	антитело	молярное соотношение	скорость реакции	после очистки	
	(A)	(B)	(A):(B)	37°C 2-часовая реакция (%)	RCP (%)	RCY (%)
Пример 1	DOTAGA	цетуксимаб	1:1.2	89%	98%	74%

[0138]

[Сравнительный пример 1] Получение конъюгата с цетуксимабом путем использования  $^{225}$ Ас-меченного DOTA-DBCO

Процедуру осуществляли в соответствии с Примером 1, за исключением того, что DOTAGA-DBCO заменяли на следующий DOTA-DBCO. Результаты показаны в Таблице 2.

[0139]

#### DOTA-DBCO

[0140]

Таблица 2

				скорость	по	сле
	хелатирую		молярное	реакции	очи	стки
	щий агент (А)	антитело (В)	соотношение (А):(В)	37°С 2-часовая реакция (%)	RCP (%)	RCY (%)
Сравнительный пример 1	DOTA	цетуксимаб	1:1	66%	99%	62%

[0141]

[Пример 2] Получение конъюгата с цетуксимабом путем использования <sup>89</sup>Zr-меченного DOTAGA-DBCO

#### (1. Стадия образования комплекса)

DOTAGA-DBCO диспергировали в 0,195 моль/л натрий-ацетатном буфере (рН 5,5) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,3 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,0375 мл) и раствора, содержащего ионы <sup>89</sup>Zr (0,1 моль/л водного раствора хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 5,2 ГБк/мл, получен из раствора, произведенного Nihon Medi-Physics Co., Ltd., количество жидкости 0,0375 мл) 195 МБк в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса <sup>89</sup>Zr. Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент: ион <sup>89</sup>Zr=около 85:1, и температуру нагрева реакционной смеси устанавливали на 70°C, а время нагрева устанавливали на 60 мин.

[0142]

RCP полученного комплекса  $^{89}$ Zr измеряли следующим способом. Часть раствора комплекса  $^{89}$ Zr выделяли при помощи тонкослойной хроматографии (производитель Agilent, номер модели: SGI0001, проявляющий растворитель: смешанный раствор ацетонитрил/вода (объемное соотношение 1:1)) и затем измеряли при помощи радиоанализатора  $\gamma$ -TLC (производитель raytest, MODEL GITA Star PS). Процент радиоактивности (число отсчетов) пика, обнаруженного вблизи источника, относительно обнаруженной общей радиоактивности (число отсчетов) определяли как RCP (%)

комплекса <sup>89</sup>Zr. В результате, RCP комплекса <sup>89</sup>Zr составляла 96%. Полученный раствор комплекса <sup>89</sup>Zr использовали как таковой на стадии мечения.

[0143]

#### (2. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса <sup>89</sup>Zr, полученный на указанной выше стадии (1), и раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученный таким же образом как в Примере 1, каждый добавляли без очистки к 0,01 моль/л цитратного буфера (рН 5,5), содержащего 0,1 моль/л хлорида натрия и 0,1 моль/л глицина, и клик-реакцию осуществляли при 37°C в течение 90 минут с получением <sup>89</sup>Zr комплекс-меченного антитела Примера 2. Количество комплекса <sup>89</sup>Zr и количество пептид-модифицированного антитела (моновалентного антитела) составляли 11,3 нмоль и 12 нмоль, соответственно, и молярное соотношение DBCO и азида было около 1:1,1. Скорость реакции (%) неочищенного <sup>89</sup>Zr комплекс-меченного антитела этого Примера показана в следующей Таблице 3. В данном случае скорость реакции (%) означает RCP антитела, меченного комплексом <sup>89</sup>Zr относительно скорости мечения (%) на стадии образования комплекса, и скорость мечения (%) означает количество радиоактивности (%) комплекса <sup>89</sup>Zr по отношению к количеству загруженной радиоактивности.

Кроме того, раствор <sup>89</sup>Zr комплекс-меченного антитела, полученного в результате реакции при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (производитель Merck, номер модели: UFC505096). RCP и RCY <sup>89</sup>Zr комплексмеченного антитела после очистки показаны в следующей Таблице 3.

[0144]

Способ измерения RCP и RCY  $^{89}$ Zr комплекс-меченного антитела был аналогичен способу Примера 1.

[0145]

Таблица 3

	хелатирующий	антитело	молярное	скорость реакции	после с	чистки
	агент	(B)	соотношение (А):(В)	37°С 2-часовая	RCP	RCY
	(A)		(A).(D)	реакция (%)	(%)	(%)
Пример 2	DOTAGA	цетуксимаб	1:1,1	70%	97%	55%

[0146]

[Сравнительный пример 2] Получение конъюгата с цетуксимабом путем использования <sup>89</sup>Zr-меченного DOTA-DBCO

Процедуру осуществляли в соответствии с Примером 2, за исключением того, что DOTAGA-DBCO заменяли на DOTA-DBCO. Результаты показаны в Таблице 4.

[0147]

Таблица 4

	хелатиру	01/21/2010	молярное	скорость реакции	после с	чистки
	ющий антитело агент (B) (A)		соотношение (А):(В)	37°С 2-часовая реакция (%)	RCP (%)	RCY (%)
Сравнительный пример 2	DOTA	цетуксимаб	1:1.1	56%	93%	38%

[0148]

[Пример 3] Получение конъюгата с цетуксимабом путем использования <sup>177</sup>Lu-меченного DOTAGA-DBCO

#### (1. Стадия модификации антитела)

Эту стадию осуществляли способом, аналогичным описанному для стадии модификации антитела в Примере 1.

[0149]

#### (2. Стадия образования комплекса)

РОТАGA-DBCO получали таким же способом, как в Примере 1. Этот хелатирующий агент диспергировали в 0,156 моль/л натрий-ацетатном буфере (рН 5,5) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,45 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,015 мл), 0,156 моль/л натрий-ацетатного буфера (рН 5,5, 0,015 мл), растворяющего 0,225 ммоль/л гентизиновой кислоты, и раствора, содержащего ионы <sup>177</sup>Lu (0,04 моль/л водного раствора хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 3,4 ГБк/мл, получен из раствора, произведенного РОLАТОМ, количество жидкости 0,0375 мл) 127 МБк в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса <sup>177</sup>Lu. Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент : ион <sup>177</sup>Lu=около 38:1, и температуру нагрева реакционной смеси устанавливали на 70°С, а время нагрева устанавливали на 5 мин.

[0150]

RCP полученного комплекса  $^{177}$ Lu измеряли таким же способом, как при измерении RCP радиоконъюгата Примера 1. В результате, RCP комплекса  $^{177}$ Lu составляла 100%. Полученный раствор комплекса  $^{177}$ Lu использовали непосредственно на стадии мечения.

[0151]

#### (3. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса <sup>177</sup>Lu, полученный на указанной выше стадии (2), и раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученное на указанной выше стадии (1), каждый добавляли к 0,01 моль/л цитратного буфера (рН 5,5), содержащего 0,1 моль/л хлорида натрия и 0,1 моль/л глицина, и кликреакцию осуществляли при 37°C в течение 120 минут с получением <sup>177</sup>Lu комплексмеченного антитела. Количество комплекса <sup>177</sup>Lu и количество пептидмодифицированного антитела (моновалентного антитела) составляли 6,75 нмоль и 7,5

нмоль, соответственно, и молярное соотношение группы DBCO и азидной группы составляло около 1:1,1. Скорость реакции (%) неочищенного <sup>177</sup>Lu комплекс-меченного антитела показана в следующей Таблице 5.

Кроме того, RCP и RCY антитела, меченного комплексом <sup>177</sup>Lu, после очистки с использованием ультрафильтрационного фильтра таким же способом, как в Примере 1, показаны в следующей Таблице 5.

[0152]

RCP и RCY антитела, меченного комплексом  $^{177}$ Lu, измеряли таким же способом, как в Примере 1.

[0153]

Таблица 5

	хелатирующий		модариоо	скорость реакции	после	очистки
	агент (A)	антитело (В)	молярное соотношение (A):(B)	37°C 2-часовая реакция (%)	RCP (%)	RCY (%)
Пример 3	DOTAGA	цетуксимаб	1:1.1	98%	100%	48%

[0154]

[Сравнительный пример 3] Получение конъюгата с цетуксимабом путем использования <sup>177</sup>Lu-меченного DOTA-DBCO

Процедуру осуществляли в соответствии с Примером 3, за исключением того, что DOTAGA-DBCO заменяли на DOTA-DBCO. Результаты показаны в Таблице 6.

[0155]

Таблица 6

	хелатирующий		молярное	скорость реакции		сле стки
	агент (A)	антитело (В)	соотношение (А):(В)	37°C 2-часовая реакция (%)	RCP (%)	RCY (%)
Сравнительный пример 3	DOTA	цетуксимаб	1:1.1	91%	100%	64%

[0156]

[Пример 4] Стадия формулирования композиции

Порцию каждого из радиоконъюгатов, полученных как описано в Примере 1, Примере 3, Сравнительном примере 1 или Сравнительном примере 3, помещали в 0,5-мл пробирку Эппендорфа (LoBind, произведено Eppendorf) и разбавляли буфером для хранения (0,01 моль/л цитратного буфера (рН 5,5), содержащего 0,1 моль/л хлорида натрия и 0,1 моль/л глицина, и 0,01 моль/л цитратного буфера (рН 5,5), содержащего 1,0 масс./об.% смешанного раствора полисорбата 80, 0,1 моль/л хлорида натрия и 0,1 моль/л глицина).

