

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490849 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.19

(22) Дата подачи заявки
2022.09.29

(51) Int. Cl. A61K 51/10 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) EGFRvIII-ТАРГЕТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

(31) PCT/CA2021/051360

(32) 2021.09.29

(33) CA

(86) PCT/CA2022/051447

(87) WO 2023/050008 2023.04.06

(71) Заявитель:

НЭШНЛ РИСЕРЧ КАУНСЛ
ОФ КАНАДА; ФБЮЖН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ИНК. (СА)

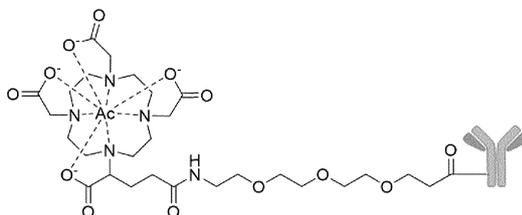
(72) Изобретатель:

Гринштейн Натали (US), Меткаф
Жюли, Даффи Иэн Р., Тернбулл
Уильям Лесли, Марсил Энн,
Харамилльо Мария, Сулеа Трейен,
Морено Мария, У Цуньлэ (СА)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Соединения, например радиоиммуноконъюгаты, включающие хелатирующий фрагмент или его металлокомплекс, линкер и таргетный фрагмент EGFRvIII. Фармацевтические композиции таких соединений и способы лечения состояний, например рака, с использованием таких соединений или фармацевтических композиций.



A1

202490849

202490849

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580875EA/032

EGFRvIII-ТАРГЕТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] По настоящей заявке испрашивается приоритет международной патентной заявки № PCT/CA2021/051360, поданной 29 сентября 2021 г., все содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] В настоящей спецификации содержится ссылка на список последовательностей (представленный в электронном виде в виде файла.xml с именем «FPI_027_Sequence_Listing.xml» 29 сентября 2022 г.). .xml файл был создан 26 сентября 2022 г., его размер составляет 263 килобайта. Все содержание перечня последовательностей включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII) амплифицируется, сверхэкспрессируется и присутствует в 25-64% случаев мультиформной глиобластомы (GBM). Экспрессия мРНК и белка EGFRvIII была обнаружена в подмножестве карцином молочной железы, а также в плоскоклеточной карциноме головы и шеи (HNSCC) с использованием нескольких дополнительных методов. В отличие от рецептора эпидермального фактора роста дикого типа (EGFR), который экспрессируется в тканях эпителиального, мезенхимального и нейронального происхождения и играет важную роль в нормальных клеточных процессах, таких как пролиферация, дифференциация и развитие, EGFRvIII не экспрессируется в нормальных тканях.

[004] Вариант EGFRvIII возникает в результате делеции экзонов 2-7 гена EGFR внутри рамки считывания, приводя к удалению последовательности, кодирующей 267 аминокислотных остатков внеклеточного домена. Вновь образованная граница сплайсинга кодирует глициновый остаток, который не имеет аналога в EGFR человека дикого типа и, следовательно, образует нео-эпитоп. Более того, многочисленные исследования показали, что нормальные ткани лишены EGFRvIII. Таким образом, EGFRvIII содержит новый опухолеспецифический эпитоп клеточной поверхности, который можно использовать для таргетной терапии антителами. Однако нео-эпитоп EGFRvIII является не очень иммуногенным по сравнению с остальной частью последовательности человека, и было показано, что многие из антител, полученных к настоящему времени, специфически не распознают EGFRvIII.

[005] Известные в настоящее время антитела EGFRvIII включают антитело 13.1.2 и АВТ-806. Хотя в доклинических моделях было показано, что АВТ-806 преимущественно связывается с EGFR опухоли, было показано, что связывание этого антитела с wt EGFR, присутствующим в коже человека, объясняет кожную токсичность, которую АВТ-806 демонстрирует у некоторых пациентов. Антитела или их антигенсвязывающие

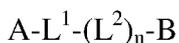
фрагменты, которые специфически таргетируют эпитоп EGFRvIII, который отсутствует или недоступен в клетках, экспрессирующих EGFR, будут полезны для лечения больных раком.

[006] Таким образом, сохраняется потребность в улучшенных терапевтических агентах (*например*, противораковых терапевтических агентах), которые могут таргетировать EGFRvIII.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] Настоящее изобретение относится к соединениям, которые таргетируют вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), их фармацевтическим композициям и способам лечения или профилактики рака с использованием таких фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые соединения демонстрируют повышенную скорость выведения (*например*, после введения млекопитающему) по сравнению с некоторыми известными в настоящее время радиотерапевтическими агентами, сохраняя при этом терапевтическую эффективность. В некоторых вариантах осуществления, более быстрое выведение может ограничить нецелевую токсичность за счет ограничения времени, в течение которого соединение остается в организме субъекта. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, предлагаемые соединения демонстрируют сниженную нецелевую токсичность.

[008] В одном аспекте, предложены соединения, имеющие следующую структуру, или их фармацевтически приемлемые соли:



Формула I

где

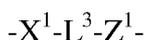
A представляет собой хелатирующий фрагмент или его металлокомплекс,

B представляет собой таргетную группу, которая способна связываться с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII) или его фрагментом, где EGFRvIII или его фрагмент содержит пептид, состоящий из аминокислотных остатков 1-76 SEQ ID NO:119;

L^1 представляет собой связь, C=O, C=S, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

n представляет собой целое число от 1 до 5 (включительно); и

L^2 каждый независимо имеет структуру Формулы II:



Формула II

где

X^1 представляет собой $-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-*$, $-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-*$, $-OC(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)O-*$, $-NR^1C(O)NR^1-$, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$, $-O-$ или $-NR^1-$, где «*» означает точку присоединения к L^3 , и R^1 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6

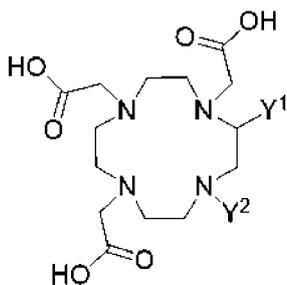
алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

L³ представляет собой необязательно замещенный C₁-C₅₀ алкил или необязательно замещенный C₁-C₅₀ гетероалкил; и

Z¹ представляет собой -CH₂-#, -C(O)-#, -C(S)-#, -OC(O)-#, -C(O)O-#, -NR²C(O)-#, -C(O)NR²-# или -NR²-#, где «#» указывает точку присоединения к В, и R² представляет собой водород, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

[009] В некоторых вариантах осуществления, переменная А в Формуле I представляет собой хелатирующий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты), DOTMA (1R,4R,7R,10R)-α,α',α'',α'''-тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты, DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана), DOTPA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрапропионовой кислоты), DO3AM-уксусной кислоты (2-(4,7,10-трис(2-амино-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)уксусной кислоты), DOTA-GA ангидрида (2,2',2''-(10-(2,6-диоксотетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триил)триуксусной кислоты), DOTP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфоновой кислоты)), DOTMP (1,4,6,10-тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетраметиленфосфоновой кислоты), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновой кислоты), СВ-ТЕ2А (1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусной кислоты), NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты), NOTP (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-три(метиленфосфоновой кислоты), ТЕТРА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовой кислоты), ТЕТА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты), НЕНА (1,4,7,10,13,16-гексаазациклогексадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусной кислоты), РЕРА (1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан-N, N',N'',N''',N''''-пентауксусной кислоты), Н₄октапа (N, N'-бис(6-карбоксо-2-пиридилметил)-этилендиамин-N, N'-диуксусной кислоты), Н₂дедпа (1,2-[[6-(карбоксо)-пиридин-2-ил]-метиламино]этана), Н₆фоспа (N,N'-(метиленфосфонат)-N, N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтана), ТТНА (триэтилететрамин-N,N,N',N'',N''',N''''-гексауксусной кислоты), DO2P (тетраазациклододекандиметанфосфоновой кислоты), HP-DO3A (гидроксипропилтетраазациклододекантриуксусной кислоты), ЭДТК (этилендиаминтетрауксусной кислоты), Дефероксамина, ДТРА (диэтилентриаминпентауксусной кислоты), ДТРА-ВМА (диэтилентриаминпентауксусной кислоты-бисметиламида), октадентат-НОРО (октадентатных гидроксипиридинонов) и порфирина.

[010] В некоторых вариантах осуществления, соединение Формулы I представлено:



где Y^1 представляет собой $-\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{L}^2)_n-\text{B}$, $\text{C}=\text{O}(\text{L}^2)_n-\text{B}$ или $\text{C}=\text{S}(\text{L}^2)_n-\text{B}$ и Y^2 представляет собой $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; или

где Y^1 представляет собой H и Y^2 представляет собой $\text{L}^1-(\text{L}^2)_n-\text{B}$. В некоторых вариантах осуществления, Y^1 представляет собой H.

[011] В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой $\text{R}^L-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}^L$, и R^L представляет собой водород или $-\text{CO}_2\text{H}$.

[012] В некоторых вариантах осуществления, X^1 представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^1-\ast$ или $-\text{NR}^1\text{C}(\text{O})-\ast$, « \ast » указывает точку присоединения к L^3 , и R^1 представляет собой H.

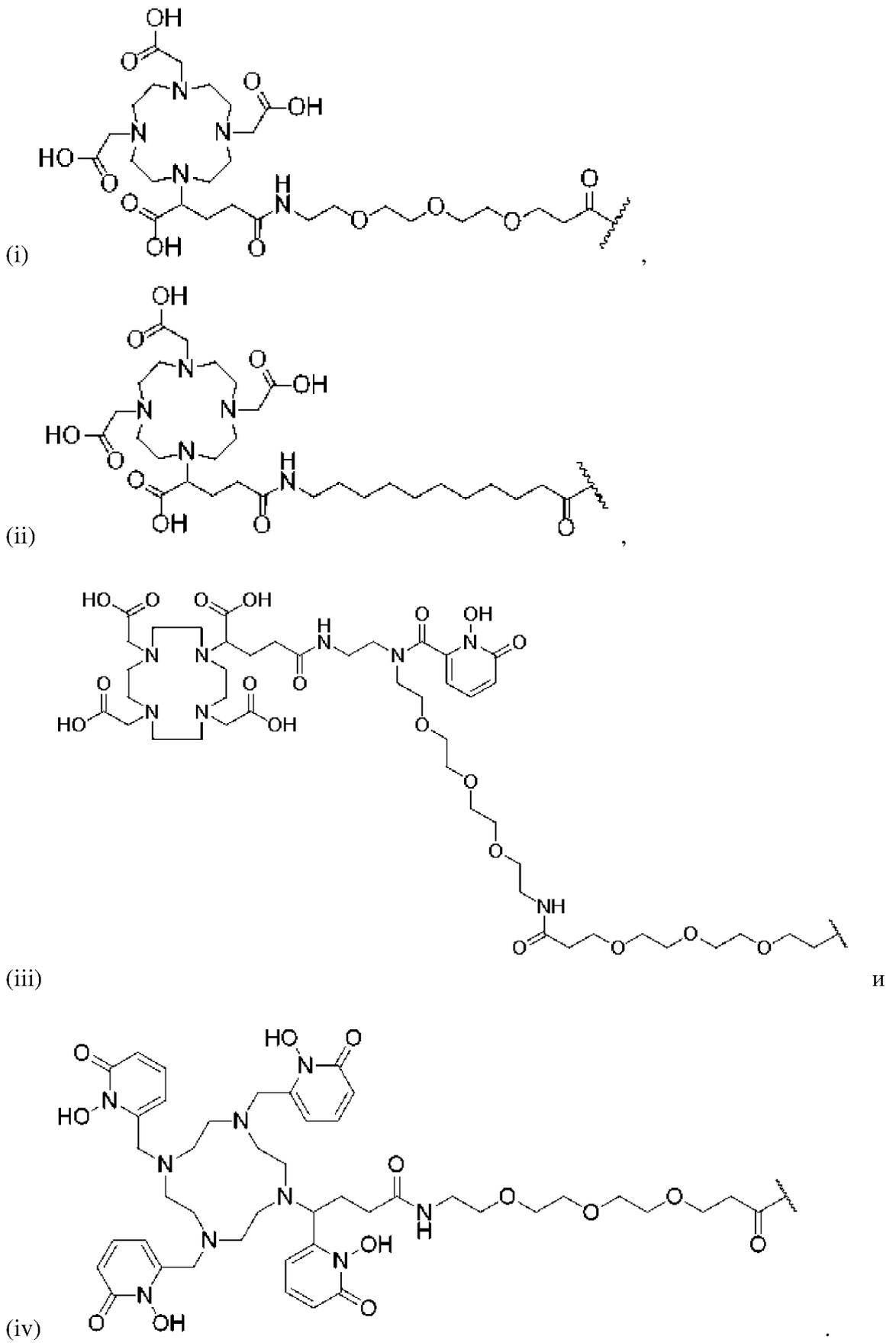
[013] В некоторых вариантах осуществления, Z^1 представляет собой $-\text{CH}_2-$.

[014] В некоторых вариантах осуществления, L^3 включает $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{2-20}$. В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m(\text{CH}_2)_w$, где каждый из m и w независимо представляет собой целое число от 0 до 10 (включительно), и по меньшей мере один из m и w не равен 0.

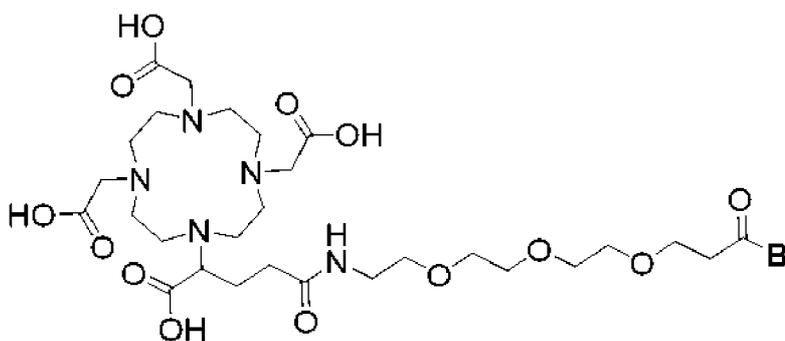
[015] В некоторых вариантах осуществления, металлокомплекс содержит металл, выбранный из группы, состоящей из Bi, Pb, Y, Mn, Cr, Fe, Co, Zn, Ni, Tc, In, Ga, Cu, Re, лантаноида и актинида. В некоторых вариантах осуществления, металлокомплекс содержит радионуклид, выбранный из группы, состоящей из ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{133}La , ^{134}Ce , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th и ^{229}Th .

[016] В некоторых вариантах осуществления, переменная A представляет собой металлокомплекс хелатирующего фрагмента. В некоторых таких вариантах осуществления, металлокомплекс содержит радионуклид. В некоторых вариантах осуществления, радионуклид представляет собой альфа-излучатель, например, альфа-излучатель, выбранный из группы, состоящей из астата-211 (^{211}At), висмута-212 (^{212}Bi), висмута-213 (^{213}Bi), актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), свинца-212 (^{212}Pb), тория-227 (^{227}Th) и тербия-149 (^{149}Tb) или их дочерние изотопы. В некоторых вариантах осуществления, радионуклид представляет собой ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu или ^{225}Ac . В некоторых вариантах осуществления, радионуклид представляет собой ^{225}Ac или его дочерний изотоп.

[017] В некоторых вариантах осуществления, AL- в Формуле I содержит одну из следующих структур или ее металлокомплекс:



[018] В некоторых вариантах осуществления, соединение или его фармацевтически приемлемая соль имеет следующую структуру или ее металлокомплекс:



[019] В некоторых вариантах осуществления, целевой фрагмент содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[020] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с EGFRvIII или его фрагментом, содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, последовательность CDRL2 SEQ ID NO:9 и последовательность CDRL3 SEQ ID NO:10, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1 SEQ ID NO:13, последовательность CDRH2 SEQ ID NO:14 и последовательность CDRH3 SEQ ID NO:15;

b. переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:18, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:19, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:23, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:25;

c. переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:28, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:29, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:30, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:33, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:34, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:35;

d. переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:38, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:39, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO:80.

[021] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EGFRvIII или его фрагментом, включает:

а. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:118, или по существу идентичную SEQ ID NO:118, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, или по существу идентичную SEQ ID NO:116;

б. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:115, или по существу идентичную SEQ ID NO:115, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, или по существу идентичную SEQ ID NO:116; или

с. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:118, или по существу идентичную SEQ ID NO:118, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:62, или по существу идентичную SEQ ID NO:62.

[022] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:7, или по существу идентичную SEQ ID NO:7, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:12 или по существу идентичную SEQ ID NO:12;

б. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:17, или по существу идентичную SEQ ID NO:17, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:22, или по существу идентичную SEQ ID NO:22;

или

b. вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:172, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:177;

[025] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:180, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:183;

b. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:181, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:183;

c. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:182, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:183;

d. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:180, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:184;

e. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:181, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:184;

f. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:182, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:184;

g. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:180, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:185;

h. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:181, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:185; или

i. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:182, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:185.