[0157]

[Оценка 1] Оценка стабильности

Каждый радиоконъюгат, полученный в Примере 4, хранили при комнатной

температуре в течение 2 недель, и RCP и антигенсвязывающую активность оценивали в каждой временной точке (день 0, день 1, день 7 и/или день 14). Необходимо отметить, что 7 дней после завершения получения соответствуют примерно 1 периоду полураспада, когда радионуклид металла представляет собой Lu-177. Также, 14 дней после завершения получения соответствуют примерно 1,5 периода полураспада, когда радионуклид металла представляет собой Ac-225, и примерно 2 периодам полураспада, когда радионуклид металла представляет собой Lu-177.

[Оценка 1-1] RCP (Радиохимическая чистота)

RCP анализировали методом тонкослойной хроматографии (TCX). Условия TCX были аналогичны тем, которые использовали для исследования скорости реакции в Примере 1. Результаты показаны в Таблице 7.

[0158]

Таблица 7

	р	радиохимическая чистота (%)					
	день 0	день 1	день 7	день 14			
радиоконъюгат (Пример 1)	100,0	99,7	97,9	94,9			
радиоконъюгат (Сравнительный пример 1)	99,8	99,5	91,5	71,4			
радиоконъюгат (Пример 3)	99,7	97,5	93,9	88,2			
радиоконъюгат (Сравнительный пример 3)	99,4	93,5	79,6	61,4			

[0159]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 1, не содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 95% или более при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. Он сохранял RCP 90% или более при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения.

Радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 1, содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 90% или более, но ниже 95% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. При хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения RCP была менее 75%.

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 3, не содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 90% или более при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. Даже при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения сохранялась RCP 85% или более.

Радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 3, содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 75% или более, но ниже 90% при хранении при

комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. При хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения RCP была менее 65%.

[0160]

[Оценка 1-2] Антигенсвязывающая активность

Антигенсвязывающую активность подтверждали авторадиографией in vitro (ARG) (только день получения (0) и последний день сохранения (день 14)). Клетки А431 (линия клеток эпителиоидного рака человека с высокой экспрессией EGFR), приобретенные у ЕСАСС (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур), и клетки SNU-16 (линия клеток рака желудка человека с низкой экспрессией EGFR), приобретенные у АТСС (Американская коллекция типовых культур), вводили подкожно в бок самкам мышей SCID Beige (от Charles River Laboratories Japan, Inc.) в количестве  $5\times10^6$  клеток и  $2\times10^6$  клеток, соответственно, для подготовки мышей с опухолями. После этого опухоль A431 и опухоль SNU-16 вырезали и помещали в Tissue-Tek O.C.T. Compound (Japanese Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) для получения замороженных срезов. Радиоконъюгаты, полученные в Примере 1 и Сравнительном примере 1, добавляли к 1% PBS, содержащему бычий сывороточный альбумин, каждый в концентрации 1 кБк/мл, и погружали в него срез опухоли A431 и срез опухоли SNU-16. После контактирования срезов с пластиной для визуализации их считывали с использованием анализатора изображений сканерного типа для оценки уровня радиоактивности, связанной со срезами. Результаты показаны на Фиг. 1.

Выполняя одинаковую оценку каждого раствора с добавленным к нему цетуксимабом, можно подтвердить специфичность каждого радиоконъюгата в отношении EGFR.

В конечной точке хранения (день 14) активность связывания с EGFR подтверждали для всех радиоконъюгатов, полученных как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1. Оба радиоконъюгата, полученные как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1, связывались со срезом опухоли A431 и срезом опухоли SNU-16, более сильно связываясь со срезом опухоли A431, демонстрируя селективное связывание EGFR. В растворе с добавлением цетуксимаба связывание со срезом опухоли A431 было ингибировано, и была подтверждена специфичность связывания EGFR. В конечной точке хранения (день 14) селективность связывания с EGFR сохранялась во всех образцах. Радиоактивность, связанная с срезом опухоли A431, была выше в образцах с радиоконъюгатами, полученными как описано в Примере 1, чем в радиоконъюгатах, полученных как описано в Сравнительном примере 1.

[0161]

[Оценка 2] аккумулирование в опухоли in vivo

В соответствии с Оценкой 1-2, модель подкожной опухоли из клеток A431 получали с использованием мышей, и подтверждали аккумулирование в опухоли радиоконъюгатов, полученных согласно описанию Примера 2 или Сравнительного

#### примера 2.

ЕGFR-положительную линию клеток эпителиоидного рака человека A431, приобретенную у ATCC, суспендировали в среде DMEM (gibco, произведено Thermo Fisher Scientific) и вводили подкожно в бока 5-недельной самке BALB/c nu/nu (Charles River Laboratories Japan, Inc.) в количестве  $5\times10^6$  клеток для подготовки мышей с опухолями. Опухоли давали возможность вырасти до объема около  $100-250~{\rm mm}^3$ , и радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 2 или Сравнительном примере 2, вводили в дозе  $3,7~{\rm MБк/мышь}$  (каждый n=3) в хвостовую вену. Через  $96~{\rm часов}$  после введения были получены изображения в условиях, указанных в Таблице 8, и с использованием устройства для визуализации ПЭТ небольших животных (PET/CT Si78, произведено Bruker).

Типичные примеры результатов ПЭТ-визуализации показаны на Фиг. 2 (Пример 2) и Фиг. 3 (Сравнительный пример 2). В опухоли накапливался более высокий уровень радиоактивности по сравнению с другими органами, и может быть показана EGFR-положительная опухоль. Кроме того, радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 2, и радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 2, показали визуально схожую аккумуляцию в опухоли. При анализе, при установке VOI (объем, представляющий интерес) на опухоли в этом примере, изображения, показанного на Фиг. 2 или Фиг. 3, радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 2, показывал 5,1% ID/см<sup>3</sup> (введенная доза/см<sup>3</sup>), как отношение радиоактивности на единицу объема к введенной радиоактивности, и радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 2, показал аналогичный уровень 4,6%ID/см<sup>3</sup>.

[0162]

Таблица 8

Изотоп	89-Zr					
Время исследования	600 сек.					
Энергетическое окно	30% (357,	7-664,3 кэВ)				
Восстановление ПЭТ-изображения	MLEM GI	PU 32×32 0,25	(итераций:	12)		
коррекция	Разброс,	Случайные	события,	Распад,	Частичный	объем,
	Затухание	2				

[0163]

[Пример 5] Оценка эффективности с использованием <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела, (противоопухолевый эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного цетуксимаба)

Модель A431 с подкожной опухолью получали с использованием мышей, и подтверждали противоопухолевый эффект радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1.

Клетки A431 линии эпителиоидных раковых клеток человека с высокой экспрессией EGFR, приобретенные у ECACC, суспендировали в среде DMEM (gibco, произведено Thermo Fisher Scientific) и вводили подкожно в бока самкам 5-недельного возраста BALB/c nu/nu (Charles River Laboratories Japan, Inc.) в количестве  $5\times10^6$  клеток для подготовки мышей с опухолями. Опухоли давали вырасти до объема 200-350 мм $^3$ , и

субъектов с формой, подходящей для измерения диаметра опухоли, распределяли по группам случайным образом. Объем опухоли и масса тела каждой мыши на тот момент времени показаны в Таблице 9. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле.

Объем опухоли (мм $^3$ )=(большая ось опухоли  $\times$  ((малая ось опухоли) $^2$ ) $\times$  1/2 [0164]

Таблица 9

	объем опухоли среднее значение ± стандартное отклонение (мм³)	масса тела среднее значение ± стандартное отклонение (г)
группа введения радиоконъюгата (Пример 1)	316,2±68,0	20,5±1,5
группа введения радиоконъюгата (Сравнительный пример 1)	309,2±81,5	20,7±1,4
контрольная группа введения антитела	311,9±51,6	20,5±1,1
группа введения носителя	307,3±68,0	20,5±1,1

[0165]

Радиоконъюгаты, полученные как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1, вводили в хвостовую вену в дозе 15 кБк/мышь (100 мкг/мышь в расчете на цетуксимаб). В качестве контрольной группы были выбраны группа, которой вводили цетуксимаб с тем же количеством антитела, как в каждом радиоконъюгате (контрольная группа введения антитела), и группа, которой вводили носитель с буфером для хранения. В каждой группе было по 6 мышей, наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли осуществляли в течение 37 дней после введения. Изменение объема опухоли с течением времени показано на Фиг. 4, а изменение массы тела с течением времени показано на Фиг. 5.

[0166]

Группы, которым вводили радиоконъюгаты, полученные как описано в Примере 1 и Сравнительном примере 1, показали значительное отличие противоопухолевого эффекта по сравнению с двумя контрольными группами (контрольная группа введения антитела и группа введения носителя) на 37 день после введения (Р<0,05 или Р<0,01). Для определения значимой разницы применяли критерий Тьюки с использованием программного обеспечения для статистического анализа Stat Preclinica (производитель Takumi Information Technology Inc.). В каждой группе не было обнаружено существенных изменений общего состояния и не наблюдалось никаких признаков токсичности, таких как значительная потеря массы тела.

[0167]

[Пример 6] Получение конъюгата с панитумумабом путем использования <sup>225</sup>Асмеченного DOTAGA-DBCO

#### (1. Стадия модификации антитела)

Пептид, содержащий 17 аминокислотных остатков, представленный указанной выше формулой (Р3), получали способом, описанным в WO 2017/217347.

[0168]

Смесь указанного выше пептида и раствора, содержащего панитумумаб (производитель Amgen) в 0,02 моль/л буфере уксусная кислота/ацетат натрия (рН 6,0), подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 60 минут с получением раствора, содержащего пептид-модифицированное антитело. Пептид-модифицированное антитело имеет Fc-область антитела, сайт-специфически модифицированную указанным выше пептидом.

[0169]

Затем раствор пропускали через колонку IgG-BP с получением композиции антител, содержащей относительно большие количества немеченого антитела и моновалентного антитела. Концентрацию моновалентного антитела, содержащегося в выделенной фракции, ругилировали при помощи 0,05 моль/л натрий-ацетатного буфера (рН 5,8), содержащего 0,1 моль/л хлорида натрия, так, чтобы концентрация составляла 15 мг/мл. Полученный раствор, содержащий относительно большие количества немеченого антитела и моновалентного антитела, подвергали стадии мечения, описанной ниже.

[0170]

#### (2. Стадия образования комплекса)

DOTAGA-DBCO получали таким же способом, как в Примере 1. Этот хелатирующий агент диспергировали в 0,156 моль/л натрий-ацетатного буфера (рН 6,0) в качестве растворителя с получением дисперсии, содержащей 0,3 ммоль/л хелатирующего агента. Реакционную смесь дисперсии (0,0136 мл), 0,156 моль/л натрий-ацетатного буфера (рН 5,5, 0,0136 мл) и <sup>225</sup>Ас ион-содержащего раствора, (0,1 моль/л водного раствора хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 210-222 МБк/мл, получен из раствора, произведенного Oak Ridge National Laboratory, количество жидкости 0,0093 мл) 1,95-2,06 МБк (рассчитано по затуханию от уровня радиоактивности на дату и время испытания) в качестве источника радиоактивного металла подвергали взаимодействию в условиях нагревания с получением раствора комплекса <sup>225</sup>Ас. Молярное соотношение хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент : ион <sup>225</sup>Ас=около 989:1, и условия нагрева реакционной смеси были установлены на 70°С, а время нагрева устанавливали на 30 мин.

[0171]

RCP полученного комплекса  $^{225}$ Ac измеряли таким же способом, как в Примере 1. В результате, RCP комплекса  $^{225}$ Ac составляла 95%. Полученный раствор комплекса  $^{225}$ Ac использовали непосредственно на стадии мечения.

[0172]

#### (3. Стадия мечения)

К раствору неочищенного комплекса  $^{225}$ Ac, полученного на указанной выше стадии (2), добавляли раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученное на указанной выше стадии (1), и клик-реакцию осуществляли при  $37^{\circ}$ C в течение 2 часов с получением  $^{225}$ Ac комплекс-меченного антитела. Молярное

соотношение группы DBCO и азидной группы составляло около 1:1.2. Скорость реакции неочищенного <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела показана в следующей Таблице 10.

Кроме того, раствор <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела, полученного в результате реакции при 37°С в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра (изготовитель Merck, номер модели: UFC803096). RCP и RCY <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела после очистки показаны в следующей Таблице 10. RCP и RCY <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела рассчитывали на основе уровня радиоактивности, полученного способом, аналогичным описанному в Примере 1.

[0173]

Таблица 10

			скорость	пс	сле	
	хелатирующий агент (A)		молярное	реакции	очи	стки
		антитело (В)	соотношение	37°C	RCP	RCY
			(A):(B)	2-часовая	(%)	(%)
				реакция (%)	(%)	(%)
Пример 6	DOTAGA	панитумумаб	1:1.2	70	99	61

[0174]

[Сравнительный пример 4] Получение конъюгата с панитумумабом путем использования <sup>225</sup>Ас-меченного DOTA-DBCO

Процедуру осуществляли в соответствии с Примером 6, за исключением того, что DOTAGA-DBCO заменяли на DOTA-DBCO. Результаты показаны в Таблице 11. RCP и RCY <sup>225</sup>Ac комплекс-меченного антитела рассчитывали на основе уровня радиоактивности, определенного способом, аналогичным описанному в Примере 1.

[0175]

Таблица 11

	хелатиру	(D)	молярное	скорость реакции	после с	чистки
	ющий агент (А)	антитело (В)	соотношение (А):(В)	37°С 2-часовая реакция (%)	RCP (%)	RCY (%)
Сравнительный пример 4	DOTA	панитумумаб	1:1.2	50	99	44

[0176]

[Пример 7] Получение комплекса с панитумумабом с использованием <sup>89</sup>Zr-меченного DOTAGA-DBCO

#### (1. Стадия образования комплекса)

Аналогично Примеру 2, получали дисперсию, содержащую хелатирующий агент, и дисперсию (0,0939 мл) смешивали с содержащим 0,150 моль/л гентизиновой кислоты раствором 0,156 ммоль/л ацетата натрия, (рН 5,5) (0,0626 мл) и <sup>89</sup>Zr ион-содержащим раствором (получен из 0,1 моль/л водного раствора хлористоводородной кислоты, концентрация радиоактивности 2,6 ГБк/мл, произведено Nihon Medi-Physics Co., Ltd., количество жидкости 0,0626 мл) (161,6 МБк) в качестве источника радиоактивного металла, и раствор комплекса <sup>89</sup>Zr получали согласно Примеру 2. Молярное соотношение

хелатирующего агента и иона радиоактивного металла составляло хелатирующий агент : ион  $^{89}$ Zr=около 236:1.

[0177]

RCP полученного комплекса <sup>89</sup>Zr измеряли способом, аналогичным описанному в Примере 2. В результате, RCP комплекса <sup>89</sup>Zr составляла 98%. Полученный раствор комплекса <sup>89</sup>Zr использовали как таковой на стадии мечения.

[0178]

#### (2. Стадия мечения)

Раствор неочищенного комплекса <sup>89</sup>Zr, полученный на указанной выше стадии (1), и раствор, содержащий пептид-модифицированное антитело (моновалентное антитело), полученный таким же образом как в Примере 6, смешивали, и клик-реакцию осуществляли при 37°C в течение 90 минут с получением <sup>89</sup>Zr комплекс-меченного антитела. Молярное соотношение DBCO и азида составляло около 1:1. Скорость реакции (%) неочищенного <sup>89</sup>Zr комплекс-меченного антитела показана в следующей Таблице 12.

Кроме того, раствор  $^{89}$ Zr комплекс-меченного антитела, полученного в результате реакции при 37°C в течение 2 часов, очищали с использованием ультрафильтрационного фильтра. RCP и RCY (%)  $^{89}$ Zr комплекс-меченного антитела после очистки показаны в следующей Таблице 12. RCP и RCY  $^{89}$ Zr комплекс-меченного антитела рассчитывали на основе уровня радиоактивности, полученного способом, аналогичным описанному в Примере 1.

[0179]

Таблица 12

VOTOTVOV				скорость	ПО	сле
	у о потиру и о и и й		молярное	реакции	очи	стки
	хелатирующий агент (А)	антитело (В)	соотношение	37°C	RCP	RCY
	arenr(A)		(A):(B)	2-часовая	(%)	(%)
				реакция (%)	(%)	(%)
Пример 7	DOTAGA	панитумумаб	1:1	64	94	57

[0180]

[Пример 8] Стадия формулирования композиции

1,0 мл каждого из радиоконъюгатов, полученных согласно Примеру 6 и Сравнительному примеру 4, помещали в пробирку Эппендорфа емкостью 5 мл (LoBind, произведено Eppendorf) и разбавляли 1,5 мл буфера для получения композиции (0,05 моль/л натрий-ацетатный буфер, содержащий 0,1 моль/л хлорида натрия (рН 5,8)).

[0181]

[Оценка 3] Оценка стабильности

Каждый радиоконъюгат, полученный в Примере 8, хранили при комнатной температуре  $(24,5-25,5^{\circ}C)$  в течение 2 недель, и RCP, долю агрегатов и антигенсвязывающую активность оценивали в каждой временной точке (день 0, день 1, день 7 и день 14).

[Оценка 3-1] RCP

RCP рассчитывали по результатам TCX-анализа. Условия TCX были аналогичны тем, которые использовались для исследования скорости реакции в Примере 1. Результаты показаны в Таблице 13.

[0182]

Таблица 13

	RCP(%)			
	день 0	день 1	день 7	день 14
радиоконъюгат (Пример 6)	100,0	99,9	99,8	99,5
радиоконъюгат (Сравнительный пример 4)	99,6	99,0	95,0	92,9

[0183]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 6, не содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 99% или более при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. Даже при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения сохранялась RCP 99% или более. Радиоконъюгат, полученный как описано в Сравнительном примере 4, содержащий тиомочевинную связь, сохранял RCP 95% или более при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней после завершения получения. При хранении при комнатной температуре в течение 14 дней после завершения получения RCP была менее 93%.

[0184]

#### [Оценка 3-2] Доля агрегатов

Долю агрегатов подтверждали методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Используя модуль разделения модели 2695 или модуль разделения е2695, произведенный компанией Waters, в качестве устройства для жидкостной хроматографии, и детектор ультрафиолетового и видимого диапазонов модели 2489, произведенный компанией Waters, в качестве УФ-детектора, анализ осуществляли при следующих условиях. Доля каждого компонента при хранении в течение 7 дней после завершения получения показана в Таблице 14. При хранении в течение 7 дней после завершения получения доля агрегатов в радиоконъюгатах, полученных как описано в Примере 6, была эквивалентна доле агрегатов в радиоконъюгатах, полученных как описано в Сравнительном примере 4.