[026] В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело, антитело человека, одноцепочечное антитело или мультиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой гуманизованное моноклональное антитело.

[027] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область IgG1 человека.

[028] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область IgG2 человека.

[029] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4(S228P) человека, содержащую константную область легкой каппа-цепи человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:178, и константную область тяжелой цепи IgG4(S228P) человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:179.

[030] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

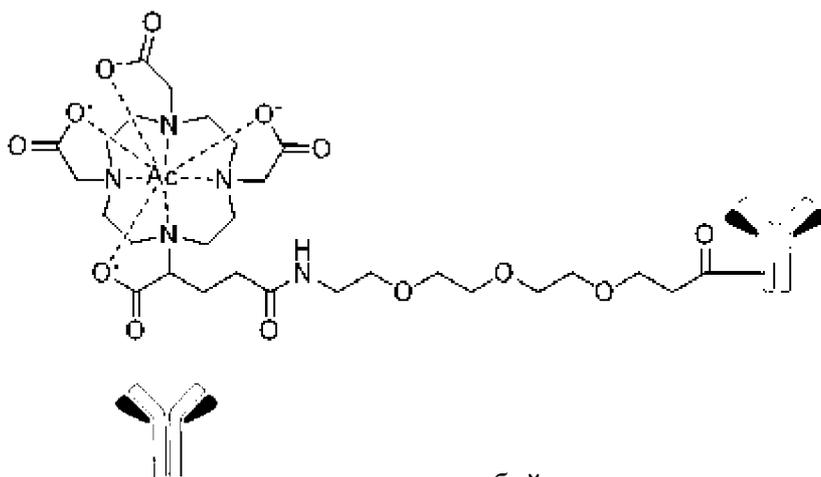
а. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:108, или по существу идентичную SEQ ID NO:108, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:107 или по существу идентичную SEQ ID NO:107; или

б. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:110, или по существу идентичную SEQ ID NO:110, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:109, или по существу идентичную SEQ ID NO:109.

[031] В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

[032] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:38, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:39, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:40, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:43, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:44 и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:45.

[033] В некоторых вариантах осуществления, соединение имеет следующую структуру:



где  представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EGFRvIII или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с A-L- через аминогруппу боковой цепи лизинового остатка.

[034] В другом аспекте, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей одно из соединений, описанных выше, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

[035] В объем настоящего изобретения также входит способ планирования лучевой терапии и/или лучевой терапии рака, и способ, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, одного из соединений, указанных выше, или фармацевтической композиции, содержащей его.

[036] Также в объем настоящего изобретения входит способ лечения рака, который включает экспрессию EGFRvIII, где способ включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в этом, соединения или фармацевтической композиции, представленных здесь, в терапевтически эффективном количестве.

[037] Кроме того, в настоящее изобретение включен способ лечения или профилактики рака, который включает клетки, экспрессирующие EGFRvIII, где способ включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в этом, первой дозы соединения или фармацевтической композиции, представленной выше, в эффективном количестве для планирования лучевой терапии, с последующим введением последующих доз соединения или фармацевтической композиции, предложенных выше, в терапевтически эффективном количестве.

[038] В некоторых вариантах осуществления, соединение или композиция, вводимые в первой дозе, и соединение или композиция, вводимые в последующей дозе, являются одинаковыми.

[039] В некоторых вариантах осуществления, соединение или композиция, вводимые в первой дозе, и соединение или композиция, вводимые в последующей дозе, являются разными.

[040] В некоторых вариантах осуществления, рак, который включает клетки, экспрессирующие EGFRvIII, представляет собой мультиформную глиобластому или

карциному.

[041] В некоторых вариантах осуществления, способ лечения дополнительно включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в этом, антипролиферативного агента, радиационного сенсibilизатора, иммунорегуляторного или иммуномодулирующего агента.

[042] В некоторых вариантах осуществления, способ лечения включает введение соединения или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, в комбинации с антипролиферативным агентом в отсутствие или в присутствии дистанционной лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления, антипролиферативный агент представляет собой темозоломид (TMZ).

[043] В некоторых вариантах осуществления, способ лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, в нескольких дозах (например, дозирование один раз в неделю в течение 4 циклов или дозирование один раз в две недели в течение 2 циклов).

[044] В некоторых вариантах осуществления, способ лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, в стандартной дозе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[045] **ФИГ. 1А** представляет собой схему, изображающую общую структуру бифункционального хелата, содержащего хелат, линкер и поперечно-сшивающую группу.

[046] **ФИГ. 1В** представляет собой схему, изображающую общую структуру бифункционального конъюгата, содержащего хелат, линкер и таргетный фрагмент.

[047] **ФИГ. 1С** и **ФИГ. 1D** представляют собой схемы, изображающие структуры [¹⁷⁷Lu]-DOTA-анти-EGFRvIII и [²²⁵Ac]-DOTA-анти-EGFRvIII, двух типовых радиоиммуноконъюгатов EGFRvIII, раскрытых в настоящем документе.

[048] **ФИГ. 2** представляет собой схему, изображающую синтез бифункционального хелата, 4-{{11-оксо-11-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)ундецил}карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]бутановой кислоты (Соединения В). Синтез Соединения В описан в Примере 2.

[049] **ФИГ. 3** представляет собой схему, изображающую синтез бифункционального хелата, 4-{{2-(2-{2-[3-оксо-3-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)пропокси]этокси}этокси)этил}карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]бутановой кислоты (соединения С). Синтез Соединения С описан в Примере 3.

[050] **ФИГ. 4** представляет собой схему, изображающую конъюгацию и радиоактивное мечение для синтеза конъюгата [¹⁷⁷Lu]-соединение С-анти-EGFRvIII. См. Пример 4.

[051] **ФИГ. 5А** и **5В** представляют собой кривые связывания конъюгатов [¹⁷⁷Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII, т.е. Конъюгатов А и В, соответственно, связывающихся с

клетками U87-EGFRvIII. ТВ означает полное связывание, СВ означает специфическое связывание, и NSB означает неспецифическое связывание. См. Пример 6.

[052] **ФИГ. 6А и 6В** демонстрируют результаты интернализации Конъюгатов А и В в клетках U87-EGFRvIII. См. Пример 7.

[053] **ФИГ. 7А - 7С** демонстрируют результаты остаточного образования Конъюгатов А и В в клетках U87-EGFRvIII. См. Пример 7.

[054] **ФИГ. 8А и 8В** демонстрируют график, представляющий результаты исследований биораспределения на модели подкожного введения U87-EGFRvIII и инъекций Конъюгатов А и В, соответственно. Доля введенной дозы на грамм ткани (% ID/г) отложена на оси X и показана для крови, сердца, кишечника, почек, печени, легких, селезенки, опухоли, мочи и хвоста в 4, 24, 96 и 168 часов. См. Пример 8.

[055] **ФИГ. 9** демонстрирует график, представляющий результаты исследований биораспределения на ортотопической модели U87-EGFRvIII-GFP-Luc с инъекциями Конъюгатов А и В. Доля инъецированной дозы на грамм ткани (% ID/г) отложена на оси x и показана для крови, опухоли, нормального головного мозга, селезенки, печени, почек и хвоста в 96 часов. См. Пример 9.

[056] **ФИГ. 10А-10D** демонстрируют изображения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии/компьютерной томографии (ОФЭКТ/КТ) (ФИГ. 10А и 10С) и графики (ФИГ. 10В и 10D), представляющие результаты исследований биораспределения в ортотопической модели G39-GFP-Luc, в которую инъецированы конъюгаты [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII (ФИГ. 10А и 10В) или [¹¹¹In]-Соединение С-IgG4 (ФИГ. 10С и 10D). На графиках, показанных на Фигурах 10В и 10D, доля инъецированной дозы на кубический сантиметр ткани (% ID/см³) отложена на оси y и показана для опухоли, нормального головного мозга, мочевого пузыря, почек, печени, селезенки, сердца, легких, желудочно-кишечного тракта и костей в 96 часов. См. Пример 10.

[057] **ФИГ. 11А-11D** демонстрируют изображения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии/компьютерной томографии (ОФЭКТ/КТ) (ФИГ. 11А и 11С) и графики (ФИГ. 11В и 11D), представляющие результаты исследований биораспределения в ортотопической модели G06-GFP-Luc, в которую инъецированы конъюгаты [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII (ФИГ. 11А и 11В) или [¹¹¹In]-Соединение С-IgG4 (ФИГ. 11С и 11D). На графиках, показанных на Фигурах 11В и 11D, доля инъецированной дозы на кубический сантиметр ткани (% ID/см³) отложена на оси y и показана для опухоли, нормального головного мозга, мочевого пузыря, почек, печени, селезенки, сердца, легких, желудочно-кишечного тракта и костей в 96 часов. См. Пример 10.

[058] **ФИГ. 12А-12С** демонстрируют результаты исследований эффективности *in vivo* на ортотопической модели U87-EGFRvIII-GFP-Luc, в которую инъецировано [²²⁵Ac]-соединение С-анти-EGFRvIII в стандартных дозах 100 нКи и 200 нКи. **ФИГ. 12А** представляет собой график, показывающий биолюминесценцию (показательную на наличие опухолей, измеренную в определенные моменты времени после лечения); **ФИГ. 12В** показывает кривую выживаемости; и **ФИГ. 12С** представляет собой таблицу,

изображающую медианную выживаемость и преимущество в выживаемости в каждой группе лечения. См. Пример 11.

[059] **ФИГ. 13А и 13В** демонстрируют результаты исследований эффективности *in vivo* на ортотопической модели G06-GFP-Лус, в которую инъецировано [²²⁵Ac]-соединение С-анти-EGFRvIII в стандартных дозах 100 нКи и 200 нКи. **ФИГ. 13А** показывает кривую выживаемости, и **ФИГ. 13В** представляет собой таблицу, показывающую медианную выживаемость и преимущество в выживаемости в каждой группе лечения. См. Пример 11.

[060] **ФИГ. 14А и 14В** демонстрируют результаты исследований эффективности *in vivo* на ортотопической модели G39-GFP-Лус, в которую инъецировано [²²⁵Ac]-соединение С-анти-EGFRvIII в стандартной дозе 100, 200 или 400 нКи или общей кумулятивной радиохимической дозе 400 нКи, фракционированной следующим образом: 100 нКи вводят один раз в неделю в течение 4 недель (100 нКи x 4) или 200 нКи каждые 2 недели по 2 дозы (200 нКи x 2). **ФИГ. 14А** показывает кривую выживаемости, и **ФИГ. 14В** представляет собой таблицу, показывающую медианную выживаемость и преимущество в выживаемости в каждой группе лечения. См. Пример 12.

[061] **ФИГ. 15А и 15В** демонстрируют результаты исследований эффективности *in vivo* на ортотопической модели G06-GFP-Лус, в которую инъецировано [²²⁵Ac]-соединение С-анти-EGFRvIII в дозе 200 нКи в комбинации со стандартным лечением (дистанционная лучевая терапия в комбинации с темозоломидом). **ФИГ. 15А** показывает кривую выживаемости, и **ФИГ. 15В** представляет собой таблицу, показывающую медианную выживаемость и преимущество в выживаемости в каждой группе лечения. См. Пример 13.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[062] Радиоиммуноконъюгаты сконструированы для таргетирования белка или рецептора, который активируется в болезненном состоянии, для доставки радиоактивной полезной нагрузки, повреждающей и убивающей представляющие интерес клетки (радиоиммунотерапия). Процесс доставки такой полезной нагрузки посредством радиоактивного распада приводит к образованию альфа-, бета- или гамма-частицы или Оже-электрона, которые могут оказывать прямое воздействие на ДНК (например, разрывы одно- или двухцепочечной ДНК) или косвенные эффекты, такие как эффекты свидетеля или перекрестных помех.

[063] Радиоиммуноконъюгаты обычно содержат таргетный фрагмент (например, биологический таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент)), который способен специфически связываться с EGFRvIII человека, радиоизотоп и молекулу, которая связывает их. Конъюгаты образуются, когда к таргетной молекуле (например, биологической таргетной молекуле) присоединяется бифункциональный хелат, так что структурные изменения минимальны при сохранении аффинности к мишени. После радиомечения образуется окончательный радиоиммуноконъюгат.

[064] Бифункциональные хелаты структурно содержат хелат, линкер и поперечно-сшивающую группу (**ФИГ. 1А**). При разработке новых бифункциональных хелатов,

большинство усилий сосредоточено на хелатирующей части молекулы. Описано несколько примеров бифункциональных хелатов с различными циклическими и ациклическими структурами, конъюгированными с таргетным фрагментом. [Bioconjugate Chem. 2000, 11, 510-519; Bioconjugate Chem. 2012, 23, 1029-1039; Mol Imaging Biol. 2011, 13, 215-221, Bioconjugate Chem. 2002, 13, 110-115.]

[065] Одним из ключевых факторов разработки безопасных и эффективных радиоиммуноконъюгатов является максимизация эффективности при минимизации нецелевой токсичности в нормальных тканях. Хотя это утверждение является одним из основных принципов разработки новых лекарственных средств, его применение в радиоиммунотерапии сопряжено с новыми проблемами. Радиоиммуноконъюгатам не нужно блокировать рецептор, как это необходимо для терапевтического антитела, или высвободить цитотоксическую полезную нагрузку внутриклеточно, как того требует конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»), чтобы иметь терапевтическую эффективность. Однако выброс токсичных частиц представляет собой событие, которое происходит в результате распада первого порядка (радиоактивного) и может произойти случайно в любом месте тела после введения. Как только происходит выброс, может произойти повреждение окружающих клеток в пределах диапазона выброса, что может привести к потенциальной нецелевой токсичности. Поэтому ограничение воздействия этих излучений на нормальные ткани является ключом к разработке новых терапевтических радиоиммуноконъюгатов.

[066] Одним из потенциальных способов снижения нецелевого воздействия является более эффективное удаление радиоактивности из организма (*например*, из нормальных тканей организма). Одним из механизмов является увеличение скорости клиренса биологического таргетного агента. Этот подход, вероятно, требует определения способов сокращения периода полужизни биологического таргетного агента, который недостаточно хорошо описан для биологических таргетных агентов. Независимо от механизма, увеличение клиренса лекарственного средства также будет отрицательно влиять на фармакодинамику/эффективность, поскольку более быстрое выведение лекарства из организма снизит эффективную концентрацию в месте действия, что, в свою очередь, потребует более высокой общей дозы и не позволит достичь желаемых результатов по снижению общей радиоактивной дозы на нормальные ткани.

[067] Другие усилия были сосредоточены на ускорении метаболизма той части молекулы, которая содержит радиоактивный фрагмент. С этой целью были предприняты некоторые усилия по увеличению скорости отщепления радиоактивности от биологических таргетных агентов с использованием так называемых «расщепляемых линкеров». Однако расщепляемые линкеры имеют другое значение в отношении радиоиммуноконъюгатов. Cornelissen, et al. описали расщепляемые линкеры как те, с помощью которых бифункциональный хелат прикрепляется к биологическому таргетному агенту посредством восстановленного цистеина, тогда как другие описали использование ферментативно-расщепляемых систем, которые требуют совместного введения

радиоиммуноконъюгата с расщепляющим агентом/ферментом для высвобождения [Mol Cancer Ther. 2013, 12(11), 2472-2482; Methods Mol Biol. 2009, 539, 191-211; Bioconjug Chem. 2003, 14(5), 927-33]. Эти способы либо изменяют природу биологического таргетного фрагмента в случае цистеиновой связи, либо непрактичны с точки зрения разработки лекарственного средства (систем, расщепляемых ферментами), поскольку в приведенных цитатах требуется введение двух агентов..

[068] Настоящее изобретение предлагает, среди прочего, соединения, например радиоиммуноконъюгаты, которые более эффективно выводятся из организма после катаболизма и/или метаболизма, сохраняя при этом терапевтическую эффективность. В некоторых вариантах осуществления, раскрытые иммуноконъюгаты могут достигать снижения общей радиоактивности организма, например, за счет увеличения степени выведения продуктов катаболизма/метаболизма при сохранении фармакокинетики интактной молекулы по сравнению с известными бифункциональными хелатами. В некоторых вариантах осуществления, такое снижение радиоактивности является результатом клиренса побочных продуктов катаболизма/метаболизма без воздействия на другие свойства *in vitro* и *in vivo*, такие как специфичность связывания (связывание *in vitro*), удержание в клетках и поглощение опухолями *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, предлагаемые соединения позволяют достичь пониженной радиоактивности в организме человека, сохраняя при этом целевую активность.

Определения

[069] В настоящем документе термин «связывать» или «связывание» таргетного фрагмента означает по меньшей мере временное взаимодействие или ассоциацию с или к молекуле-мишени, *например*, к EGFRvIII человека и/или мутационному варианту EGFRvIII, *например*, как описано в настоящем документе.