[0185]

Таблица 14

	основной пик (%)	пик агрегатов (%)
радиоконъюгат (Пример 6) день 0	92,20	7,80
радиоконъюгат (Сравнительный пример 4) день 0	91,49	8,51
радиоконъюгат (Пример 6) день 7	89,92	10,03
радиоконъюгат (Сравнительный пример 4) день 7	89,77	10,17

[0186]

[Условия ВЭЖХ]

колонка: TOSOH TSKgel защитная колонка SWXL (6 мм  $\times$  4 см), TOSOH TSKgel G3000SWXL (5 мкм, 7,8 $\times$ 30 см) $\times$ 2 (тандем)

температура колонки: постоянная температура около 25°C

подвижная фаза: 0,1 моль/л фосфатный буфер, содержащий 0,2 моль/л аргинингидрохлорида (pH 6,8)

скорость потока: 1,0 мл/мин

диапазон измерения площади: 30 мин

длина волны детекции: 280 нм

[0187]

[Оценка 3-3] Антигенсвязывающая активность

Антигенсвязывающую активность подтверждали (только дата изготовления) при помощи ARG in vitro согласно описанию Примера 1, за исключением того, что клетки SW48, которые представляют собой клеточную линию, полученную из колоректального рака человека с высокой экспрессией EGFR, приобретенную у ATCC, клетки HCT-116, которые представляют собой клеточную линию, полученную из колоректального рака человека с низкой экспрессией EGFR, приобретенную у ATCC, и клетки COLO205, которые представляют собой клеточную линию, полученную из рака толстой кишки человека с низкой экспрессией EGFR, приобретенную у ECACC, были включены в срезы опухолей для оценки. Кроме того, аналогичную оценку осуществляли с использованием раствора, где к каждому раствору добавляли немеченый панитумумаб (концентрация добавленного панитумумаба: 10 нМ), и подтверждали специфичность радиоконъюгата к EGFR. Результаты показаны на Фиг. 6. Активность связывания с EGFR подтверждали в радиоконъюгате, полученном как описано в Примере 6. В радиоконъюгате, полученном согласно Примеру 6, связывание подтверждали в срезе опухоли A431, срезе опухоли SNU-16, срезе опухоли SW48, срезе опухоли HCT-116 и срезе опухоли COLO205, причем более сильное связывание было подтверждено в срезе опухоли A431 и в срезе опухоли SW48, и была подтверждена связывающая активность, зависимая от экспрессии EGFR. В растворе, было ингибировано содержащем панитумумаб, связывание во всех использованных для оценки, что подтверждает специфичность связывания EGFR.

[0188]

[Пример 9] Оценка эффективности с использованием  $^{225}$ Ас комплекс-меченного антитела (оценка цитотоксического эффекта  $^{225}$ Ас комплекс-меченного панитумумаба)

Цитотоксический эффект радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 6, подтверждали с использованием культивируемых клеток. Клетки COLO205 (среда RPMI 1640), клетки HCT-116 (среда Макоя 5A), клетки SW48 (среда Лейбовица L-15), клетки MIAPaCa-2 клеточной линии, полученной из рака поджелудочной железы человека с высокой экспрессией EGFR, приобретенные у ECACC (среда DMEM), и клетки NCI-H358 клеточной линии, полученной из немелкоклеточного рака легкого с высокой экспрессией EGFR, приобретенные у ATCC (среда RPMI 1640), соответственно культивировали в

соответствующих средах, радиоконъюгат, полученный согласно Примеру 6, разбавляли каждой средой до 0, 0,001, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 кБк/мл (0,000764, 0,00764, 0,0229, 0,0764, 0,229, 0,764, 2,29, 7,64, 22,9 мкг/мл в расчете на панитумумаб) и добавляли к клеткам. Кроме того, немеченый панитумумаб добавляли до концентрации антитела такой же, как концентрация образца при каждой концентрации радиоактивности, и клетки культивировали. Через 120 часов после добавления образца к среде добавляли CellTiter-Glo (зарегистрированная торговая марка) 2.0 Cell Viability Assay (производство Promega), хемилюминесценцию определяли с использованием микропланшет-ридера (SpectraMax i3x, изготовитель Molecular Devices, LLC) и подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Брали отношение количества жизнеспособных клеток в условиях, когда антитела не добавлялись, к рассчитанному количеству жизнеспособных клеток и оценивали цитотоксический эффект. Результаты показаны на Фиг. 7А-7С. Кроме того, полученные аппроксимировали методом нелинейной, линейной использованием GraphPad Prism 7 (производитель GraphPad Software) и рассчитывали  $EC_{50}$ . В результате, значение  $EC_{50}$  цитотоксического эффекта радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 6, составляло 0,5 пМ против клеток SW48, 2,8 пМ против клеток NCI-H358 и 7,3 пМ против клеток COLO205. Кроме того, при использовании немеченого панитумумаба цитотоксический эффект не был подтвержден при не превышающей максимальную добавленной концентрации (концентрация антитела: 156 нМ).

В оцениваемых клетках цитотоксический эффект <sup>225</sup>Ac комплекс-меченного панитумумаба подтверждали даже в клетках, для которых немеченый панитумумаб не проявлял цитотоксического эффекта, включая клетки с мутациями в KRAS (гомолог вирусного онкогена крысиной саркомы v-Ki-ras2 Kirsten) и BRAF (гомолог В1 вирусного онкогена мышиной саркомы v-raf).

[0189]

[Пример 10] Оценка эффективности с использованием <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела (оценка индукции апоптоза <sup>225</sup>Ас комплекс-меченным панитумумабом)

Подтверждали индукцию апоптоза культивируемых клеток радиоконъюгатом, полученным как описано в Примере 6.

Клетки SW48, полученные из колоректального рака человека, и клетки COLO205 культивировали в условиях, аналогичных условиям, описанным в Примере 9, радиоконъюгат, полученный согласно Примеру 6, добавляли до 0, 0,001, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 кБк/мл (0,00764, 0,0764, 0,229, 0,764, 2,29, 7,64, 22,9 мкг/мл в расчете на панитумумаб). Кроме того, немеченый панитумумаб добавляли до концентрации антитела, такой же, как в группе при каждой концентрации радиоактивности, и клетки культивировали. Через 72 часа после добавления образца добавляли набор для анализа апоптоза (Caspase-Glo (зарегистрированная торговая марка) 3/7 Assay, производства Ргомеда) и активность каспазы-3/7 определяли с использованием микропланшет-ридера. Результаты показаны на Фиг. 8. В обеих клетках индукция апоптоза не была

подтверждена при использовании немеченого панитумумаба, но при использовании <sup>225</sup> Ас комплекс-меченного панитумумаба активность каспазы-3/7 повышалась в зависимости от добавленной радиоактивности, и индукция апоптоза облучением была подтверждена.

[0190]

[Пример 11] Оценка эффективности с использованием <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела (оценка двухцепочечного разрыва ДНК панитумумабом)

Подтверждали эффект на культивируемые клетки, вызывающий двухцепочечный разрыв ДНК, для радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 6.

Клетки SW48, клетки MIAPaCa-2 и клетки NCI-H358 культивировали таким же образом, как в Примере 9, радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 6, добавляли до 1 кБк/мл, 10 кБк/мл, 30 кБк/мл (3,73, 37,3, 112 мкг/мл в расчете на панитумумаб) и клетки культивировали. Через 48 часов после добавления образца с использованием набора для детекции повреждений ДНК (DNA Damage Detection KitγH2AX-Green, произведен DOJINDO LABORATORIES) клетки окрашивали γH2AX, а окрашивание и заливку В среду осуществляли с использованием ядерное водорастворимого агента для заливки в среду, содержащего DAPI (ProLong<sup>TM</sup> Diamond Antifade Mountant with DAPI, произведено Thermo Fisher Scientific). После заливки в среду осуществляли детекцию үН2АХ-положительного сайта и ядра с использованием флуоресцентного микроскопа HS All-in-one (BZ-9000, изготовитель KEYENCE). Результаты показаны на Фиг. 9А-9С. В каждых клетках доля үН2АХ-положительных клеток увеличивалась в зависимости от добавленной радиоактивности, и был подтвержден двухцепочечный разрыв ДНК.

[0191]

[Пример 12] Оценка эффективности с использованием <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела (противоопухолевый эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба)

Модель с подкожной опухолью из клеток COLO205 получали с использованием мышей, и подтверждали противоопухолевый эффект радиоконью гата, полученного как описано в Примере 6.

Клетки COLO205 линии клеток, полученной из колоректального рака человека с высокой экспрессией EGFR, приобретенные у ECACC, суспендировали в DMEM (gibco, производства Thermo Fisher Scientific) и вводили подкожно в бок 6-недельным самкам BALB/c nu/nu. (Charles River Laboratories Japan, Inc.) в количестве  $5\times10^6$  клеток для подготовки мышей с опухолями. После обработки мышей с опухолями было подтверждено, что объем опухоли составлял примерно от 100 до 300 мм $^3$ , и мышей с формой, подходящей для измерения диаметра опухоли, распределяли по группам случайным образом. Объем опухоли и масса тела каждой мыши на тот момент показаны в следующей Таблице 15.