[070] Термин «бифункциональный хелат», используемый в настоящем документе, относится к соединению, которое содержит хелат, линкер и поперечно-сшивающую группу. *См., например, ФИГ. 1А.* «Поперечно-сшивающая группа» представляет собой реакционноспособную группу, которая способна соединять две или несколько молекул, например, соединять бифункциональный хелат и таргетный фрагмент, посредством ковалентной связи.

[071] Термин «бифункциональный конъюгат», используемый в настоящем документе, относится к соединению, которое содержит его хелат или металлокомплекс, линкер и таргетный фрагмент, *например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. *См., например, ФИГ. 1В.*

[072] Термин «рак», используемый в настоящем документе, относится к любому раку, вызванному пролиферацией злокачественных неопластических клеток, такому как опухоли, новообразования, карциномы, саркомы, лейкозы и лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, рак по настоящему изобретению включает клетки (*например*, опухолевые клетки), экспрессирующие EGFRvIII, такие как, но не ограничиваясь ими, мультиформная глиобластома и карцинома.

[073] Термин «хелат», используемый в настоящем документе, относится к органическому соединению или его части, которое может быть связано с центральным атомом металла или радиометалла в двух или нескольких точках.

[074] Термин «конъюгат», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, которая содержит хелатную группу или ее металлокомплекс, линкерную группу, и которая необязательно содержит таргетный фрагмент, *например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[075] В настоящем документе, если не указано иное, фраза «константная область», когда она используется по отношению к антителу или его фрагменту (например, константная область IgG1, IgG2 или IgG4), предназначена для охвата обеих константных областей дикого типа и вариантов (например, константных областей, имеющих по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью константной области дикого типа.

[076] Подразумевается, что термин «соединение», используемый в настоящем документе, включает все стереоизомеры, геометрические изомеры и таутомеры изображенных структур.

[077] Соединения, перечисленные или описанные в настоящем документе, могут быть асимметричными (*например*, иметь один или несколько стереоцентров). Подразумеваются все стереоизомеры, такие как энантиомеры и диастереомеры, если не указано иное. Соединения, обсуждаемые в настоящем изобретении, которые содержат асимметрично замещенные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активных или рацемических формах. В данной области техники известны способы получения оптически активных форм из оптически активных исходных материалов, например, путем разделения рацемических смесей или путем стереоселективного синтеза.

[078] Используемый в настоящем документе термин «детектирующий агент» относится к молекуле или атому, которые можно использовать при диагностике заболевания путем локации клеток, содержащих антиген. В данной области техники известны различные способы мечения полипептидов детектирующими агентами. Примеры детектирующих агентов включают, но не ограничены ими, радиоизотопы и радионуклиды, красители (например, комплекс биотин-стрептавидин), контрастные агенты, люминесцентные агенты (например, изотиоцианат флуоресцеина или FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов, цианин и красители ближней ИК-области спектра) и магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния.

[079] Используемый в настоящем документе термин «радионуклид» относится к атому, способному подвергаться радиоактивному распаду (*например*, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{89}Zr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{229}Th , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{201}Tl).

Термины «радиоактивный нуклид», «радиоизотоп» или «радиоактивный изотоп» также могут использоваться для описания радионуклида. Радионуклиды можно использовать в качестве детектирующих агентов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, радионуклид может представлять собой альфа-излучающий радионуклид.

[080] Термин «эффективное количество» агента (*например*, любого из вышеуказанных конъюгатов), используемый в настоящем документе, означает количество, достаточное для достижения полезных или желаемых результатов, таких как клинические результаты, и, как таковое, «эффективное количество» зависит от контекста, в котором оно применяется. Например, при терапевтическом применении, «эффективное количество» может представлять собой количество, достаточное для лечения или, по меньшей мере, частичной остановки симптомов нарушения и его осложнений и/или для существенного улучшения по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или медицинским состоянием. Например, при лечении рака, агент или соединение, которое уменьшает, предотвращает, задерживает, подавляет или останавливает любой симптом заболевания или состояния, будет терапевтически эффективным. Терапевтически эффективное количество агента или соединения не требуется для лечения заболевания или состояния, но может, например, обеспечить лечение заболевания или состояния, так что начало заболевания или состояния задерживается, затрудняется или предотвращается, например улучшение симптомов заболевания или состояния или изменение течения заболевания или состояния. Например, заболевание или состояние может стать менее тяжелым и/или выздоровление индивидуума ускорится. Эффективное количество можно вводить путем введения одной дозы или нескольких (*например*, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или по меньшей мере шести) доз.

[081] Термин «иммуноконъюгат», используемый в настоящем документе, относится к конъюгату, который включает таргетный фрагмент, такой как антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), нанотело, аффитело или консенсусную последовательность из домена фибронектина III типа. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат содержит в среднем по меньшей мере 0,10 конъюгатов на таргетный фрагмент (*например*, в среднем по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 конъюгатов на таргетный фрагмент).

[082] Термин «радиоконъюгат», используемый в настоящем документе, относится к любому конъюгату, который включает радиоизотоп или радионуклид, такой как любой из радиоизотопов или радионуклидов, описанных в настоящем документе.

[083] Термин «радиоиммуноконъюгат», используемый в настоящем документе, относится к любому иммуноконъюгату, который включает радиоизотоп или радионуклид, такой как любой из радиоизотопов или радионуклидов, описанных в настоящем документе. Радиоиммуноконъюгат, предложенный в настоящем изобретении, обычно относится к бифункциональному конъюгату, который содержит металлокомплекс,

образованный из радиоизотопа или радионуклида.

[084] Термин «радиоиммунотерапия», используемый в настоящем документе, относится к способу применения радиоиммуноконъюгата для получения терапевтического эффекта. В некоторых вариантах осуществления, радиоиммунотерапия может включать введение радиоиммуноконъюгата субъекту, нуждающемуся в этом, где введение радиоиммуноконъюгата вызывает терапевтический эффект у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, радиоиммунотерапия может включать введение радиоиммуноконъюгата в клетку, где введение радиоиммуноконъюгата убивает клетку. Когда радиоиммунотерапия включает селективное уничтожение клетки, в некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой раковую клетку у субъекта, больного раком.

[085] Термин «фармацевтическая композиция», используемый в настоящем документе, представляет собой композицию, содержащую радиоиммуноконъюгат, описанный в настоящем документе, составленный с фармацевтически приемлемым эксципиентом. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию производят или продают с одобрения государственного регулирующего органа как часть терапевтической схемы лечения заболевания у млекопитающего. Фармацевтические композиции могут быть составлены, например, для перорального введения в стандартной дозированной форме (*например*, таблетка, капсула, капсула, желатиновая капсула или сироп); для местного введения (*например*, в виде крема, геля, лосьона или мази); для внутривенного введения (*например*, в виде стерильного раствора, не содержащего эмболы в виде частиц, и в системе растворителей, подходящей для внутривенного применения); или в любом другом составе, описанном в настоящем документе.

[086] Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент», используемый в настоящем документе, относится к любому ингредиенту, отличному от соединений, описанных в настоящем документе (*например*, носителю, способному суспендировать или растворять активное соединение) и обладающему свойствами быть не токсичным и не вызывать воспаление у пациента. Эксципиенты могут включать, *например*: антиадгезивы, антиоксиданты, связующие агенты, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, красители (пигменты), смягчающие агенты, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, вкусовые добавки, ароматизаторы, глиданты (усилители текучести), смазывающие агенты, консерванты, типографские краски, радиопротекторы, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие агенты, подсластители или гидратационная вода. Примеры эксципиентов включают, но не ограничены ими: аскорбиновую кислоту, гистидин, фосфатный буфер, бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), карбонат кальция, фосфат кальция (двуосновный), стеарат кальция, кроскармеллозу, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль,

поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, карбоксиметилцеллюлозу натрия, цитрат натрия, гликолят натрия крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

[087] Термин «фармацевтически приемлемая соль», как он используется в настоящем документе, представляет собой те соли описанных в настоящем документе соединений, которые, в пределах здравого медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения или аллергической реакции. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, фармацевтически приемлемые соли описаны в: Berge et al., *J. Pharmaceutical Sciences* 66:1-19, 1977 и в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use* (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Соли могут быть получены *in situ* во время окончательного выделения и очистки описанных в настоящем документе соединений или отдельно путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой.

[088] Соединения по изобретению могут иметь ионизируемые группы, чтобы их можно было получать в виде фармацевтически приемлемых солей. Эти соли могут быть кислотно-аддитивными солями, включающими неорганические или органические кислоты, или в случае кислотных форм соединений по изобретению, соли могут быть получены из неорганических или органических оснований. Часто соединения получают или используют в виде фармацевтически приемлемых солей, полученных как продукты присоединения фармацевтически приемлемых кислот или оснований. Подходящие фармацевтически приемлемые кислоты и основания хорошо известны в данной области техники, например, хлористо-водородная, серная, бромисто-водородная, уксусная, молочная, лимонная или винная кислоты для образования кислотно-аддитивных солей, а также гидроксид калия, гидроксид натрия, гидроксид аммония, кофеин, различные амины для образования основных солей. Способы получения соответствующих солей хорошо известны в данной области техники.

[089] Типовые кислотно-аддитивные соли включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат, валерат, среди прочих. Типовые соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций и магний, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония

и амина, включая, но не ограничиваясь ими, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин и этиламин.

[090] Термин «полипептид», используемый в настоящем документе, относится к цепи, состоящей по меньшей мере из двух аминокислот, прикрепленных друг к другу пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления, полипептид может включать по меньшей мере 3-5 аминокислот, каждая из которых присоединена к другим посредством по меньшей мере одной пептидной связи. Специалисты в данной области техники поймут, что полипептиды могут включать одну или несколько аминокислот «не природного происхождения» или других соединений, которые, тем не менее, способны интегрироваться в полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления, полипептид может быть гликозилирован, *например*, полипептид может содержать один или несколько ковалентно связанных сахарных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, один «полипептид» (*например*, полипептид антитела) может содержать две или несколько отдельных полипептидных цепей, которые в некоторых случаях могут быть связаны друг с другом, например, одной или несколькими дисульфидными связями или другими способами.

[091] Под «субъектом» подразумевается человек или животное, отличное от человека (*например*, млекопитающее).

[092] Под «идентичностью по существу» или «идентичной по существу» подразумевается полипептидная последовательность, которая имеет ту же полипептидную последовательность, соответственно, что и эталонная последовательность, или имеет указанную долю аминокислотных остатков, соответственно, которые являются одинаковыми в соответствующем месте внутри эталонной последовательности, когда две последовательности оптимально выровнены. Например, аминокислотная последовательность, которая «по существу идентична» эталонной последовательности, имеет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность эталонной аминокислотной последовательности. Для полипептидов, длина последовательностей сравнения обычно составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 смежных аминокислот (*например*, полноразмерная последовательность). Идентичность последовательностей можно измерить с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей с настройками по умолчанию (*например*, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Такое программное обеспечение может сопоставлять сходные последовательности, присваивая степени гомологии различным заменам, делециям и другим модификациям.

[093] В настоящем документе и, как хорошо понятно в данной области техники, «лечить» состояние или «лечение» состояния (*например*, состояний, описанных в настоящем документе, таких как рак) представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, таких как клинические результаты. Полезные или желаемые

результаты могут включать, но не ограничены ими, облегчение или улучшение одного или нескольких симптомов или состояний; уменьшение степени заболевания, нарушения или состояния; стабилизированное (*m.e.* не ухудшающееся) состояние заболевания, нарушения или состояния; профилактику распространения заболевания, нарушения или состояния; задержку или замедление прогрессирования заболевания, нарушения или состояния; улучшение или паллиативное облегчение заболевания, нарушения или состояния; и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или не обнаруживаемую. «Паллиативное облегчение» заболевания, нарушения или состояния означает, что степень и/или нежелательные клинические проявления заболевания, нарушения или состояния уменьшаются и/или временной ход прогрессирования замедляется или удлиняется по сравнению со степенью или временем при отсутствии лечения.

[094] Используемый в настоящем документе термин «примерно» или «приблизительно», когда он используется по отношению к количественному значению, включает в себя само указанное количественное значение, если специально не указано иное. Используемый в настоящем документе термин «примерно» или «приблизительно» относится к отклонению $\pm 10\%$ от указанного количественного значения, если иное не указано или не выведено из контекста.

[095] Используемый в настоящем документе термин «таргетный фрагмент» относится к любой молекуле или любой части молекулы, которая способна связываться с заданной мишенью. Термин «таргетный фрагмент EGFRvIII» относится к таргетному фрагменту, который способен связываться с молекулой EGFRvIII, *например*, с EGFRvIII человека.

[096] В настоящем документе, если не указано иное, «EGFR» относится к EGFR человека. EGFR человека означает полноразмерный белок, соответствующий UniProt P00533, или его фрагмент или вариант. EGFR также известен как рецептор эпидермального фактора роста, ErbB-1 и HER1. В некоторых конкретных вариантах осуществления, используют EGFR видов, отличных от человека, *например*, EGFR мыши. Термины «wt EGFR», «WT EGFR», «EGFR WT» и «EGFR wt» используются взаимозаменяемо и относятся к EGFR дикого типа.

[097] Используемый в настоящем документе, «EGFRvIII» или «vIII» относится к варианту EGFR, полученному в результате делеции экзонов 2-7 кодирующей последовательности или ее фрагмента внутри рамки считывания. EGFRvIII также известен как вариант III рецептора эпидермального фактора роста, de2-7EGFR и ΔEGFR.

[098] Используемый в настоящем документе термин «фрагмент», когда он используется для обозначения фрагмента EGFRvIII, относится к усеченному на N-конце и/или C-конце EGFRvIII или белковым доменам EGFRvIII. Если не указано иное, фрагменты EGFRvIII, используемые в соответствии с описанными в настоящем документе вариантами осуществления, сохраняют способность полноразмерного EGFRvIII распознаваться и/или связываться с таргетным фрагментом EGFRvIII, как описано в

настоящем описании. В качестве иллюстративного примера, фрагмент может представлять собой внеклеточный домен EGFRvIII, такой как аминокислотные остатки 1-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:119), аминокислотные остатки 1-18 EGFRvIII (SEQ ID NO:125) или аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:6).

[009] Использование терминов «а», «an», «the» и подобных им референтов в контексте описания изобретения (особенно, в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в настоящем документе или явно не противоречит контексту.

[0100] Если специально не указано и не очевидно из контекста, используемый в настоящем документе термин «или» понимается как включающий и охватывает как «или», так и «и».

[0101] Термин «и/или», используемый в настоящем документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из указанных признаков или компонентов с или без другого.

[0102] Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» следует истолковывать как открытые термины (т. е. означающие «включающий, но не ограниченный ими»), если не указано иное. Термин «состоящий из» следует истолковывать как закрытый.

[0103] Используемый в настоящем документе термин «нативный» по отношению к белку, такому как EGFRvIII или EGFR, относится к природной конформации белка и включает белки, которые правильно свернуты и/или функциональны.

[0104] Используемый в настоящем документе термин «денатурированный» по отношению к белку, такому как EGFRvIII или EGFR, относится к белку, который потерял свою природную конформацию и может повлечь за собой, например, потерю третичной и вторичной структуры.

[0105] Используемое в настоящем документе выражение «пептид, содержащий или состоящий из фрагмента EGFRvIII» означает, что пептид может содержать часть, отличную от фрагмента EGFRvIII, или что он состоит из фрагмента EGFRvIII.

[0106] Используемый в настоящем документе таргетный фрагмент (*например*, антитело или антигенсвязывающий домен) «связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки» означает, что указанные аминокислотные остатки либо являются частью эпитопа, либо необходимы для связывания таргетного фрагмента.

[0107] В настоящем документе, при использовании в отношении таргетного фрагмента (*например*, антитела или антигенсвязывающего домена) термин «не способен связываться» с пептидом или белком означает, что таргетный фрагмент (*например*, антитело или антигенсвязывающий фрагмент) а) не связывается в значительной степени с пептидом или белком при рекомбинантной экспрессии или в клетках, б) не связывается с пептидом или белком с обнаруживаемой аффинностью, с) обладает свойством связывания, аналогичным свойствам молекулы отрицательного контроля, d) не связывается специфически с пептидом или белком, или e) связывается со значением от 0%

до 15%, по данным экспериментов по проточной цитометрии, известных в данной области техники.

[0108] Используемый в настоящем документе термин «аутологичный» относится к материалам, полученным от одного и того же индивидуума.

[0109] Используемый в настоящем документе, термин «антигенсвязывающий домен» относится к домену антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который обеспечивает специфическое связывание с антигеном.