[0192]

Таблина 15

		тиолици тэ	
	объем опухоли	масса тела	
	среднее значение ±	среднее значение ±	

	стандартное отклонение (мм <sup>3</sup> )	стандартное отклонение (г)
группа введения радиоконъюгата (Пример 6) с высокой радиоактивностью	189,7±35,7	18,5±0,8
группа введения радиоконъюгата (Пример 6) с низкой радиоактивностью	199,2±48,6	18,6±0,6
группа перитонеального введения антитела	186,0±36,5	17,9±1,9
контрольная группа введения антитела	289,2±159,8	18,2±1,3
группа введения носителя	208,0±31,5	18,1±1,5

[0193]

Радиоконьюгат, полученный как описано в Примере 6, вводили в хвостовую вену в дозе 10 кБк/мышь в группе введения с высокой радиоактивностью и в дозе 5 кБк/мышь в группе введения с низкой радиоактивностью (50 мкг/мышь в расчете на панитумумаб для обеих групп). В качестве контрольной группы были выбраны группа, которой вводили панитумумаб в хвостовую вену в дозе 200 мкг/мышь (контрольная группа введения антитела), и группа введения носителя, которой вводили буфер для хранения в хвостовую вену. Кроме того, устанавливали группу (группа перитонеального введения антитела) путем интраперитонеального введения панитумумаба дважды в неделю в течение 2 недель в дозе 200 мкг/мышь в соответствии с СТD (Общий технический документ) препарата Вектибикс (зарегистрированная торговая марка, изготовитель Takeda Pharmaceutical Company Limited). В каждой группе было по 6 мышей, наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли осуществляли в течение 33 дней после введения. Изменение объема опухоли с течением времени показано на Фиг. 10.

[0194]

Группы, которым вводили радиоконъюгат с высокой радиоактивностью, значительное полученный описано В Примере 6, показали отличие противоопухолевого эффекта ПО сравнению с двумя контрольными группами (контрольная группа введения антитела и группа введения носителя) и группой перитонеального введения антитела на 33 день после введения (Р<0,05 или Р<0,01). Для определения значимой разницы применяли критерий Тьюки с использованием программного обеспечения для статистического анализа Stat Preclinica. Группа, которой вводили радиоконъюгат с низкой радиоактивностью, полученный как описано в Примере 6, показывала на 33 день после введения значительную разницу в противоопухолевом эффекте (Р<0,05 или Р<0,01) по сравнению с контрольной группой введения антитела и группой перитонеального введения антитела. С другой стороны, не наблюдали существенной разницы в противоопухолевом эффекте между группами, которым вводили каждый радиоконъюгат. В каждой группе не было обнаружено существенных изменений общего состояния и не наблюдали никаких признаков токсичности, таких как значительная потеря массы.

[0195]

[Пример 13] Оценка эффективности с использованием <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела (противоопухолевый эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба)

Модель с подкожной опухолью из клеток HCT-116 получали с использованием мышей, и подтверждали противоопухолевый эффект радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 6.

Противоопухолевый эффект подтверждали таким же способом, как в Примере 12, за исключением того, что клетки HCT-116 линии клеток, полученной из колоректального рака человека с высокой экспрессией EGFR, приобретенные у ATCC, суспендировали в DMEM (gibco, произведено Thermo Fisher Scientific) и использовали. Объем опухоли и масса тела каждой мыши при введении каждого раствора показаны в следующей Таблице 16.

[0196]

Таблица 16

	объем опухоли	масса тела
	среднее значение ±	среднее значение ±
	стандартное	стандартное
	отклонение (мм <sup>3</sup> )	отклонение (г)
группа введения радиоконъюгата (Пример 6)	284,1±116,1	18,2±0,7
с высокой радиоактивностью	204,1±110,1	16,2±0,7
группа введения радиоконъюгата (Пример 6)	251,7±124,7	18,3±0,9
с низкой радиоактивностью	231,7±124,7	16,5±0,9
группа перитонеального введения антитела	266,1±90,7	17,6±1,3
контрольная группа введения антитела	289,2±159,8	17,9±1,1
группа введения носителя	263,9±66,5	17,8±1,1

[0197]

Установление групп, введенная радиоактивность и введенное количество антител были такими же, как в Примере 12. В каждой группе было по 6 мышей, наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли осуществляли в течение 26 дней после введения. Изменение объема опухоли с течением времени показано на Фиг. 11.

[0198]

Группы, которым вводили радиоконъюгаты с высокой радиоактивностью, Примере 6, полученные как описано В показывали значительное отличие противоопухолевого эффекта по сравнению с двумя контрольными группами (контрольная группа введения антитела и группа введения носителя) и группой перитонеального введения антитела на 26 день после введения (Р<0,01). Для определения значимой разницы применяли критерий Тьюки с использованием программного обеспечения для статистического анализа Stat Preclinica. Значительную разницу в противоопухолевом эффекте (Р<0,05) наблюдали между группами, которым вводили каждый радиоконъюгат, и зависимость от введенной радиоактивности была подтверждена противоопухолевым эффектом. Никаких заметных изменений общего состояния в каждой группе обнаружено не было, и не наблюдали никаких признаков токсичности, таких как значительная потеря массы.

[0199]

[Пример 14] Оценка эффективности с использованием <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного антитела (противоопухолевый эффект <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба)

Модель с подкожной опухолью из клеток SW48 получали с использованием мышей, и подтверждали противоопухолевый эффект радиоконью гата, полученного как описано в Примере 6.

Противоопухолевый эффект подтверждали таким же способом, как в Примере 12, за исключением того, что клетки SW48, которые представляют собой клеточную линию, полученную из колоректального рака человека с высокой экспрессией EGFR, приобретенные у ATCC, суспендировали в DMEM (gibco, произведено Thermo Fisher Scientific) и использовали. Объем опухоли и масса тела каждой мыши при введении каждого раствора показаны в следующей Таблице 17.

[0200]

Таблица 17

	объем опухоли	масса тела
	среднее значение ±	среднее значение ±
	стандартное	стандартное
	отклонение (мм <sup>3</sup> )	отклонение (г)
группа введения радиоконъюгата (Пример 6) с высокой радиоактивностью	516,9±76,1	19,8±1,6
группа введения радиоконъюгата (Пример 6) с низкой радиоактивностью	510,7±67,7	19,4±0,8
группа перитонеального введения антитела	641,2±195,7	19,8±1,6
контрольная группа введения антитела	492,8±85,2	19,0±1,3
группа введения носителя	495,0±89,9	19,8±1,1

[0201]

Установление групп, введенная радиоактивность и введенное количество антител были такими же, как в Примере 12, за исключением того, что количество введенного антитела в контрольной группе введения антитела было установлено на уровне 50 мкг/мышь. В каждой группе было по 6 мышей, наблюдение за общим состоянием и измерение массы тела и объема опухоли осуществляли в течение 18 дней после введения. Изменение объема опухоли с течением времени показано на Фиг. 12.

[0202]

Группа, которой вводили радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 6, показывала значительное отличие противоопухолевого эффекта по сравнению с двумя контрольными группами (контрольная группа введения антитела, группа введения носителя) на 18 день после введения (Р<0,01). Для определения значимой разницы применяли критерий Тьюки с использованием программного обеспечения для статистического анализа Stat Preclinica. С другой стороны, не было обнаружено существенных различий в противоопухолевом эффекте между группами, которым вводили каждый радиоконъюгат. В каждой группе не было обнаружено существенных изменений общего состояния и не наблюдали никаких признаков токсичности, таких как значительная потеря массы.

[0203]

[Пример 15] Сравнение эффективности <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаба и существующих препаратов

Модель с подкожной опухолью из клеток COLO205 получали с использованием мышей, и сравнивали противоопухолевый эффект радиоконью гата, полученного как описано в Примере 6, и существующего препарата.

Аналогично Примеру 12, получали мышей, имеющих опухоли с клетками COLO205, и подтверждали противоопухолевый эффект. Объем опухоли и масса тела каждой мыши при введении каждого раствора показаны в Таблице 18 ниже.

[0204]

Таблица 18

	объем опухоли	масса тела
	среднее значение ±	среднее значение ±
	стандартное	стандартное
	отклонение (мм <sup>3</sup> )	отклонение (g)
группа введения радиоконъюгата (Пример 6)	267,8±66,4	20,1±1,0
группа введения оксалиплатина	269,4±65,4	19,8±1,0
группа введения носителя	260,2±77,2	19,7±1,0

[0205]

Введение осуществляли в хвостовую вену в дозе 10 кБк/мышь в группе, которой вводили радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 6. В качестве группы сравнения устанавливали группу (группа введения оксалиплатина) путем введения 33 мкл оксалиплатина в хвостовую вену в дозе 5 мг/мл 3 раза через неделю. В качестве контрольной группы была выбрана группа носителя, которой вводили в хвостовую вену буфер для хранения, используемый для радиоконъюгата, полученного как описано в Примере 6. В каждой группе было по 6 мышей, наблюдение за общим состоянием, измерение массы тела и объема опухоли осуществляли до конца периода наблюдения. Изменение объема опухоли с течением времени показано на Фиг. 13. На чертеже вертикальная ось указывает средний объем опухоли в каждой группе, а горизонтальная ось указывает количество дней, прошедших с момента введения каждого лекарственного средства. График представляет среднее значение ± стандартное отклонение объема опухоли в каждой группе, "\*" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,05) от группы введения оксалиплатина, и "†" указывает момент времени, когда наблюдали значимое отличие (p<0,01) от группы введения носителя. В последний день наблюдения мышей вскрывали и собирали кровь. Собранную кровь анализировали с использованием анализатора сухой химии (SPOTCHEM D-02, изготовитель ARKRAY, Inc.) путем измерения аспартатаминотрансферазы (ACT), аланинаминотрансферазы (ALT) и азота мочевины крови (BUN) в плазме путем использования SPOTCHEM D Total-A2 (производитель ARKRAY, Inc.), и оценивали гепатотоксичность и нефротоксичность. Результаты показаны на Фиг. 14. Вертикальная ось показывает концентрацию каждого маркера, горизонтальная ось показывает оцениваемые группы, а графики показывают среднее значение ± стандартное отклонение в каждой группе. В последний день наблюдения существенных различий в маркерах гепатотоксичности и нефротоксичности в каждой группе не было, а в конечный момент наблюдения не были подтверждены ни гепатотоксичность, ни нефротоксичность.