[0110] Используемый в настоящем документе, термин «антитело» охватывает моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело, антитело человека, однодоменное антитело (например, V_{HH}, V_H, V_L, нанотело или любое однодоменное антитело верблюдовых или ламы), мультиспецифическое антитело (например, биспецифические антитела) и т.д. Термин «антитело» охватывает молекулы, которые имеют формат, аналогичный встречающимся в природе (например, IgG человека и т.д.). Термин «антитело», также называемый в данной области техники «иммуноглобулин» (Ig), используемый в настоящем документе, относится к белку, сконструированному из парных тяжелых и легких полипептидных цепей; существуют различные изоформы Ig, включая IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Когда антитело свернуто правильно, каждая цепь складывается в ряд отдельных глобулярных доменов, соединенных более линейными полипептидными последовательностями. Например, легкая цепь иммуноглобулина складывается в переменный (V_L) и константный (C_L) домен, тогда как тяжелая цепь складывается в переменный (V_H) и три константных (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) домена. Взаимодействие переменных доменов тяжелой и легкой цепи (V_H и V_L) приводит к образованию антигенсвязывающей области (F_v). Каждый домен имеет хорошо устоявшуюся структуру, знакомую специалистам в данной области техники.

[0111] Обычно антитело состоит из пары двух легких цепей и двух тяжелых цепей. Существуют различные изоформы антител, включая IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG человека далее делятся на четыре отдельные подгруппы, а именно; IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Терапевтические антитела обычно разрабатываются как IgG1, IgG2 или IgG4.

[0112] В типовом варианте осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать, например, константную область IgG1 человека или ее фрагмент. В другом типовом варианте осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать, например, константную область IgG2 человека или ее фрагмент. В другом типовом варианте осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать, например, константную область IgG4 человека или ее фрагмент. Также рассматриваются константные области других подтипов антител.

[0113] Каждая легкая цепь и тяжелая цепь изоформ антитела IgG человека содержит переменную область, имеющую 3 гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR). CDR легкой цепи

идентифицированы в настоящем документе как CDRL1 или L1, CDRL2 или L2 и CDRL3 или L3. CDR тяжелой цепи идентифицированы в настоящем документе как CDRH1 или H1, CDRH2 или H2 и CDRH3 или H3. Определяющие комплементарность области фланкированы каркасными областями (FR) в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Варибельные области легкой и тяжелой цепи ответственны за связывание антигена-мишени и, следовательно, могут демонстрировать значительное разнообразие последовательностей между антителами. Константные области демонстрируют меньшее разнообразие последовательностей и отвечают за связывание ряда белков природного происхождения, вызывающих важные биохимические события. Варибельная область антитела содержит антигенсвязывающие детерминанты молекулы и, таким образом, определяет специфичность антитела к его антигену-мишени. Большая часть варибельности последовательностей происходит в CDR, которые объединяются, образуя сайт связывания антигена, и способствуют связыванию и распознаванию антигенной детерминанты. Каркасные области могут играть роль в правильном расположении и выравнивании CDR в трех измерениях для оптимального связывания антигена. Специфичность и аффинность антитела к своему антигену определяются структурой гиперварибельных областей, а также их размером, формой и химией поверхности, которую они презентуют антигену. Существуют различные схемы идентификации областей гиперварибельности, две наиболее распространенные из которых представляют собой схемы Kabat и Chothia и Lesk. Kabat et al (1991) определяют «определяющие комплементарность области» (CDR) на основе варибельности последовательностей антигенсвязывающих областей доменов VH и VL. Chothia и Lesk (1987) определяют «гиперварибельные петли» (H или L) на основании расположения областей структурных петель в доменах VH и VL. Эти отдельные схемы определяют области CDR и гиперварибельной петли, которые являются соседними или перекрывающимися, специалисты в области антител часто используют термины «CDR» и «гиперварибельная петля» как взаимозаменяемые, и они могут быть использованы в настоящем документе таким образом. CDR/петли идентифицированы в настоящем документе в соответствии со схемой Kabat, за исключением петель CDRH1, которые обозначены путем объединения определений Kabat и Chothia.

[0114] Технология рекомбинантной ДНК в настоящее время позволяет создавать различные форматы антител, такие как одноцепочечные антитела (*например*, однодоменные), диантитела, минитела, нанотела и подобные, которые включены в настоящее изобретение.

[0115] «Антигенсвязывающий фрагмент», как указано в настоящем документе, может включать любой подходящий антигенсвязывающий фрагмент, известный в данной области техники. Антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой фрагмент природного происхождения или может быть получен путем манипуляции с антителом природного происхождения или с использованием рекомбинантных способов. Например, фрагмент антитела может включать, но не ограничен ими, Fv, одноцепочечный Fv (scFv;

молекула, состоящая из VL и VH, связанных с пептидным линкером), Fab, F(ab')₂, однодоменное антитело (sdAb; фрагмент, состоящий из одной VL или VH) и мультивалентные презентации любого из них. Фрагментам антител, таким как только что описанные, могут потребоваться линкерные последовательности, дисульфидные связи или ковалентные связи другого типа для связывания различных частей фрагментов; специалисты в данной области техники будут знакомы с требованиями различных типов фрагментов и различных подходов, и различными подходами к их построению.

[0116] Антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению охватывают молекулы, имеющие сайт связывания антигена, содержащий аминокислотные остатки, которые обеспечивают специфическое связывание с антигеном (например, один или несколько CDR).

[0117] Типовые варианты осуществления антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, таким образом, включают, без ограничения, (i) Fab фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; (ii) F(ab')₂ фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1}; (iv) Fv фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из V_H домена; и (vi) выделенную определяющую комплементарную область (CDR), например, V_H CDR3.

[0118] Конкретные варианты осуществления антигенсвязывающих фрагментов могут включать, например, scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

[0119] Термин «гуманизованное антитело» охватывает полностью гуманизованное антитело (*m. e.* каркасные области на 100% гуманизованы) и частично гуманизованное антитело (*например*, по меньшей мере одна переменная область содержит одну или несколько аминокислот антитела человека, в то время как другие аминокислоты представляют собой аминокислоты не человеческого исходного антитела). Обычно «гуманизованное антитело» содержит CDR не человеческого исходного антитела (*например*, мыши, крысы, кролика, примата, отличного от человека, и т. д.) и каркасы, которые идентичны каркасам антитела человека природного происхождения или консенсусного антитела человека. В таком случае, эти «гуманизованные антитела» характеризуются как полностью гуманизованные. «Гуманизованное антитело» также может содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые не соответствуют заменам антитела человека или консенсусного антитела человека. Такие замены включают, например, обратные мутации (*например*, повторное введение нечеловеческих аминокислот), которые могут сохранять характеристики антитела (*например*, аффинность, специфичность и т.д.). Такие замены обычно находятся в каркасной области. «Гуманизованное антитело» обычно также содержит константную область (Fc), которая обычно является областью антитела человека. Обычно константная область «гуманизованного антитела» идентична константной области антитела человека. Гуманизованное антитело можно получить

путем прививки CDR (Tsurushita et al, 2005; Jones et al, 1986; Tempest et al, 1991; Riechmann et al, 1988; Queen et al, 1989). Такое антитело считается полностью гуманизированным.

[0120] Термин «химерное антитело» относится к антителу, имеющему константную область происхождения, отличного от происхождения исходного антитела. Термин «химерное антитело» охватывает антитела, имеющие константную область человека. Обычно «химерное антитело» состоит из переменных областей, происходящих от антитела мыши, и константной области человека.

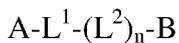
[0121] Термин «гибридное антитело» относится к антителу, содержащему одну из переменных областей тяжелой или легкой цепи (его тяжелую или легкую цепь) от антитела определенного типа (например, гуманизованного), в то время как другая переменная область тяжелой или легкой цепи (тяжелая или легкая цепь) принадлежит другому типу (например, мыши, химерному).

[0122] Антитела и/или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут происходить, например, от мыши, крысы или любого другого млекопитающего или из других источников, например, с помощью технологий рекомбинантной ДНК. Антитела или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут включать, например, синтетическое антитело, антитело не природного происхождения, антитело, полученное после иммунизации млекопитающего, отличного от человека, и т. д.

[0123] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть выделены и/или по существу очищены.

Соединения, например радиоиммуноконъюгаты

[0124] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к соединениям, например, радиоиммуноконъюгатам, имеющим следующую структуру, или их фармацевтически приемлемым солям:



Формула I

где

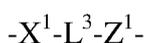
A представляет собой хелатирующий фрагмент или его металлокомплекс,

B представляет собой целевую группу, которая способна связываться с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), где EGFRvIII содержит пептид, состоящий из аминокислотных остатков 1-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:119);

L^1 представляет собой связь, C=O, C=S, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

n представляет собой целое число от 1 до 5 (включительно); и

L^2 каждый независимо имеет структуру Формулы II:



Формула II

где

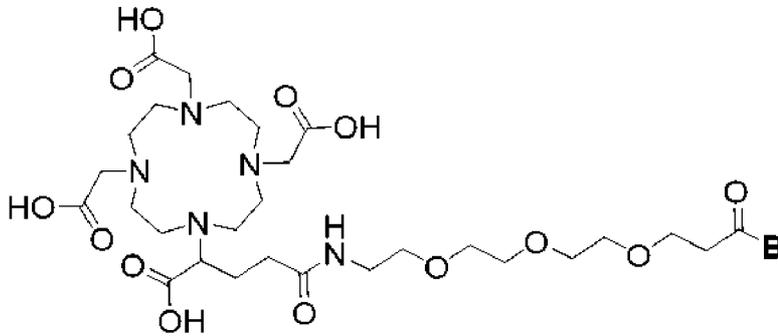
X^1 представляет собой $-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-*$, $-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-*$, $-OC(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)O-*$, $-NR^1C(O)NR^1-*$, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$, $-O-*$ или $-NR^1-*$; где «*» указывает точку присоединения к L^3 , и R^1 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил или необязательно замещенный арил или гетероарил;

L^3 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_{50} алкил или необязательно замещенный C_1-C_{50} гетероалкил; и

Z^1 представляет собой $-CH_2-#$, $-C(O)-#$, $-C(S)-#$, $-OC(O)-#$, $-C(O)O-#$, $-NR^2C(O)-#$, $-C(O)NR^2-#$ или $-NR^2-#$, где «#» указывает точку присоединения к B , и R^2 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

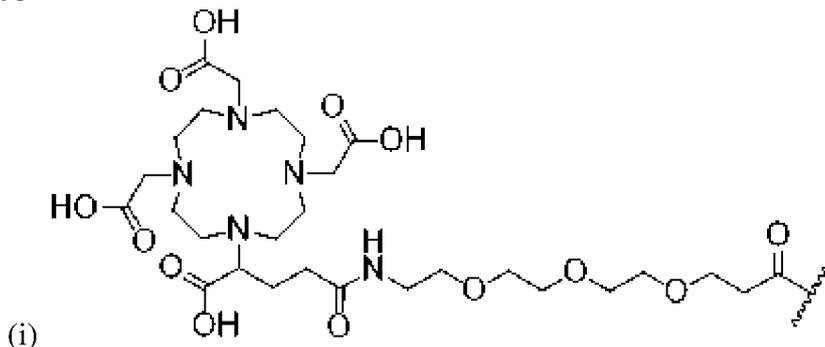
[0125] Типовые заместители алкила, гетероалкила, арила или гетероарила включают, но не ограничены ими, галоген (например, F, Cl, Br, I), OH, CN, нитро, амино, C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, C_{3-8} циклоалкил, C_{1-6} гетероалкил, C_{1-6} гетероциклоалкил, галогеналкил (например, CF_3), алкокси (например, OCH_3), алкиламино (например, NH_2CH_3), сульфонил, арил и гетероарил.

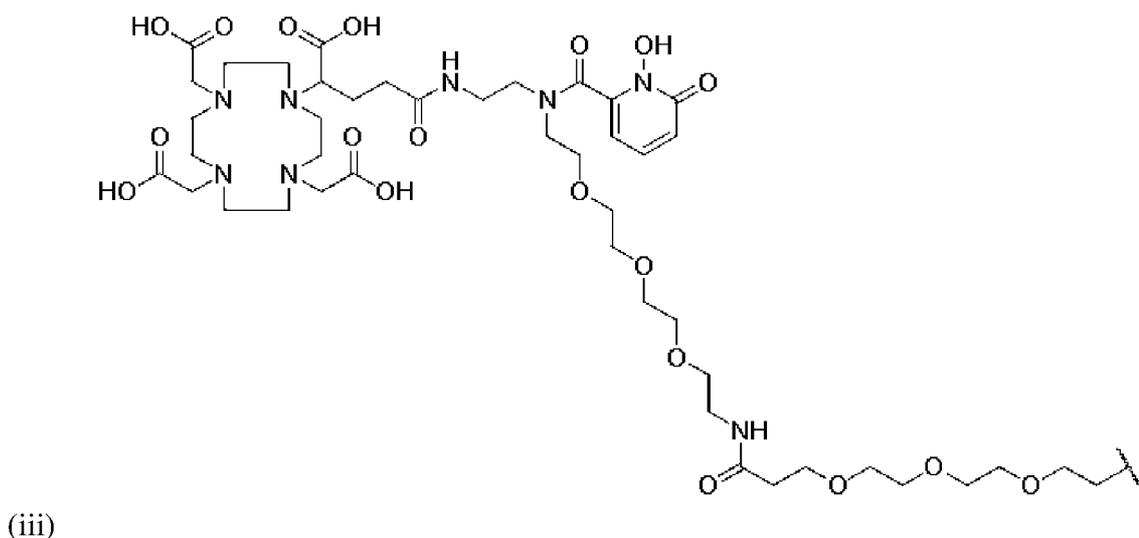
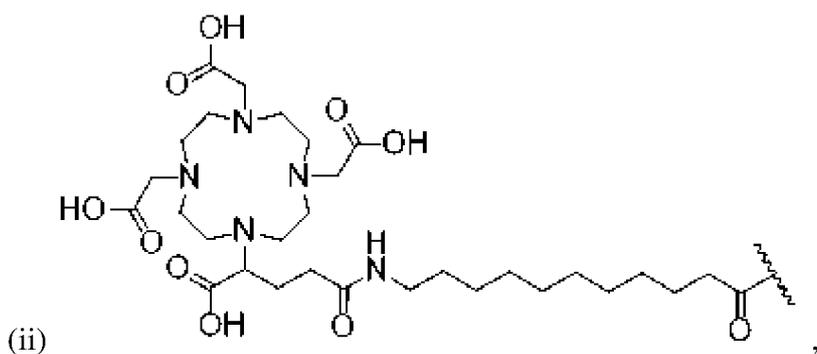
[0126] В некоторых вариантах осуществления, соединение имеет или содержит структуру, показанную ниже:



где B представляет собой таргетный фрагмент EGFRvIII (например, антитело к EGFRvIII или его антигенсвязывающий фрагмент).

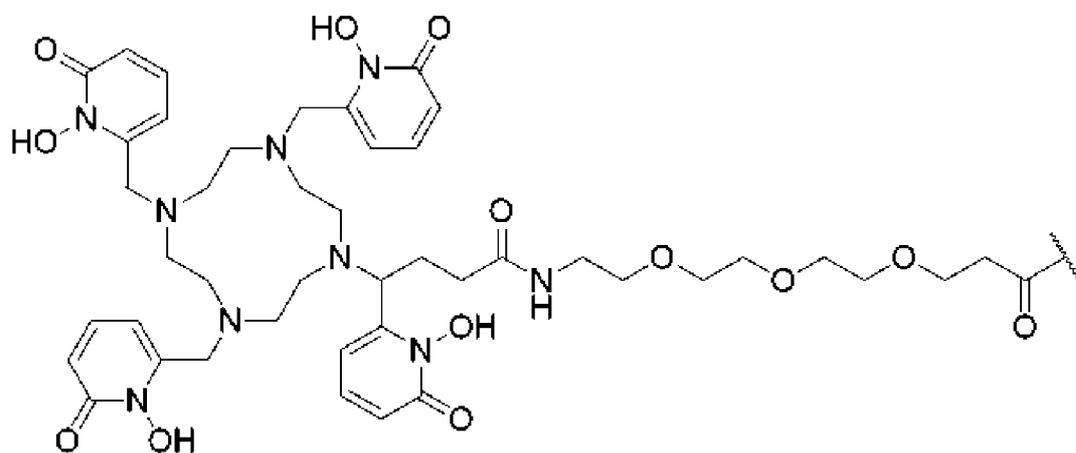
[0127] В некоторых вариантах осуществления A-L- содержит одну из следующих структур или ее металлокомплекс:





или

(iv)



[0128] В некоторых вариантах осуществления, как дополнительно описано в настоящем документе, соединение (например, радиоиммуноконъюгат) содержит хелатирующий фрагмент или его металлокомплекс, где металлокомплекс может содержать радионуклид. В некоторых таких соединениях, среднее соотношение или медианное соотношение хелатного фрагмента к таргетному фрагменту EGFRvIII составляет восемь или меньше, семь или меньше, шесть или меньше, пять или меньше, четыре или меньше, три или меньше, два или меньше или примерно единицу. В

некоторых соединениях, среднее соотношение или медианное отношение хелатного фрагмента к таргетному фрагменту EGFRvIII составляет примерно единицу.

[0129] В некоторых вариантах осуществления, после введения радиоиммуноконъюгата млекопитающему, доля радиации (от общего количества введенной радиации), которая выводится кишечным путем, почками или обоими способами, превышает долю радиации, выведенной сопоставимым млекопитающим, которому был введен эталонный радиоиммуноконъюгат. Под «эталонным иммуноконъюгатом» подразумевается известный радиоиммуноконъюгат, который отличается от описанного в настоящем документе радиоиммуноконъюгата по меньшей мере тем, что (1) имеет другой линкер; (2) имеет таргетный фрагмент другого размера и/или (3) не имеет таргетный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, эталонный радиоиммуноконъюгат выбран из группы, состоящей из [^{90}Y]-ибритумомаба тиуксетина (Зевалин (^{90}Y)) и [^{111}In]-ибритумомаба тиуксетина (Зевалин (^{111}In)).

[0130] В некоторых вариантах осуществления, доля радиации, выведенной данным путем или набором путей, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% больше, чем доля радиации, выведенной тем(и) же путем(ями) сопоставимым млекопитающим, которому был введен эталонный радиоиммуноконъюгат. В некоторых вариантах осуществления, доля выведенной радиации по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раз, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз больше, чем доля радиации, выделенная сопоставимым млекопитающим, которому был введен эталонный радиоиммуноконъюгат. Степень выведения можно измерить способами, известными в данной области техники, *например*, путем измерения радиоактивности в моче и/или фекалиях и/или путем измерения общей радиоактивности тела за определенный период времени. См. также, *например*, международную патентную публикацию WO 2018/024869.

[0131] В некоторых вариантах осуществления, степень выведения измеряют в период времени, составляющий по меньшей мере или примерно 12 часов после введения, по меньшей мере или примерно 24 часа после введения, по меньшей мере или примерно 2 дня после введения, по меньшей мере или примерно 3 дня после введения, по меньшей мере или примерно 4 дня после введения, по меньшей мере или примерно 5 дней после введения, по меньшей мере или примерно 6 дней после введения или по меньшей мере или примерно 7 дней после введения.

[0132] В некоторых вариантах осуществления, после того, как соединение (например, радиоиммуноконъюгат) было введено млекопитающему, соединение

(например, радиоиммуноконъюгат) демонстрирует сниженные нецелевые эффекты связывания (*например*, токсичность) по сравнению с эталонным соединением (*например*, эталонным конъюгатом, *например*, эталонным иммуноконъюгатом, таким как эталонный радиоиммуноконъюгат). В некоторых вариантах осуществления, этот сниженный эффект нецелевого связывания является особенностью соединения (*например*, радиоиммуноконъюгата), которое также демонстрирует более высокую скорость выведения, как описано в настоящем документе.

Таргетные фрагменты

[0133] Таргетные фрагменты включают любую молекулу или любую часть молекулы, которая способна связываться (*например*, способна специфически связываться, специфически связывается и т.д.) с заданной мишенью, *например*, EGFRvIII. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент содержит белок или полипептид. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент выбран из группы, состоящей из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, нанотел, аффител и консенсусных последовательностей доменов фибронектина III типа (*например*, центринов или аднектинов). В некоторых вариантах осуществления, фрагмент представляет собой как таргетный, так и терапевтический фрагмент, *т.е.* фрагмент способен связываться с заданной мишенью, а также обеспечивает терапевтический эффект. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент содержит малую молекулу.

[0134] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент имеет молекулярную массу по меньшей мере 50 кДа, по меньшей мере 75 кДа, по меньшей мере 100 кДа, по меньшей мере 125 кДа, по меньшей мере 150 кДа, по меньшей мере 175 кДа, по меньшей мере 200 кДа, по меньшей мере 225 кДа, по меньшей мере 250 кДа, по меньшей мере 275 кДа или по меньшей мере 300 кДа.

[0135] Обычно таргетный фрагмент способен связываться с EGFRvIII или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент способен связываться с EGFRvIII человека или его фрагментом.

[0136] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент способен специфически связываться с EGFRvIII (*например*, способен связываться с EGFRvIII, демонстрируя при этом сравнительно небольшое или отсутствие связывания с wt EGFR).

[0137] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент способен связываться с внеклеточной областью EGFRvIII, *например*, с доменом III (L2) EGFRvIII, доменом IV (CRII) EGFRvIII, аминокислотными остатками 1-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:119), аминокислотными остатками 1-18 EGFRvIII (SEQ ID NO:125) или аминокислотными остаткам 15-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:6).

[0138] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент не связывается с EGFR дикого типа с обнаруживаемой аффинностью. Под «обнаружимой аффинностью» обычно подразумевают, что способность связывания между таргетным фрагментом и его мишенью, о которой свидетельствуют значения K_D , EC_{50} или IC_{50} , составляет самое большее примерно 10^5 М или ниже. Аффинность связывания, о которой свидетельствуют

значения K_D , EC_{50} или IC_{50} выше 10^5 M, обычно больше не поддается измерению обычными способами, такими как ELISA и проточная цитометрия, и поэтому имеет второстепенное значение.

[0139] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент ингибирует EGFRvIII. Под «ингибирует» подразумевается, что таргетный фрагмент по меньшей мере частично ингибирует одну или несколько функций EGFRvIII (*например*, EGFRvIII человека). В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент ухудшает передачу сигнала ниже EGFRvIII, *например*, приводит к подавлению роста EGFRvIII-положительных опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент блокирует связывание лиганда с EGFRvIII и/или димеризацию рецептора EGFRvIII.

[0140] Как правило, таргетный фрагмент по настоящему изобретению может быть способен связываться с пептидом, содержащим фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотных остатков 1-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:119). В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент способен связываться с аминокислотными остатками 1-18 EGFRvIII (SEQ ID NO:125). В некоторых других вариантах осуществления, таргетный фрагмент способен связывать аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:6).

[0141] Варианты осуществления таргетных фрагментов EGFRvIII, охватываемых настоящим изобретением, включают, например:

- таргетные фрагменты EGFRvIII, которые способны связываться с пептидом, содержащим фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотных остатков 1-18 EGFRvIII (SEQ ID NO:125);

- таргетные фрагменты EGFRvIII, которые способны связываться с пептидом, содержащим фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотных остатков 3-18 EGFRvIII (SEQ ID NO:129);

- таргетные фрагменты EGFRvIII, которые способны связываться с пептидом, содержащим фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотных остатков 15-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:6); или

- таргетные фрагменты EGFRvIII, которые способны связываться с пептидом, содержащим фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотных остатков 19-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:142).

[0142] Некоторые конкретные таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты), охватываемые настоящим изобретением, включают такие, которые не требуют присутствия аминокислотных остатков 1-2 EGFRvIII для связывания. В частности, рассматриваются таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты), которые способны связываться с одним или несколькими фрагментами EGFRvIII с аминокислотными остатками 19-76 (SEQ ID NO:138), аминокислотными остатками 19-62 (SEQ ID NO:139), аминокислотными остатками 19-49 (SEQ ID NO:140),

аминокислотными остатками 19-45 (SEQ ID NO:141), аминокислотными остатками 28-45 (SEQ ID NO:143), аминокислотными остатками 28-37 (SEQ ID NO:144), аминокислотными остатками 19-37 (SEQ ID NO:142), аминокислотными остатками 3-45 (SEQ ID NO:127), аминокислотными остатками 3-49 (SEQ ID NO:127), аминокислотными остатками 3-49 (SEQ ID NO:126), аминокислотными остатками 3-37 (SEQ ID NO:128), аминокислотными остатками 6-49 (SEQ ID NO:130), аминокислотными остатками 6-45 (SEQ ID NO:131), аминокислотными остатками 6-37 (SEQ ID NO:132), аминокислотными остатками 10-49 (SEQ ID NO:133), аминокислотными остатками 10-45 (SEQ ID NO:134), аминокислотными остатками 10-37 (SEQ ID NO:134), аминокислотными остатками 10-37 (SEQ ID NO:135), аминокислотными остатками 15-49 (SEQ ID NO:136), аминокислотными остатками 15-45 (SEQ ID NO:137) или аминокислотными остатками 15-37 (SEQ ID NO:6) EGFRvIII.

[0143] В некоторых вариантах осуществления, таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты), предложенные в настоящем документе и/или используемые в соответствии с настоящим изобретением, способны связываться с пептидом, содержащим фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотных остатков 3-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:128), такой как антитело F260-5G6 (также обозначаемое в настоящем документе как 5G6), F263-1A8 (также обозначаемое в настоящем документе как 1A8), F263-4B3 (также обозначаемое в настоящем документе как 4B3), F263-4E11 (также обозначаемое в настоящем документе как 4E11), F263-5D8 (также обозначаемое в настоящем документе как 5D8) и F265-9C9 (также обозначаемое в настоящем документе как 9C9).

[0144] В некоторых вариантах осуществления, таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или антигенсвязывающие фрагменты), предложенные в настоящем документе, способны связываться с пептидом, содержащим фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотных остатков 1-33 EGFRvIII (SEQ ID NO:124).

[0145] В некоторых вариантах осуществления, таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему документу специфично связываются с EGFRvIII (SEQ ID NO:5) и способны связываться с фрагментом EGFRvIII, выбранным из группы, состоящей из:

- a. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 15-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:6);
- b. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:119);
- c. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-62 EGFRvIII (SEQ ID NO:120);
- d. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:121);
- e. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:122);
- f. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-37 EGFRvIII (SEQ ID

NO:123);

g. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 3-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:126);

h. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 3-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:127);

i. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 3-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:128);

j. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 6-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:130);

k. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 6-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:131);

l. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 6-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:132);

m. фрагмент, состоящий из аминокислотных остатков с 10 по 49 EGFRvIII (SEQ ID NO:133);

n. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 10-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:134);

o. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 10-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:135);

p. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 15-49, EGFRvIII (SEQ ID NO:136);

q. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 15-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:137);

r. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 19-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:138);

s. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 19-62 EGFRvIII (SEQ ID NO:139);

t. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 19-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:140);

u. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 19-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:141);

v. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 19-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:142); и

w. любой комбинации указанных выше фрагментов,

где таргетный фрагмент EGFRvIII не способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:149.

[0146] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) по настоящему изобретению может быть способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной

последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:165 и их комбинации.

[0147] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:160.

[0148] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложены таргетные фрагменты (*например*, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты), которые специфически связываются с EGFRvIII (SEQ ID NO:5) и которые способны связываться с фрагментом EGFRvIII, выбранным из группы, состоящей из:

a. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 15-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:6);

b. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:119);

c. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:121);

d. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:123);

e. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 3-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:128); и

любой комбинации указанных выше фрагментов,

где таргетные фрагменты не могут связываться с пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:149.

[0149] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) по настоящему изобретению может быть способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:165 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:154. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:159.

[0150] В некоторых других вариантах осуществления, предложенные таргетные

фрагменты (*например*, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) специфически связываются с EGFRvIII (SEQ ID NO:5) и способны связываться с фрагментом EGFRvIII, выбранным из группы, состоящей из:

- a. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 15-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:6);
- b. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-76 EGFRvIII (SEQ ID NO:119);
- c. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-62 EGFRvIII (SEQ ID NO:120);
- d. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:121);
- e. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:122);
- f. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:123);
- g. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 3-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:126);
- h. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 3-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:127);
- i. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 3-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:128);
- j. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 6-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:130);
- k. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 6-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:131);
- l. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 6-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:132);
- m. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 10-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:133);
- n. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 10-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:134);
- o. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 10-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:135);
- p. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 15-49, EGFRvIII (SEQ ID NO:136);
- q. фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 15-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:137); и
- г. любой комбинации вышеуказанных фрагментов.

[0151] В некоторых вариантах осуществления, таргетные фрагменты (*например*, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) могут связываться с:

- a. фрагментом, состоящим из аминокислотных остатков 19-49 EGFRvIII (SEQ ID NO:140);
- b. фрагментом, состоящим из аминокислотных остатков 19-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:142);
- c. фрагментом, состоящим из аминокислотных остатков 28-45 EGFRvIII (SEQ ID NO:143);
- d. фрагментом, состоящим из аминокислотных остатков 28-37 EGFRvIII (SEQ ID NO:144);

или любой комбинацией вышеуказанных фрагментов.

[0152] В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:165 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, таргетный фрагмент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть способен связываться с пептидом, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:149.

[0153] Также предложены таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты), которые способны связывать эпитоп, содержащий или включающий аминокислотный остаток Cys20 в указанном пептиде. К ним относятся, например, антитела EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают EGFRvIII и/или пептид, содержащий фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:6, но не способны связывать пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SCVRAAGADSYEMEEDGVRKCKK (SEQ ID NO:149). Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают, например, антитела 4B3, 5D8 и 4E11.

[0154] Настоящее изобретение также конкретно охватывает таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты), которые способны связывать эпитоп, содержащий или включающий аминокислотный остаток Cys35 в указанном пептиде. К ним относятся, например, антитела EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают EGFRvIII и/или пептид, содержащий фрагмент EGFRvIII, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:6, но не способны связывать пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SCVRACGADSYEMEEDGVRKAKK (SEQ ID NO:163). Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают, например, антитела 4B3, 5D8, 9C9 и 4E11.

[0155] Кроме того, настоящее изобретение охватывает таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты), которые способны связывать эпитоп в пептиде, содержащем или включающем

аминокислотные остатки Cys20 и Cys35 в указанном пептиде. К ним относятся, например, антитела EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают EGFRvIII и/или пептид, содержащий или состоящий из фрагмента EGFRvIII, представленного в SEQ ID NO:6, но не способны связывать пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранную из SCVRAAGADSYEMEEDGVRKCKK (SEQ ID NO:149) или SCVRACGADSYEMEEDGVRKAKK (SEQ ID NO:163). Такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают, например, антитела 4B3, 5D8 и 4E11.

[0156] В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к аминокислотным остаткам Cys20 и/или Cys35, эпитоп, с которым связываются таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению или которые участвуют в их связывании, может дополнительно включать аминокислотные остатки Glu26, Asp30, Gly31 и/или Arg33. В некоторых вариантах осуществления, эпитоп может дополнительно включать Asp23 и/или Val32.

[0157] Например, в некоторых вариантах осуществления, таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению связываются с эпитопом, содержащим или включающим:

- Cys20, Glu26, Asp30, Gly31, Arg33 и Cys35; или
- Cys20, Asp23, Glu26, Asp30, Gly31, Val32, Arg33 и Cys35.

[0158] В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к аминокислотным остаткам Cys20 и/или Cys35, эпитоп, с которым связываются или в связывании которого участвуют таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты), может дополнительно включать Arg18 и/или Gly21. В некоторых вариантах осуществления, эпитоп может дополнительно включать Glu26 и/или Gly31.

[0159] Например, в некоторых вариантах осуществления, таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению связываются с эпитопом, содержащим или включающим:

- Arg18, Cys20, Gly21 и Cys35; или
- Arg18, Cys20, Gly21, Glu26, Gly31 и Cys35.

[0160] В некоторых других вариантах осуществления, таргетные фрагменты EGFRvIII (*например*, антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению связываются с эпитопом, содержащим или включающим:

- Cys16, Glu26, Gly31, Val32, Arg33, Lys34, Cys35 и Lys36; или
- Cys16, Cys20, Glu26, Asp30, Gly31, Val32, Arg33, Lys34, Cys35 и Lys36.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

[0161] Антитела обычно содержат две идентичные легкие полипептидные цепи и две идентичные тяжелые полипептидные цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Первый домен, расположенный на аминоконце каждой цепи, имеет вариабельную аминокислотную последовательность, что обеспечивает специфичность

связывания антитела для каждого отдельного антитела. Они известны как переменные тяжелые (VH) и переменные легкие (VL) области. Другие домены каждой цепи относительно инвариантны по аминокислотной последовательности и известны как константные тяжелые (CH) и константные легкие (CL) области. Легкие цепи обычно содержат одну переменную область (VL) и одну константную область (CL). Тяжелая цепь IgG включает переменную область (VH), первую константную область (CH1), шарнирную область, вторую константную область (CH2) и третью константную область (CH3). В антителах IgE и IgM, тяжелая цепь включает дополнительную константную область (CH4).

[0162] Антитела, подходящие для использования по настоящему изобретению, могут включать, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, антитела верблюдовых, химерные антитела, одноцепочечные Fv (scFv), Fv с дисульфидной связью (sdFv) и антиидиотипические (анти-Id) антитела и антигенсвязывающие фрагменты любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент гуманизированы. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются химерными. Антитела могут быть любого типа (*например*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

[0163] Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, используемый в настоящем документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают Fab-фрагмент, F(ab')₂ фрагмент, Fd фрагмент, Fv фрагмент, scFv фрагмент, dAb фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546) и выделенную определяющую комплементарность область (CDR). В некоторых вариантах осуществления, «антигенсвязывающий фрагмент» содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Эти фрагменты антител можно получить с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты можно подвергнуть скринингу полезности таким же образом, как и интактные антитела.