[0206]

[Пример 16] Оценка стабильности  $^{225}{
m Ac}$  комплекс-меченного панитумумаба в плазме

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 6, хранили при 37°C в течение 2 недель в плазме каждого вида животных (человека (плазма человека (пул, гепарин), произведено Cosmo Bio Company, Limited), мыши (пул плазмы мыши линии BALB/c-nu, произведено Charles River Laboratories Japan, Inc.), крысы (плазма (пул) Wistar, произведено Charles River Laboratories Japan, Inc.), обезьяны (плазма Macaca fasccularis, произведено Charles River Laboratories Japan, Inc.)) и оценивали стабильность <sup>225</sup>Асмеченного панитумумаба в плазме в каждой временной точке (день 0, день 1, день 7, день 14 (только плазма человека)). Плазму каждого вида животных инкубировали при 37°C и добавляли радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 6, в конечной концентрации 100 кБк/мл. В каждой временной точке оценки осуществляли иммунопреципитацию с использованием Dynabeads (зарегистрированная торговая марка) с белком G (производитель Thermo Fisher Scientific) и после промывки PBS, содержащим 0,1% Tween 20, собирали антитела, связанные с белком G. PBS, содержащий 0,1% Tween 20, использованный для промывки гранул, собирали и измеряли радиоактивность собранного промывочного раствора и радиоактивность собранного использованием гамма-счетчика Autowell (гамма-счетчик 2480 WIZARD2, производства PerkinElmer). Рассчитывали отношение радиоактивности выделенного антитела к общей радиоактивности PBS, содержащего 0,1% Tween 20, использованного для промывки гранул, и радиоактивности выделенного антитела, в результате чего оценивали процент 225 Ас-меченного панитумумаба, связанного с белком G. Результаты показаны в Таблице 19. Значения в Таблице указывают среднее значение ± стандартное отклонение (n=3) отношения радиоактивности выделенного антитела к общей радиоактивности PBS, содержащего 0,1% Tween 20, использованного для промывки гранул, и радиоактивности выделенного антитела.

[0207]

Таблица 19

стабильность (%)	день 0	день 1	день 7	день 14
плазма человека	92,4±0,4	85,6±5,0	88,6±3,9	71,6±6,3
плазма обезьяны	91,0±2,0	89,9±4,5	86,9±3,0	_
плазма мыши	97,8±0,4	87,9±1,2	88,2±0,6	_
плазма крысы	96,8±1,0	88,5±3,3	69,9±6,4	_

[0208]

Радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 6, сохранял стабильность 85% или более при хранении в течение 7 дней в плазме каждого вида животных, кроме крысы, и сохранял стабильность 70% или более даже при хранении в течение 14 дней в плазме человека.

[0209]

[Пример 17] Оценка аккумулирования в опухоли <sup>89</sup>Zr комплекс-меченного

#### панитумумаба

В соответствии с Примером 12, модель с подкожной опухолью из клеток COLO205 получали с использованием мышей, и подтверждали аккумуляцию в опухоли радиоконьютата, полученного как описано в Примере 12.

Клетки COLO205 клеточной линии колоректального рака человека с высокой экспрессией EGFR, полученной от ATCC, суспендировали в среде DMEM и вводили подкожно в бок 5-недельным самкам BALB/c nu/nu (Charles River Laboratories Japan, Inc.) в количестве  $5\times10^6$  клеток для подготовки мышей с опухолями. Опухоли давали вырасти до объема примерно  $100-250~\text{мm}^3$ , и радиоконъюгат, полученный как описано в Примере 7, вводили в дозе около 6 МБк/мышь (каждый n=3) в хвостовую вену. Через 72 часа и 120 часов после введения получали изображения с использованием устройства для визуализации ПЭТ для небольших животных в условиях, аналогичных условиям при Оценке 2.

Репрезентативные примеры результатов ПЭТ-визуализации показаны на Фиг. 15. Стрелка на изображении указывает на опухоль, происходящую из клеток COLO205, используемых для опухоленосителей. Когда был установлен VOI для опухоли и мышцы (бедренной мышцы) у каждой визуализируемой мыши и было рассчитано SUV (стандартное значение поглощения), значение составило  $3.18 \pm 0.72$  для опухоли и  $0.48 \pm 0.02$  для мышцы через 72 часа после введения и  $4.38 \pm 0.96$  для опухоли и  $0.48 \pm 0.05$  для мышцы через 120 часов после введения. Используя полученные значения, рассчитывали отношение аккумулированной радиоактивности в опухоли к аккумулированной радиоактивности в мышце. В результате отношение составило  $6.67 \pm 1.52$  через 72 часа после введения и  $9.19 \pm 2.02$  через 120 часов после введения, и более высокий уровень радиоактивности был аккумулирован в опухоли по сравнению с другими органами, и можно было определить EGFR-положительную опухоль.

[0210]

Настоящая заявка основана на патентной заявке № 2021-062104, поданной в Японии (дата подачи: 31 марта 2021 г.), патентной заявке № 2021-179348, поданной в Японии (дата подачи: 2 ноября 2021 г.) и патентной заявке № 2022-021670, поданной в Японии (дата подачи: 15 февраля 2022 г.), содержание которых полностью включено в настоящую заявку.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Конъюгат анти-EGFR антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, и хелатирующего агента, где хелатирующий агент хелатирован с радионуклидом металла, пептид и хелатирующий агент связаны линкером (L), и линкер (L) не содержит тиомочевинную связь.
- 2. Конъюгат по п. 1, где хелатирующий агент представляет собой DOTAGA ( $\alpha$ -(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту).
- 3. Конъюгат по п. 1 или 2, где пептид представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из не менее 13 и не более 17 аминокислотных остатков и представлен следующей формулой (i):

(Xa)-Xaa1-(Xb)-Xaa2-(Xc)-Xaa3-(Xd)···(i)

в формуле (i), Xa, Xb, Xc и Xd представляют собой последовательные X в количестве a, последовательные X в количестве b, последовательные X в количестве c и последовательные X в количестве d, соответственно,

X представляет собой аминокислотный остаток, не имеющий ни тиоловой, ни галогенацетильной группы в боковой цепи,

а, b, c и d каждый независимо представляет собой целое число не менее 1 и не более 5 и удовлетворяют условию a+b+c+d≤14,

Хаа1 и Хаа3 каждый независимо представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу в боковой цепи, или аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей галогенацетильную группу в боковой цепи, при условии, что один из Хаа1 и Хаа3 представляет собой аминокислотный остаток, полученный из аминокислоты, имеющей тиоловую группу в боковой цепи,

Хаа1 и Хаа3 объединены с образованием кольцевой структуры, и

Хаа2 представляет собой лизиновый остаток, аргининовый остаток, цистеиновый остаток, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновую кислоту или диаминопропионовую кислоту и модифицирован сшивающим агентом.

- 4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, где радионуклид металла представляет собой Ac-225, Y-90, Lu-177 или Zr-89.
- 5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, где линкер (L) включает формулу (10a), формулу (10b) или формулу (10c):

$$R_{1A}$$
 $R_{1A}$ 
 $R$ 

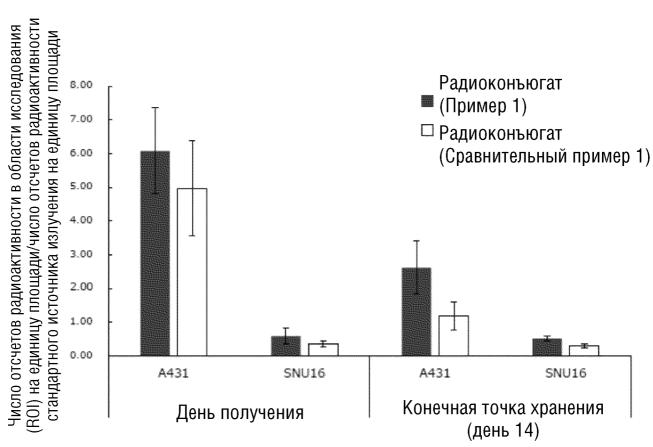
В формуле (10a) и формуле (10b)  $R_{1A}$  представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и  $R_{2A}$  представляет собой сайт связывания с пептидом. В формуле (10c) один из  $R_{3A}$  и  $R_{4A}$  представляет собой атом водорода, метильную группу, фенильную группу или пиридильную группу, а другой представляет собой сайт связывания с хелатирующим агентом, и  $R_{5A}$  представляет собой сайт связывания с пептидом.