[0164] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть получены любым способом синтеза антител, известным в данной области техники (*см.*, *например*, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Химерные антитела могут быть получены с использованием способов, описанных, *например*, в Morrison, 1985, Science 229:1202, и гуманизированные антитела с использованием способов, описанных, *например*, в патенте США № 6,180,370.

[0165] Дополнительные антитела, описанные в настоящем документе,

представляют собой биспецифические антитела и поливалентные антитела, как описано, *например*, у Segal et al., J. Immunol. Methods 248:1-6 (2001); и Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991) или любую из описанных в настоящем документе молекул.

[0166] «Авимер» относится к мультимерному связывающему белку или пептиду, сконструированному с использованием, *например*, *in vitro* шафлинга экзонов и фагового дисплея. Множественные связывающие домены связаны, что приводит к большей аффинности и специфичности по сравнению с доменами иммуноглобина с одним эпитопом.

[0167] «Нанотела» представляют собой фрагменты антител, состоящие из одного мономерного переменного домена антитела. Нанотела также можно называть однодоменными антителами. Как и антитела, нанотела способны селективно связываться со специфическим антигеном. Нанотела могут представлять собой переменные домены тяжелой цепи или домены легкой цепи. Нанотела могут существовать в природе или быть продуктом биологической инженерии. Нанотела могут быть биологически сконструированы посредством сайт-направленного мутагенеза или мутагенного скрининга (*например*, фагового дисплея, дрожжевого дисплея, бактериального дисплея, мРНК дисплея, рибосомного дисплея). «Аффитела» представляют собой полипептиды или белки, сконструированные для связывания со специфическим антигеном. Таким образом, можно считать, что аффитела имитируют определенные функции антител.

[0168] Аффитела могут представлять собой сконструированные варианты В-домена в иммуноглобулин-связывающей области стафилококкового белка А. Аффитела могут представлять собой сконструированные варианты Z-домена, В-домена, который имеет более низкую аффинность к Fab области. Аффитела могут быть биологически сконструированы посредством сайт-направленного мутагенеза или мутагенного скрининга (*например*, фагового дисплея, дрожжевого дисплея, бактериального дисплея, мРНК дисплея, рибосомного дисплея).

[0169] Были созданы молекулы аффител, демонстрирующие специфическое связывание с различными белками (*например*, инсулином, фибриногеном, трансферрином, фактором некроза опухоли- α , IL-8, gp120, CD28, сывороточным альбумином человека, IgA, IgE, IgM, HER2 и EGFR), демонстрирующие аффинность (Kd) в диапазоне от мкм до пМ. «Диатела» представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими. См., *например*, Hudson et al., (2003). Одноцепочечные антитела представляют собой фрагменты антитела, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. Фрагменты антител могут быть получены различными методами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитический перевар интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными хозяевами (*например*, E.coli или фагом), как описано в настоящем документе.

[0170] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются мультиспецифическими, *например*

биспецифическими. Мультиспецифические антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) включают моноклональные антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере для двух разных сайтов.

[0171] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с EGFRvIII, могут представлять собой их антигенсвязывающий фрагмент антитела EGFRvIII, описанный в WO2020191485A1, которая полностью включена посредством ссылки.

[0172] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложены антитела EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты, выбранные из группы, состоящей из:

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDRL1 (SEQ ID NO:38), CDRL2 (SEQ ID NO:39), CDRL3 (SEQ ID NO:40), CDRH1 (SEQ ID NO:43), CDRH2 (SEQ ID NO:43), CDRH2 (SEQ ID NO:44) и CDRH3 (SEQ ID NO:45) антитела 4E11;

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDRL1 (SEQ ID NO:8), CDRL2 (SEQ ID NO:9), CDR L3 (SEQ ID NO:10), CDRH1 (SEQ ID NO:13), CDRH2 (SEQ ID NO:14) и CDRH3 (SEQ ID NO:15) антитела 5G6;

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDRL1 (SEQ ID NO:18), CDRL2 (SEQ ID NO:19), CDRL3 (SEQ ID NO:20), CDRH1 (SEQ ID NO:23), CDRH2 (SEQ ID NO:24) и CDRH3 (SEQ ID NO:25) антитела 1A8;

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDRL1 (SEQ ID NO:28), CDRL2 (SEQ ID NO:29), CDRL3 (SEQ ID NO:30), CDRH1 (SEQ ID NO:33), CDRH2 (SEQ ID NO:34) и CDRH3 (SEQ ID NO:35) антитела 4B3;

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDRL1 (SEQ ID NO:48), CDRL2 (SEQ ID NO:49), CDRL3 (SEQ ID NO:50), CDRH1 (SEQ ID NO:53), CDRH2 (SEQ ID NO:54) и CDRH3 (SEQ ID NO:55) антитела 5D8;

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDRL1 (SEQ ID NO:58), CDRL2 (SEQ ID NO:59), CDRL3 (SEQ ID NO:60), CDRH1 (SEQ ID NO:63), CDRH2 (SEQ ID NO:64), CDRH3 (SEQ ID NO:65) антитела 9C9; и

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDRL1 (SEQ ID NO:68 или 73), CDRL2 (SEQ ID NO:69 или 74), CDRL3 (SEQ ID NO:70 или 75), CDRH1 (SEQ ID NO:78), CDRH2 (SEQ ID NO:79) и CDRH3 (SEQ ID NO:80) антитела F266-11B1 (называемого в настоящем документе 11B1), F266-11C8 (называемого в настоящем документе 11C8), F266-11H5 (называемого в настоящем документе 11H5) и/или F266-11H3 (называемого в настоящем документе 11H3).

[0173] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 4E11.

[0174] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 5G6,

[0175] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 1A8.

[0176] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 4B3.

[0177] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 5D8.

[0178] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 9C9.

[0179] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 11B1 или антитела 11C8.

[0180] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к антителам EGFRvIII или их антигенсвязывающим фрагментам, выбранным из группы, состоящей из:

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:8), CDRL2 (SEQ ID NO:9), CDRL3 (SEQ ID NO:10), CDRH1 (SEQ ID NO:13), CDRH2 (SEQ ID NO:14), CDRH3 (SEQ ID NO:15);

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:18), CDRL2 (SEQ ID NO:19), CDRL3 (SEQ ID NO:20), CDRH1 (SEQ ID NO:23), CDRH2 (SEQ ID NO:24), CDRH3 (SEQ ID NO:25);

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:28), CDRL2 (SEQ ID NO:29), CDRL3 (SEQ ID NO:30), CDRH1 (SEQ ID NO:33), CDRH2 (SEQ ID NO:34), CDRH3 (SEQ ID NO:35);

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:38), CDRL2 (SEQ ID NO:39), CDRL3 (SEQ ID NO:40), CDRH1 (SEQ ID NO:43), CDRH2 (SEQ ID NO:44), CDRH3 (SEQ ID NO:45);

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:48), CDRL2 (SEQ ID NO:49), CDRL3 (SEQ ID NO:50), CDRH1 (SEQ ID NO:53), CDRH2 (SEQ ID NO:54), CDRH3 (SEQ ID NO:55);

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:58), CDRL2 (SEQ ID NO:59), CDRL3 (SEQ ID NO:60), CDRH1 (SEQ ID NO:63), CDRH2 (SEQ ID NO:64), CDRH3 (SEQ ID NO:65);

антитела или его фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:68), CDRL2 (SEQ ID NO:69), CDRL3 (SEQ ID NO:70), CDRH1 (SEQ ID NO:78), CDRH2 (SEQ ID NO:79), CDRH3 (SEQ ID NO:80); и

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR, состоящие из CDRL1 (SEQ ID NO:73), CDRL2 (SEQ ID NO:74), CDRL3 (SEQ ID NO:75), CDRH1 (SEQ ID NO:78), CDRH2 (SEQ ID NO:79), CDRH3 (SEQ ID NO:80).

[0181] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EGFR_{vIII} и которое может содержать, например:

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:14, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:15;

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:18, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:19, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:20, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:23, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:25;

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:28, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:29, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:30, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:33, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:34, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:35;

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:38, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:39, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:40, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:43,

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EGFRvIII и которое может содержать:

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:118, или по существу идентичную SEQ ID NO:118, и/или вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, или по существу идентичную SEQ ID NO:116;

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:115, или по существу идентичную SEQ ID NO:115, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере, 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:116 или по существу идентичную SEQ ID NO:116; или

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:118, или по существу идентичную SEQ ID NO:118, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере, 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:62, или по существу идентичную SEQ ID NO:62.

[0183] В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие легкую цепь на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере на 99% идентичную или по существу идентичную

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:115 или SEQ ID NO:118, могут иметь CDR, идентичные последовательностям SEQ ID NO:115 или SEQ ID NO:118, соответственно.

[0184] В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие тяжелую цепь на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную или по существу идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:116, могут иметь CDR, идентичные последовательностям SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:116, соответственно.

[0185] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EGFR_{vIII} и которое может содержать:

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:7, или по существу идентичную SEQ ID NO:7, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере, 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:12 или по существу идентичную SEQ ID NO:12;

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:17, или по существу идентичную SEQ ID NO:17, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере, 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:22 или по существу идентичную SEQ ID NO:22;

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%

99% идентичную таковой указанной антитела, могут иметь CDR, идентичные этому антителу. В некоторых вариантах осуществления, последовательности VL и VH антител и антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем описании, могут содержать последовательность, по существу идентичную последовательностям VL и VH, предложенным в настоящем документе, или могут содержать последовательность имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, где вариация последовательности является предпочтительно вне CDR предложенных последовательностей VL и VH.

[0187] В дополнительных вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с EGFRvIII и которое может содержать:

легкую цепь, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:108, или по существу идентичную SEQ ID NO:108, и тяжелую цепь, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:107, или по существу идентичную SEQ ID NO:107; или

легкую цепь, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:110, или по существу идентичную SEQ ID NO:110, и тяжелую цепь, которая может содержать аминокислотную последовательность на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:109, или по существу идентичную SEQ ID NO:109.

[0188] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение дополнительно предлагает анти-EGFRvIII антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут включать:

CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:38, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в

SEQ ID NO:39, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:40, CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:43, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:44, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:45;

вариабельную область легкой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную, по меньшей мере на 85% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 92% идентичную, по меньшей мере на 94% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную, по меньшей мере на 99% идентичную или идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:37, и вариабельную область тяжелой цепи, которая может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную, по меньшей мере на 85% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 92% идентичную, по меньшей мере на 94% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную, по меньшей мере на 99% идентичную или идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:42; или

легкую цепь, которая может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную, по меньшей мере на 85% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 92% идентичную, по меньшей мере на 94% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере, на 97% идентичную, по меньшей мере, на 98% идентичную, по меньшей мере на 99% идентичную или идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:108, и тяжелую цепь, которая может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную, по меньшей мере на 85% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 92% идентичную, по меньшей мере на 94% идентичную, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 96% идентичную, по меньшей мере на 97% идентичную, по меньшей мере на 98% идентичную, по меньшей мере на 99% идентичную или идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:107.

[0189] В соответствии с настоящим изобретением, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, указанные выше, могут иметь CDR, идентичные или по существу идентичные CDR, представленным в SEQ ID NO:38, 39, 40, 43, 44 и 45.

[0190] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение также относится к антителам EGFRvIII или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим последовательности легкой цепи, которые содержат сигнальную последовательность MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO:113) на N-конце, и последовательности тяжелой цепи, которые содержат сигнальную последовательность.

MDWTWRILFLVAAATGTNHA (SEQ ID NO:114) на N-конце. В некоторых вариантах осуществления, каждая из последовательностей легкой цепи, представленных в SEQ ID NO:180, 181 и 182, содержит сигнальную последовательность MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO:113) на N-конце. В некоторых вариантах осуществления, каждая из последовательностей тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO:183, 184 и 185, содержит сигнальную последовательность MDWTWRILFLVAAATGTNHA (SEQ ID NO:114) на N-конце.

[0191] В соответствии с настоящим изобретением, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь, например, аффинность к EGFRvIII менее 100 нМ, например, аффинность к EGFRvIII 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее или 5 нМ или менее.

[0192] Типовые варианты осуществления настоящего изобретения включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут содержать константную область IgG человека. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут содержать, например и без ограничения, константную область IgG1 человека, или константную область IgG2 человека, или константную область IgG4 человека, или их мутационный вариант.

[0193] В типовом варианте осуществления, антигенсвязывающие агенты, описанные в настоящем документе, могут содержать гуманизированные каркасные области.

[0194] В соответствии с настоящим изобретением, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, антитело человека, одноцепочечное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

[0195] Биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают антитела, которые могут содержать первый таргетный фрагмент, который специфически связывается с первым эпитопом EGFRvIII человека, и второй таргетный фрагмент, который специфически связывается со вторым (не перекрывающимся) эпитопом EGFRvIII человека (например, бипаратопное антитело).

[0196] Дополнительные варианты осуществления биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению включают антитела, которые могут содержать первый таргетный фрагмент, который специфически связывается с первым эпитопом EGFRvIII человека, и второй таргетный фрагмент, который специфически связывается с другим антигеном.

[0197] Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включают биспецифические активаторы иммунных клеток, такие как те, которые содержат первый таргетный фрагмент, который специфически связывается с EGFRvIII человека, и второй таргетный фрагмент, который специфически связывается с CD3.

[0198] В соответствии с настоящим изобретением, антигенсвязывающий фрагмент антитела EGFRvIII может содержать, например, scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

Полипептиды

[0199] Полипептиды включают, например, любые гематологические агенты (включая, например, эритропоэтин, факторы свертывания крови и т.д.), интерфероны, колониестимулирующие факторы, антитела, ферменты и гормоны. Идентичность конкретного полипептида не ограничивает настоящее раскрытие, и любой представляющий интерес полипептид может быть полипептидом в настоящих способах.

[0200] Описанный в настоящем документе эталонный полипептид может включать мишень-связывающий домен, который способен связываться с представляющей интерес мишенью (*например*, способен связываться с антигеном, *например*, EGFRvIII). Например, полипептид, такой как антитело, может связываться с трансмембранным полипептидом (*например*, рецептором) или лигандом (*например*, фактором роста).

Модифицированные полипептиды

[0201] Полипептиды, подходящие для использования с композициями и способами настоящего изобретения, могут иметь модифицированную аминокислотную последовательность. Модифицированные полипептиды могут быть по существу идентичны соответствующему эталонному полипептиду (*например*, аминокислотная последовательность модифицированного полипептида может иметь по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность аминокислотной последовательности эталонного полипептида). В некоторых вариантах осуществления, модификация существенно не разрушает желаемую биологическую активность (*например*, связывание с EGFRvIII). Модификация может уменьшить (*например*, по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 25%, 35%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95%), может не оказывать эффект или может увеличивать (*например*, по меньшей мере, на 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200%, 500% или 1000%) биологическую активность исходного полипептида. Модифицированный полипептид может иметь или может оптимизировать характеристики полипептида, такие как стабильность *in vivo*, биодоступность, токсичность, иммунологическая активность, иммунологическая идентичность и свойства конъюгации.

[0202] Модификации включают модификации, осуществляемые природными процессами, такими как пост-трансляционный процессинг, или методами химической модификации, известными в данной области техники. Модификации могут происходить в любом месте полипептида, включая основную цепь полипептида, боковые цепи аминокислот и amino- или карбокси-конец. Один и тот же тип модификации может присутствовать в одинаковой или разной степени в нескольких сайтах данного полипептида, и полипептид может содержать более одного типа модификаций. Полипептиды могут быть разветвленными в результате убиквитинирования и могут быть циклическими, с или без разветвления. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические полипептиды могут возникать в результате пост-трансляционных природных

процессов, или могут быть получены синтетическим путем. Другие модификации включают пегилирование, ацетилирование, ацилирование, добавление ацетомидометильной (Acм) группы, АДФ-рибозилирование, алкилирование, амидирование, биотинилирование, карбамоилирование, карбоксиэтилирование, эстерификацию, ковалентное присоединение к флавину, ковалентное присоединение к фрагменту гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производное нуклеотида, ковалентное присоединение лекарственного средства, ковалентное присоединение маркера (*например*, флуоресцентного или радиоактивного), ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, поперечное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование якоря GPI, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

[0203] Модифицированный полипептид может также включать аминокислотную вставку, делецию или замену, как консервативную, так и не консервативную (*например*, D-аминокислоты, дезаминокислоты) в полипептидной последовательности (*например*, когда такие изменения существенно не изменяют биологическую активность полипептида). В частности, добавление одного или нескольких цистеиновых остатков к амино- или карбокси-концу полипептида в настоящем документе может облегчить конъюгацию этих полипептидов, *например*, посредством дисульфидной связи. Например, полипептид можно модифицировать, включив в него один цистеиновый остаток на аминоконце или один цистеиновый остаток на карбокси-конце. Аминокислотные замены могут быть консервативными (*т.е.* когда остаток заменяется другим того же общего типа или группы) или не консервативными (*т.е.* когда остаток заменяется аминокислотой другого типа). Кроме того, аминокислота природного происхождения может быть заменена аминокислотой не природного происхождения (*т.е.* замена консервативной аминокислоты не природного происхождения или замена не консервативной аминокислоты не природного происхождения).

[0204] Полипептиды, полученные синтетическим путем, могут включать замены аминокислот, не кодируемых ДНК в природе (*например*, аминокислоты не существующие в природе или не природного происхождения). Примеры не существующих в природе аминокислот включают D-аминокислоты, N-защищенные аминокислоты, аминокислоту, имеющую ацетиламинометильную группу, присоединенную к атому серы цистеина, пегилированную аминокислоту, омега-аминокислоты формулы $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, где n равно 2-6, нейтральные неполярные аминокислоты, такие как саркозин, трет-бутилаланин, трет-бутилглицин, N-метилизoleyцин и норлейцин. Фенилглицин может заменить Tgr,

Тур или Phe; цитруллин и сульфоксид метионина являются нейтральными неполярными, цистеиновая кислота является кислотой, и орнитин является основным. Пролин можно заменить гидроксипролином и сохранить свойства, придающие конформацию.

[0205] Аналоги могут быть получены путем заместительного мутагенеза и сохраняют биологическую активность исходного полипептида. Примеры замен, идентифицированных как «консервативные замены», показаны в Таблице 1. Если такие замены приводят к нежелательным изменениям, тогда используются другие типы замен, обозначенные как «типовые замены» в Таблице 1 или как далее описано в настоящем документе в отношении классов аминокислот, представлены и продукты подвергнуты скринингу.

Таблица 1. Аминокислотные замены

Исходный остаток	Типовая замена	Консервативная замена
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, норлейцин	Leu

[0206] Существенные изменения функции или иммунологической идентичности достигаются путем подбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-

мишени, и/или (с) объем боковой цепи.

Хелатирующий фрагмент или его металлокомплекс

Хелатирующие фрагменты

[0207] Примеры подходящих хелатирующих фрагментов включают, но не ограничены ими, DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), DOTMA (1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту, DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан), DOTPA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрапропионовую кислоту), DO3AM-уксусную кислоту (2-(4,7,10-трис(2-амино-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)уксусную кислоту), DOTA-GA ангидрид (2,2',2''-(10-(2,6-диоксотетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триил)триуксусную кислоту, DOTP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфоновую кислоту)), DOTMP (1,4,6,10-тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетраметиленфосфоновую кислоту), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновую кислоту), CB-TE2A (1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусную кислоту), NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту), NOTP (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-три(метиленфосфоновую кислоту), TETPA (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовую кислоту), TETA (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту), HEHA (1,4,7,10,13,16-гексаазациклотетрадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусную кислоту), PEPA (1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан-N, N',N'',N''',N''''-пентауксусную кислоту), H₄октапа (N, N'-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)этилендиамин-N, N'-диуксусную кислоту), H₂дедпа (1,2-[[6-(карбокси)-пиридин-2-ил]-метиламино]этан), H₆фоспа (N, N'-(метиленфосфонат)-N, N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтан), TTHA (триэтилететрамин-N, N,N',N'',N''',N''''-гексауксусную кислоту), DO2P (тетраазациклододекандиметанфосфоновую кислоту), HP-DO3A (гидроксипропилтетраазациклододекантриуксусную кислоту), ЭДТК (этилендиаминтетрауксусную кислоту), дефероксамин, ДТРА (диэтилентриаминпентауксусную кислоту), ДТРА-ВМА (диэтилентриаминпентауксусную кислоту-бисметиламид), октадентат-НОРО (октадентатные гидроксипиридиноны) или порфирины.

[0208] Предпочтительно, хелатирующий фрагмент выбран из DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты), DOTMA (1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты, DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана), DO3AM-уксусной кислоты (2-(4,7,10-трис(2-амино-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)уксусной кислоты), DOTP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфоновой кислоты)), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновой кислоты), NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты) и HP-DO3A (10-(2-гидроксипропил)-1,4,7-

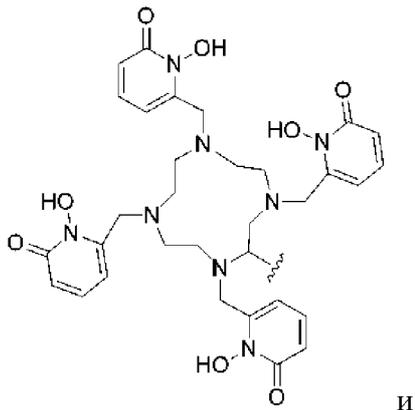
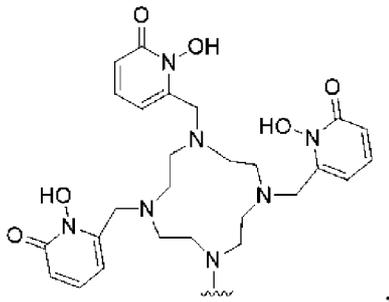
тетраазациклододекан-1,4,7-триуксусной кислоты).

[0209] В некоторых вариантах осуществления, хелатирующий фрагмент представляет собой DOTA.

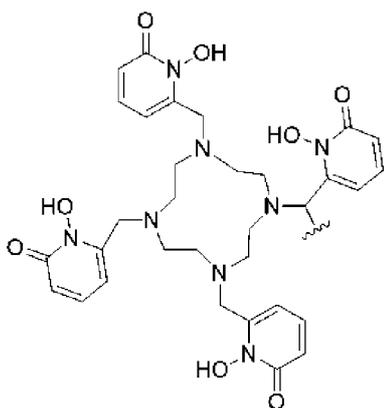
[0210] В некоторых вариантах осуществления, соединения содержат металлокомплекс хелатирующего фрагмента. Например, хелатные группы могут использоваться в металлохелатных комбинациях с металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, и изотопами (*например*, изотопами в общем диапазоне энергии от 60 до 10000 кэВ), такими как любые из обсуждаемых в настоящем документе радиоизотопов и радионуклидов.

[0211] В некоторых вариантах осуществления, хелатирующие фрагменты полезны в качестве средств обнаружения, и поэтому соединения, содержащие такие обнаруживаемые хелатирующие фрагменты, можно использовать в качестве диагностических или тераностических средств.

[0212] В некоторых вариантах осуществления, переменная А Формулы I представляет собой макроциклический хелатирующий фрагмент, содержащий одну или несколько гетероарильных групп (*например*, шестичленный азотсодержащий гетероарил). Примеры такого макроциклического хелатирующего фрагмента включают, но не ограничены ими:



и



Радиоизотопы и радионуклиды

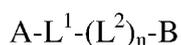
[0213] В некоторых вариантах осуществления, металлокомплекс содержит радионуклид. Примеры подходящих радиоизотопов и радионуклидов включают, но не ограничены ими, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{82}Rb , ^{89}Zr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}La , ^{134}Ce , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th и ^{229}Th .

[0214] В некоторых вариантах осуществления, металлокомплекс содержит радионуклид, выбранный из ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{133}La , ^{134}Ce , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th и ^{229}Th . В некоторых вариантах осуществления, металлокомплекс содержит радионуклид, выбранный из ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu и ^{225}Ac . В некоторых вариантах осуществления, металлокомплекс содержит радионуклид ^{177}Lu или ^{225}Ac .

[0215] В некоторых вариантах осуществления, радионуклид представляет собой альфа-излучатель, например, астат-211 (^{211}At), висмут-212 (^{212}Bi), висмут-213 (^{213}Bi), актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{223}Ra), свинец-212 (^{212}Pb), торий-227 (^{227}Th) или тербий-149 (^{149}Tb) или их дочерние изотопы. В некоторых вариантах осуществления, альфа-излучателем является актиний-225 (^{225}Ac) или его дочерний изотоп.

Линкер

[0216] Соединения настоящего изобретения обычно имеют структуру Формулы I ниже:



Формула I

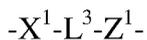
где каждая из переменных определена в разделе «Сущность изобретения» выше.

[0217] Каждое из соединений Формулы I содержит линкерный фрагмент, такой как $\text{-L}^1\text{-(L}^2\text{)}_n\text{-}$, где:

L^1 представляет собой связь, C=O , C=S , необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил, необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_6$ гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

n представляет собой целое число от 1 до 5 (включительно); и

каждый L^2 независимо имеет структуру:



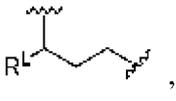
Формула II

где:

X^1 представляет собой $-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-*$, $-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-*$, $-OC(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)O-*$, $-NR^1C(O)NR^1-*$, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$, $-O-*$ или $-NR^1-*$; где «*» указывает точку присоединения к L^3 , и R^1 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил или необязательно замещенный арил или гетероарил;

L^3 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_{50} алкил или необязательно замещенный C_1-C_{50} гетероалкил (например, $(CH_2CH_2O)_{2-20}$); и

Z^1 представляет собой $-CH_2-#$, $-C(O)-#$, $-C(S)-#$, $-OC(O)-#$, $-C(O)O-#$, $-NR^2C(O)-#$, $-C(O)NR^2-#$ или $-NR^2-#$, где «#» указывает точку присоединения к V , и R^2 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

[0218] В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил или необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой замещенный C_1-C_6 алкил или замещенный C_1-C_6 гетероалкил, где заместитель включает гетероарильную группу (например, шестичленный азотсодержащий гетероарил). В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой C_1-C_6 алкил. Например, L^1 представляет собой $-CH_2CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой , где R^L представляет собой водород или $-CO_2H$.

[0219] В некоторых вариантах осуществления, X^1 представляет собой $-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-*$ или $-NR^1-$, «*» указывает точку присоединения к L^3 , и R^1 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления, X^1 представляет собой $-C(O)NR^1-*$, «*» указывает точку присоединения к L^3 , и R^1 представляет собой водород.

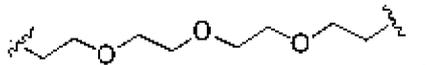
[0220] В некоторых вариантах осуществления, L^3 необязательно замещен C_1-C_{50} алкилом (например, C_3-C_{30} алкилом, C_3-C_{25} алкилом, C_3-C_{20} алкилом, C_3-C_{15} алкилом, C_3-C_{10} алкилом, C_5-C_{30} алкилом, C_5-C_{25} алкилом, C_5-C_{20} алкилом, C_5-C_{15} алкилом и C_5-C_{10} алкилом), или необязательно замещен C_1-C_{50} гетероалкилом (например, C_3-C_{30} гетероалкилом, C_3-C_{25} гетероалкилом, C_3-C_{20} гетероалкилом, C_3-C_{15} гетероалкилом, C_3-C_{10} гетероалкилом, C_5-C_{30} гетероалкилом, C_5-C_{25} гетероалкилом, C_5-C_{20} гетероалкилом, C_5-C_{15} гетероалкилом и C_5-C_{10} гетероалкилом). Типовой C_1-C_{50} гетероалкил представляет собой

C_5-C_{30} полиэтиленгликоль (*например*, C_5-C_{25} полиэтиленгликоль, C_5-C_{20} полиэтиленгликоль, C_5-C_{15} полиэтиленгликоль). В определенных вариантах осуществления, L^3 представляет собой C_5-C_{25} полиэтиленгликоль, C_5-C_{20} полиэтиленгликоль или C_5-C_{15} полиэтиленгликоль.

[0221] В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_{50} гетероалкил (*например*, C_1-C_{40} гетероалкил, C_1-C_{30} гетероалкил, C_1-C_{20} гетероалкил, C_2-C_{18} гетероалкил, C_3-C_{16} гетероалкил, C_4-C_{14} гетероалкил, C_5-C_{12} гетероалкил, C_6-C_{10} гетероалкил, C_8-C_{10} гетероалкил, C_4 гетероалкил, C_6 гетероалкил, C_8 гетероалкил, C_{10} гетероалкил, C_{12} гетероалкил, C_{16} гетероалкил, C_{20} гетероалкил или C_{24} гетероалкил).

[0222] В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_{50} гетероалкил, содержащий полиэтиленгликолевый (ПЭГ) фрагмент, содержащий 1-20 оксиэтиленовых ($-O-CH_2-CH_2-$) единиц, *например*, 2 оксиэтиленовых единицы (ПЭГ2), 3 оксиэтиленовых единицы (ПЭГ3), 4 оксиэтиленовых единицы (ПЭГ4), 5 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ5), 6 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ6), 7 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ7), 8 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ8), 9 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ9), 10 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ10), 12 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ12), 14 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ14), 16 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ16) или 18 оксиэтиленовых единиц (ПЭГ18).

[0223] В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой необязательно замещенный C_{1-50} гетероалкил, содержащий полиэтиленгликолевый фрагмент (ПЭГ), содержащий 1-20 оксиэтиленовых ($-O-CH_2-CH_2-$) единицы или их части. Например, L^3 содержит ПЭГ3, как показано ниже:

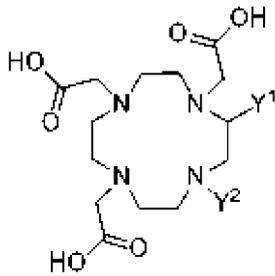


[0224] В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой $(CH_2CH_2O)_m(CH_2)_w$, и каждый из m и w независимо представляет собой целое число от 0 до 10 (включительно), и по меньшей мере одно из m и w не равно 0.

[0225] В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой замещенный C_1-C_{50} алкил или замещенный C_1-C_{50} гетероалкил, где заместитель включает гетероарильную группу (*например*, шестичленный азотсодержащий гетероарил).

[0226] В некоторых вариантах осуществления, Z^1 представляет собой CH_2 , $C=O$ или NR^1 ; где R^1 представляет собой H , необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

[0227] В некоторых вариантах осуществления, $A-L^1-(L^2)_n-B$ может быть представлен следующей структурой:



[0228] где Y^1 представляет собой $-\text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{L}^2)_n-\text{B}$, $\text{C}=\text{O}(\text{L}^2)_n-\text{B}$ или $\text{C}=\text{S}(\text{L}^2)_n-\text{B}$, и Y^2 представляет собой $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; или где Y^1 представляет собой H и Y^2 представляет собой $\text{L}^1-(\text{L}^2)_n-\text{B}$.

Поперечно-сшивающие группы

[0229] В некоторых вариантах осуществления, соединения (например, радиоиммуноконъюгаты) синтезируют с использованием бифункциональных хелатов, которые содержат хелат, линкер и поперечно-сшивающую группу. После образования соединения (например, радиоиммуноконъюгата), поперечно-сшивающая группа может отсутствовать в соединении (например, радиоиммуноконъюгате).

[0230] В некоторых вариантах осуществления, соединения (например, радиоиммуноконъюгаты) содержат поперечно-сшивающую группу вместо или в дополнение к таргетному фрагменту (*например*, в некоторых вариантах осуществления, В в Формуле I содержит поперечно-сшивающую группу).

[0231] Поперечно-сшивающая группа представляет собой реакционноспособную группу, которая способна соединить две или несколько молекул ковалентной связью. Поперечно-сшивающие группы могут использоваться для присоединения линкера и хелатирующего фрагмента к терапевтическому или таргетному фрагменту. Поперечно-сшивающие группы также могут быть использованы для присоединения линкера и хелатирующего фрагмента к мишени *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, поперечно-сшивающая группа представляет собой амино-реакционноспособную, метионин-реакционноспособную или тиол-реакционноспособную поперечно-сшивающую группу, или содержит последовательность распознавания сортазы. В некоторых вариантах осуществления, амино- или тиол-реакционноспособная поперечно-сшивающая группа содержит активированный сложный эфир, такой как сложный эфир гидроксисукцинимиды, сложный эфир 2,3,5,6-тетрафторфенола, сложный эфир 4-нитрофенола или имидат, ангидрид, тиол, дисульфид, малеимид, азид, алкин, напряженный алкин, напряженный алкен, галоген, сульфонат, галогенацетил, амин, гидразид, диазиридин, фосфин, тетразин, изотиоцианат или оксазиридин. В некоторых вариантах осуществления, последовательность распознавания сортазы может содержать терминальную аминокислотную последовательность глицин-глицин-глицин (GGG) и/или LPTXG, где X представляет собой любую аминокислоту. Специалист в данной области техники поймет, что использование поперечно-сшивающих групп не ограничено конкретными конструкциями, раскрытыми в настоящем документе, а скорее может включать другие известные сшивающие группы.

Фармацевтические композиции

[0232] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединения, раскрытые в настоящем документе. Такие фармацевтические композиции могут быть составлены для использования в различных системах доставки лекарственных средств. Один или несколько физиологически приемлемых эксципиентов или носителей также могут быть включены в фармацевтическую композицию для правильного составления. Неограничивающие примеры подходящих составов, совместимых с настоящим изобретением, включают те, которые описаны в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств см., например, Langer (*Science*. 249:1527-1533, 1990).