- 6. Конъюгат по п. 5, включающий группу полиэтиленгликоля между сайтом связывания с пептидом и пептидом.
- 7. Конъюгат по любому из пп. 1-6, который конъюгирован путем клик-реакции анти-EGFR антитела, сайт-специфически модифицированного пептидом, имеющим азидную группу, введенную на N-конце, и комплекса радиоактивного металла DOTAGA-DBCO, представленного следующей формулой:

#### DOTAGA-DBCO

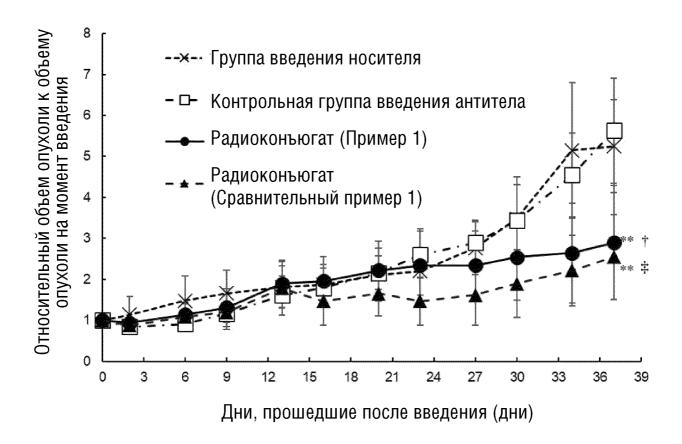
- 8. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где анти-EGFR антитело представляет собой цетуксимаб или панитумумаб.
- 9. Радиофармацевтическое средство, включающее конъюгат по любому из пп. 1-8 в качестве активного ингредиента.
- 10. Радиофармацевтическое средство по п. 9, которое используют в радионуклидной терапии рака.
- 11. Радиофармацевтическое средство по п. 9, которое используют в диагностике рака.
- 12. Радиофармацевтическое средство по п. 11, которое используют в комбинации с радионуклидной терапией рака с использованием радиофармацевтического средства по п. 10.

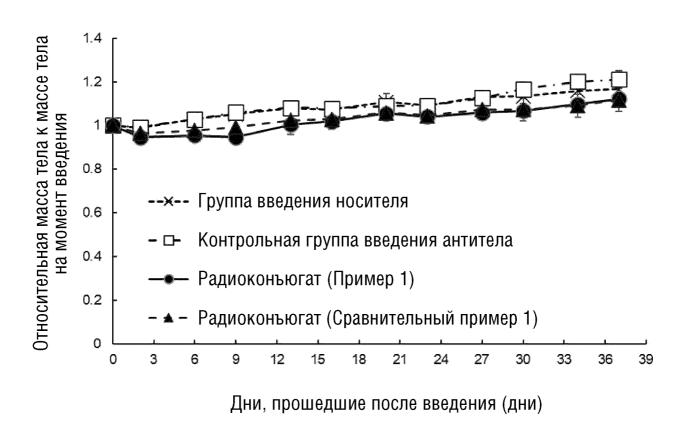
- 13. Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-EGFR антитела в качестве активного ингредиента и удовлетворяющее следующему условию (1) или (2), причем связь между анти-EGFR антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь:
- (1) радионуклид металла представляет собой  $^{177}$ Lu или  $^{90}$ Y, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 7 дней
- (2) радионуклид металла представляет собой <sup>225</sup>Ас, и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% при хранении при комнатной температуре в течение 14 дней.
- 14. Радиофармацевтическое средство, содержащее конъюгат хелатирующего агента, хелатированного с радионуклидом металла, и анти-EGFR антитела в качестве активного ингредиента, причем связь между анти-EGFR антителом и хелатирующим агентом не содержит тиомочевинную связь и конъюгат имеет радиохимическую чистоту не менее 90% на момент истечения периода, который является не менее чем 1- и не более чем 5-кратным периоду полураспада, в расчете на период полураспада радионуклида металла.

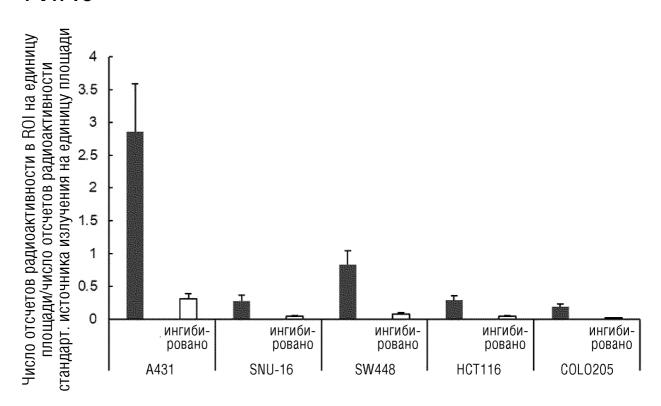


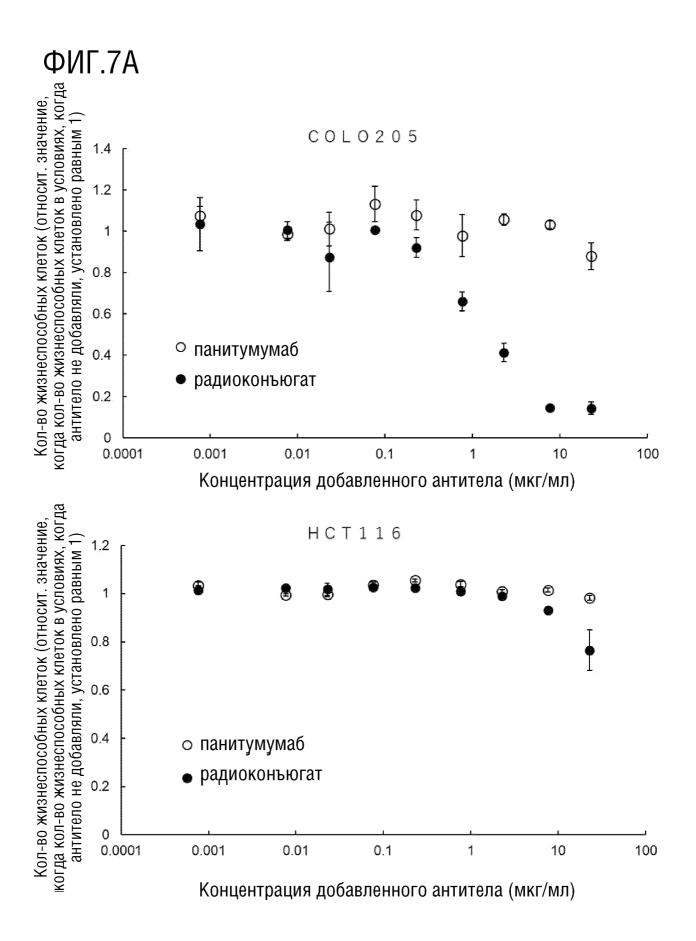


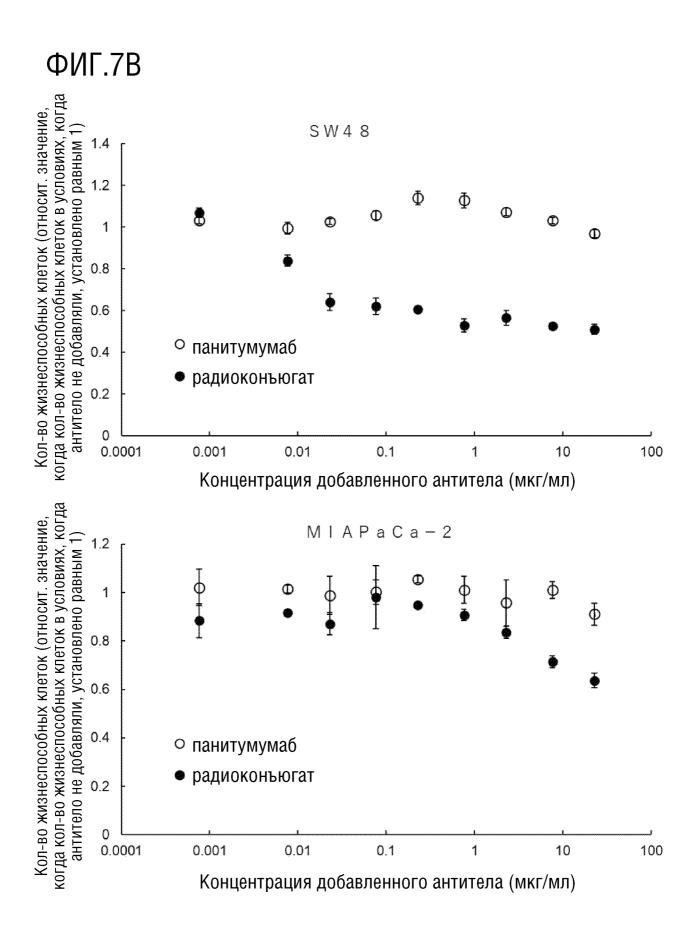




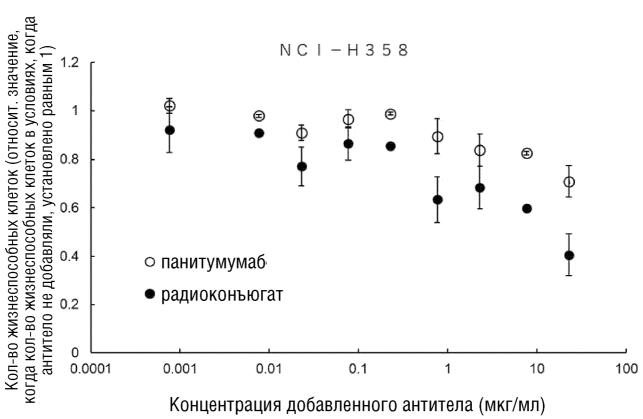




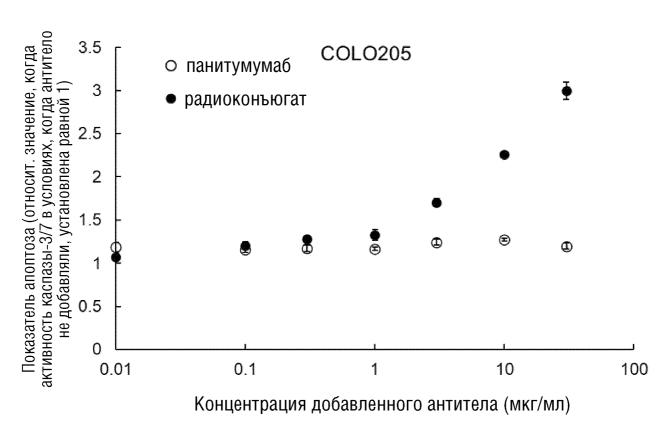


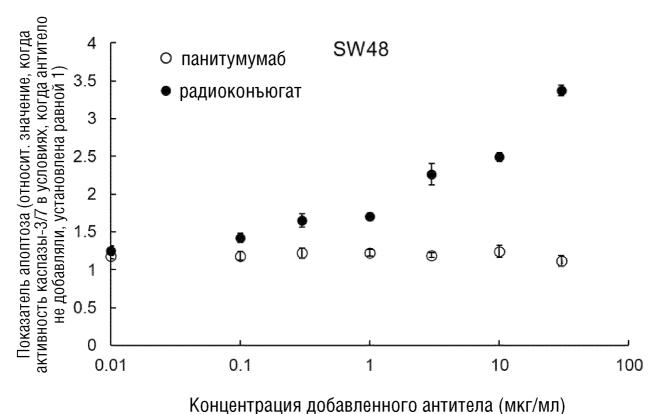






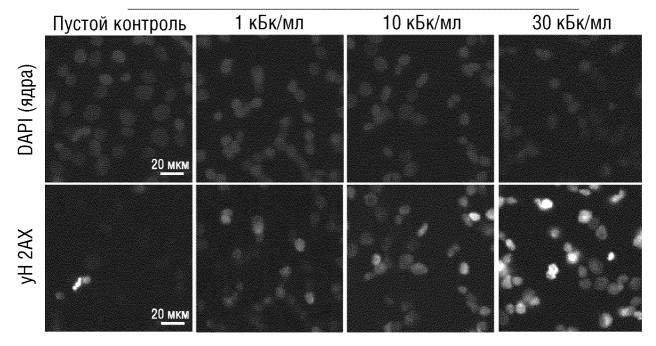
## 8.7NФ





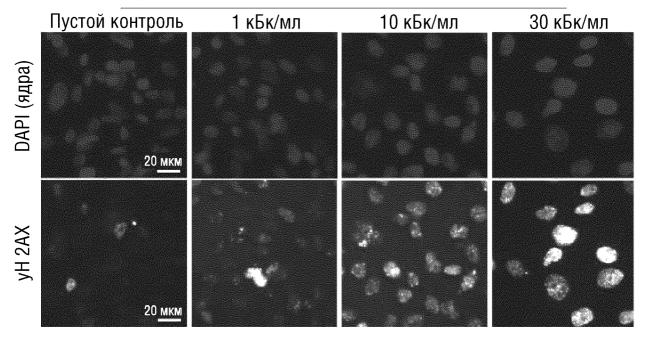
## ФИГ.9А

SW48 Концентрация <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаб



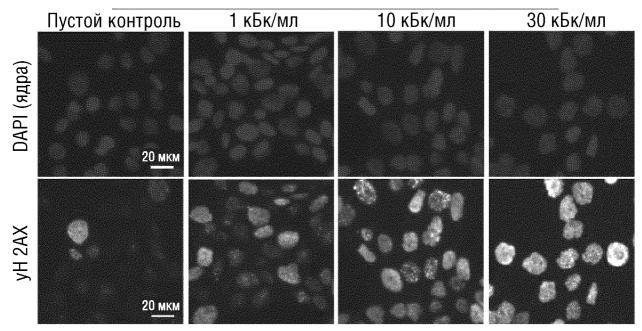
## ФИГ.9В

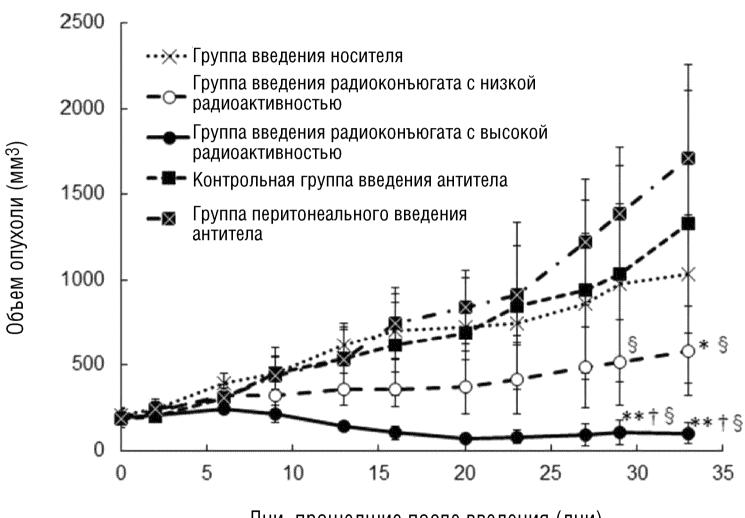
MIAPaCa-2 Концентрация <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаб



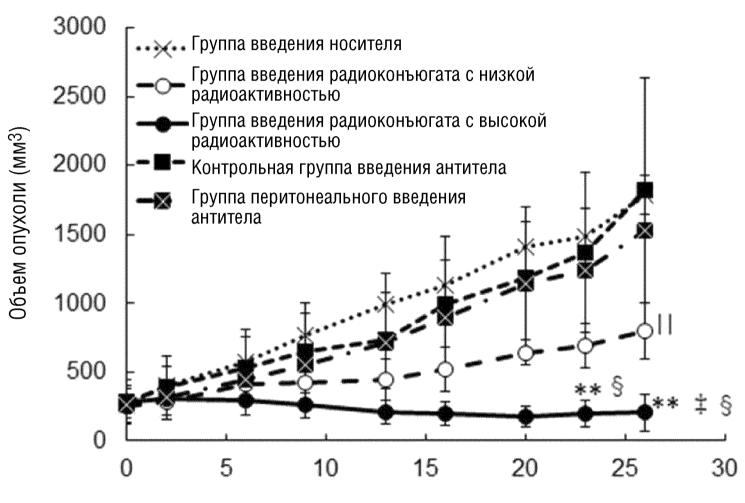
# ФИГ.9С

NCI-H358 Концентрация <sup>225</sup>Ас комплекс-меченного панитумумаб

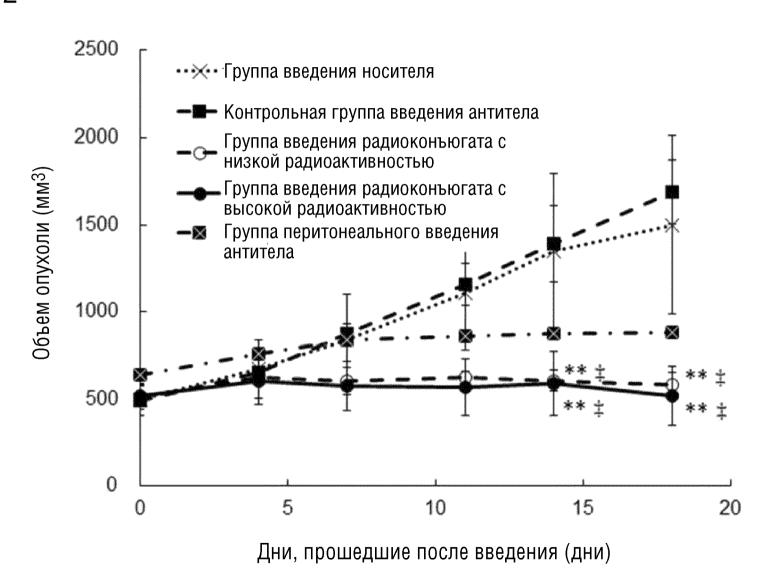


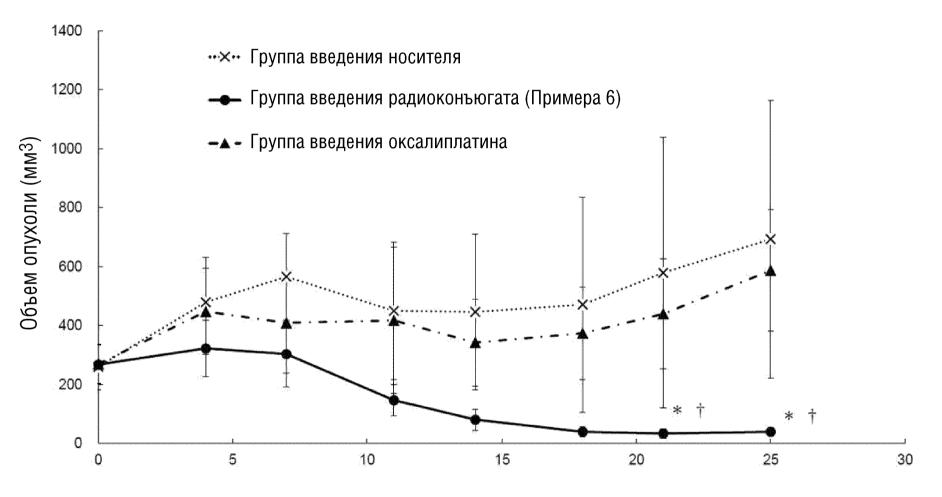


Дни, прошедшие после введения (дни)



Дни, прошедшие после введения (дни)





Дни, прошедшие после введения (дни)