[0233] Фармацевтические композиции могут быть составлены для любого из множества путей введения, обсуждаемых в настоящем документе (см., например, подраздел «Введение и дозировка» в настоящем документе). Рассматривается введение с замедленным высвобождением, такими способами, как депо-инъекции или разрушаемые имплантаты или компоненты. Таким образом, настоящее изобретение предлагает фармацевтические композиции, которые включают раскрытые в настоящем документе агенты (например, радиоиммуноконъюгаты), растворенные или суспендированные в приемлемом носителе, предпочтительно, водном носителе, например, воде, забуференной воде, солевом растворе или PBS, среди прочего. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, приближающие к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH и буферные агенты, агенты, регулирующие тоничность, смачивающие агенты или детергенты, среди прочего. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции составлены для пероральной доставки и могут необязательно содержать инертные ингредиенты, такие как связующие агенты или наполнители, для составления стандартной дозированной формы, такой как таблетка или капсула. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции составлены для местного введения и могут необязательно содержать инертные ингредиенты, такие как растворители или эмульгаторы, для составления крема, мази, геля, пасты или глазных капель.

[0234] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые фармацевтические композиции стерилизованы традиционными методами стерилизации, например, могут быть подвергнуты стерильной фильтрации. Полученные водные растворы можно упаковывать для использования как есть или лиофилизировать. Лيوфилизированные препараты можно, например, объединить со стерильным водным носителем перед введением. pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно, от 5 до 9 или от 6 до 8, и наиболее предпочтительно, от 6 до 7, например от 6 до 6,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы, например, в несколько стандартных дозированных форм, каждая из которых содержит фиксированное количество

вышеупомянутого агента или агентов, например, в герметичную упаковку из таблеток или капсул. Фармацевтические композиции в твердой форме также могут быть упакованы в контейнер для гибкого количества, например, в сжимаемый тюбик, разработанный для крема или мази для местного нанесения.

Способы лечения

[0235] В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способы лечения, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения (например, радиоиммуноконъюгата), раскрытого в настоящем документе.

Субъекты

[0236] В некоторых раскрытых способах, субъекту вводят терапию (*например*, содержащую терапевтический агент). В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой млекопитающее, *например*, человека.

[0237] В некоторых вариантах осуществления, субъект болен раком или имеет риск развития рака. Например, у субъекта мог быть диагностирован рак. Например, рак может представлять собой первичный рак или метастатический рак. Субъекты могут иметь любую стадию рака, *например*, I стадию, II стадию, III стадию или IV стадию с или без поражения лимфатических узлов, а также с или без метастазами. Предложенные соединения (например, радиоиммуноконъюгаты) и композиции могут предотвращать или уменьшать дальнейший рост рака и/или иным образом улучшать течение рака (*например*, предотвращать или уменьшать метастазы). В некоторых вариантах осуществления, у субъекта нет рака, но установлено, что он подвержен риску развития рака, *например*, из-за присутствия одного или нескольких факторов риска, таких как воздействие окружающей среды, наличие одной или нескольких генетических мутаций или вариантов, семейного анамнеза и т.д. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта не диагностирован рак.

[0238] В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой любой рак, который содержит клетки, экспрессирующие EGFRvIII. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой мультиформную глиобластому или карциному.

Введение и дозировка

[0239] Соединения (например, радиоиммуноконъюгаты) и их фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, можно вводить любым из множества способов введения, включая системные и местные пути введения.

[0240] Системные пути введения включают парентеральные пути и энтеральные пути. В некоторых вариантах осуществления, соединения (например, радиоиммуноконъюгаты) или их фармацевтические композиции вводят парентеральным путем, например, внутривенно, внутриартериально, внутривентрикулярно, подкожно, внутримышечно или внутрикожно. В некоторых вариантах осуществления, соединения (например, радиоиммуноконъюгаты) или их фармацевтические композиции вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления, соединения (например, радиоиммуноконъюгаты) или их фармацевтические композиции вводят энтеральным путем введения, например, транс-гастроинтестинальным или пероральным.

[0241] Местные пути введения включают, но не ограничены ими, перитуморальные инъекции и внутриопухолевые инъекции.

[0242] Фармацевтические композиции можно вводить для планирования лучевой терапии, диагностики и/или терапевтического лечения. При введении для планирования лучевого лечения или в диагностических целях, соединение (например, радиоиммуноконъюгат) можно вводить субъекту в диагностически эффективной дозе и/или количестве, эффективном для определения терапевтически эффективной дозы. При терапевтических применениях, фармацевтические композиции можно вводить субъекту (например, человеку), уже страдающему заболеванием (например, раком), в количестве, достаточном для лечения или, по меньшей мере, частичной остановки симптомов нарушения и его осложнений. Количество, достаточное для достижения этой цели, определяется как «терапевтически эффективное количество», количество соединения, достаточное для по существу улучшения по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или медицинским состоянием. Например, при лечении рака, агент или соединение, которое уменьшает, предотвращает, задерживает, подавляет или останавливает любой симптом заболевания или состояния, будет терапевтически эффективным. Терапевтически эффективное количество агента или соединения не требуется для излечения заболевания или состояния, но может, например, обеспечить лечение заболевания или состояния, так что возникновение заболевания или состояния задерживается, затрудняется или предотвращается, например, симптомы заболевания или состояния улучшаются, или срок заболевания или состояния изменяется. Например, заболевание или состояние может стать менее тяжелым и/или выздоровление человека ускорится. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят первую дозу соединения (например, радиоиммуноконъюгата) или композиции в количестве, эффективном для планирования лучевого лечения, затем вводят вторую дозу или ряд доз соединения (например, радиоиммуноконъюгата) или композиции в терапевтически эффективном количестве.

[0243] Для лечения или профилактики рака, который содержит клетки, экспрессирующие EGFRvIII, способ обычно включает введение субъекту (например, человеку), нуждающемуся в этом, первой дозы соединения или композиции, представленной выше, в количестве, эффективном для планирования лучевого лечения, с последующим введением последующих доз соединения или композиции, представленной выше, в терапевтически эффективном количестве.

[0244] В некоторых вариантах осуществления, соединение или композиция, вводимые в первой дозе, и соединение или композиция, вводимые во второй дозе, являются одинаковыми.

[0245] В некоторых вариантах осуществления, соединение или композиция, вводимые в первой дозе, и соединение или композиция, вводимые во второй дозе, различаются.

[0246] Терапевтически эффективные количества могут зависеть от тяжести

заболевания или состояния и других характеристик субъекта (*например*, веса). Терапевтически эффективные количества раскрытых соединений (*например*, радиоиммуноконъюгатов) и композиций для субъектов (*например*, млекопитающих, таких как человек) могут быть определены специалистом средней квалификации с учетом индивидуальных различий (*например*, различий в возрасте, весе и состоянии субъекта).

[0247] В некоторых вариантах осуществления, раскрытые соединения (*например*, радиоиммуноконъюгаты) демонстрируют повышенную способность таргетировать раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество раскрытых соединений (*например*, радиоиммуноконъюгатов) ниже (*например*, меньше или равно примерно 90%, 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1%) эквивалентной дозы для терапевтического эффекта неконъюгированного и/или не радиоактивно меченного таргетного фрагмента.

[0248] Однократное или многократное введение соединений или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем документе, включая эффективное количество, может осуществляться с уровнями доз и схемой введения, выбранными лечащим врачом. Доза и схема введения могут быть определены и скорректированы в зависимости от тяжести заболевания или состояния у субъекта, которую можно контролировать на протяжении всего курса лечения в соответствии со способами, обычно практикуемыми клиницистами, или способами, описанными в настоящем документе.

Другие агенты

В некоторых вариантах осуществления, раскрытые способы дополнительно включают введение антипролиферативного агента, радиосенсибилизатора или иммунорегуляторного или иммуномодулирующего агента.

Под «антипролиферативным» или «антипролиферативным агентом», которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо, подразумевается любой противораковый агент, включая антипролиферативные агенты, перечисленные в Таблице 2, любой из которых может быть использован в комбинации с радиоиммуноконъюгатом, как описано в настоящем документе, для лечения состояния или нарушения. Типовым антипролиферативным агентом, используемым в способах по настоящему изобретению, является темозоломид (TMZ), который можно вводить в комбинации с радиоиммуноконъюгатом, указанным выше, в присутствии или в отсутствие дистанционной лучевой терапии. Антипролиферативные агенты также включают производные органической платины, производные нафтохинона и бензохинона, хризофановую кислоту и ее антрохиноновые производные.

Под «иммунорегуляторным агентом» или «иммуномодулирующим агентом», используемыми в настоящем документе взаимозаменяемо, подразумевается любой иммуномодулятор, включая те, которые перечислены в Таблице 2, любой из которых можно использовать в комбинации с радиоиммуноконъюгатом.

Используемый в настоящем документе термин «радиосенсибилизатор» включает любой агент, который увеличивает чувствительность раковых клеток к лучевой терапии.

Радиосенсибилизаторы могут включать, но не ограничены ими, 5-фторурацил, аналоги платины (например, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин), гемцитабин, антагонисты EGFR (например, цетуксимаб, gefitinib), ингибиторы фарнезилтрансферазы, ингибиторы COX-2, антагонисты bFGF и антагонисты VEGF.

Таблица 2		
Алкилирующие агенты	Бусульфан дакарбазин ифосфамид гексаметилмеламин тиотепа дакарбазин ломустин циклофосфамид	Хлорамбуцил прокарбазин альтретамин эстрамустина фосфат мехлоретамин стрептозоцин темозолomid Семустин
Платиновые агенты	спироплатин тетраплатин ормаплатин ипроплатин пикоплатин оксалиплатин карбоплатин	лобаплатин (Aetema) сатраплатин (Johnson Matthey) BBR-3464 (Hoffmann-La Roche) Мириплатин AP-5280 (Access) цисплатин
Антиметаболиты	азациитидин Флоксуридин 2-хлордезоксиаденозин 6-меркаптопурин 6-тиогуанин цитарабин 2-фтордезоксцитидин метотрексат томудекс флударабин ралтитрексед	триметрексат дезоксикоформин пентостатин гидроксимочевина децитабин (SuperGen) клофарабин (Bioenvision) ирофульвен (MGI Pharma) DMDC (Hoffmann-La Roche) этинилцитидин (Taiho) гемцитабин капецитабин
Ингибиторы топоизомеразы	амсакрин эпирубицин	экзатекана мезилат (Daiichi)

Таблица 2		
	<p>этопозид тенипозид или митоксантрон 7-этил-10- гидроксикамптотецин дексразоксанет (ТороTarget) пиксантрон (Novuspharma) аналог ребеккамицина (Exelixis) ББР-3576 (Novuspharma) рубитекан (SuperGen) иринотекан (СРТ-11) топотекан</p>	<p>квинамед (ChemGenex) гиматекан (Sigma-Tau) дифломотекан (Beaufour- Ipsen) ТАС-103 (Taiho) элсамитруцин (Spectrum) Эдотекарин Коситекан Белотекан гидроксикамптотецин (SN- 38)</p>
Противоопухолевые антибиотики	<p>валрубицин терарубицин идарубицин рубидазон пликамицин порфирамицин митоксантрон (новантрон) амонафид</p>	<p>азонафид антрапиразол оксантразол лосоксантрон Сабарубицин Эпирубицин митоксантрон доксорубицин</p>
Антимитотические агенты	<p>колхицин винбластин виндезин доластатин 10 (NCI) ризоксин ((Fujisawa) мивобулин (Warner-Lambert) цемадотин (BASF) РПР 109881А (Aventis) ТХD 258 (Aventis) эпотилон В (Novartis) Т 900607 (Tularik) Т 138067 (Tularik)</p>	<p>Е7010 (Abbott) PG-TXL (Cell Therapeutics) IDN 5109 (Bayer) А 105972 (Abbott) А 204197 (Abbott) LU 223651 (BASF) D 24851 (ASTAMedica) ER-86526 (Эйсай) комбретастатин А4 (BMS) изогомогалихондрин-В (PharmaMar) ZD 6126 (AstraZeneca)</p>

Таблица 2		
	криптофицин 52 (Eli Lilly) винфлунин (Fabre) ауристин PE (Teikoku Hormone) BMS 247550 (BMS) BMS 184476 (BMS) BMS 188797 (BMS) таксопрексин (Protarga) SB 408075 (GlaxoSmithKline) Винорелбин Трихостатин А	AZ10992 (Asahi) IDN-5109 (Индена) AVLB (Prescient NeuroPharma) азаэпотилон Б (БМС) BNP-7787 (BioNumerik) Пролекарство СА-4 (OXiGENE) доластатин-10 (НИИ) СА-4 (OXiGENE) доцетаксел винкристин паклитаксел
Ингибиторы ароматазы	аминоглутетимид атаместан (BioMedicines) летрозол анастрозол	YM-511 (Yamanouchi) форместан эксеместан
Ингибиторы тимидилатсинтазы	пеметрексед (Eli Lilly) ZD-9331 (BTG)	нолатрексед (Eximias) CoFactor™ (BioKeys)
Антагонисты ДНК	трабектедин (PharmaMar) глюфосфамид (Baxter International) альбумин+32P (Isotope Solutions) тимектацин (NewBiotics)	эдотреотид (Novartis) мафосфамид (Baxter International) апазиковон (Spectrum Pharmaceuticals) Об бензилгуанин (Paligent)
Ингибиторы фарнезилтрансферазы	арглабин (NuOncology Labs) лонафарниб (Schering-Plough) BAY-43-9006 (Bayer)	типифарниб (Johnson & Johnson) периллиловый спирт (DOR BioPharma)

Таблица 2		
Ингибиторы насоса	CBT-1 (CBA Pharma) Тарикидар (Xenova) MS-209 (Schering AG)	зосуvida ра тригидрохлорид (Eli Lilly) бирикодара дицитрат (Vertex)
Ингибиторы гистонацетилтрансферазы	тацедиалин (Pfizer) SANA (Aton Pharma) MS-275 (Schering AG)	пивалоилоксиметила бутират (Titan) депсипептид (Fujisawa)
Ингибиторы металлопротеиназ	Неовастат (Aeterna Laboratories) маримастат (British Biotech)	CMT-3 (CollaGenex) BMS-275291 (Celltech)
Ингибиторы рибонуклеозидредуктазы	мальтолат галлия (Titan) триапин (Vion)	тезацитабин (Aventis) дидокс (Molecules for Health)
Агонисты/антагонисты TNF альфа	вирулизин (Lorus Therapeutics) CDC-394 (Celgene)	ревимид (Celgene)
Антагонист рецептора эндотелина А	атразентан (Abbott) ZD-4054 (AstraZeneca)	YM-598 (Yamanouchi)
Агонисты рецепторов ретиноевой кислоты	фенретинид (Johnson & Johnson) LGD-1550 (Ligand)	алитретиноин (Ligand)
Иммуномодуляторы	интерферон онкофаг (Antigenics) GMK (Progenies) вакцина против аденокарциномы (Biomira) СТР-37 (AVI BioPharma) IRX-2 (Immuno-Rx) PEP-005 (Peplin Biotech)	дезосомальная терапия (Anosys) пентрикс (Australian Cancer Technology) ISF-154 (Tragen) противораковая вакцина (Intercell) норелин (Biostar)

Таблица 2		
	<p>вакцины синхровакс (CTL Immuno)</p> <p>вакцина против меланомы (CTL Immuno)</p> <p>Вакцина p21 RAS (GemVax)</p> <p>MAGE-A3 (GSK)</p> <p>ниволумаб (BMS)</p> <p>абатацепт (BMS)</p> <p>пембролизумаб (Merck)</p>	<p>BLP-25 (Biomira)</p> <p>MGV (Progenics)</p> <p>β-алетин (Dovetail)</p> <p>терапия ХЛЛ (Vasogen)</p> <p>Ипилимумаб (BMS),</p> <p>CM-10 (cCam Biotherapeutics)</p> <p>атезолизумаб (Genentech)</p>
Гормональные и антигормональные средства	<p>эстрогены</p> <p>конъюгированные эстрогены</p> <p>этинилэстрадиол</p> <p>хлортианизен</p> <p>иденэстрол</p> <p>гидроксипрогестерона капроат</p> <p>медроксипрогестерон</p> <p>тестостерон</p> <p>тестостерона пропионат;</p> <p>флюоксиместерон</p> <p>метилтестостерон</p> <p>диэтилстильбэстрол</p> <p>мегестрол</p> <p>бикалутамид</p> <p>флутамид</p> <p>нилутамид</p>	<p>дексаметазон</p> <p>преднизолон</p> <p>метилпреднизолон</p> <p>преднизолон</p> <p>аминоглютетимид</p> <p>лейпролид</p> <p>октреотид</p> <p>митоган</p> <p>P-04 (Novogen)</p> <p>2-метоксиэстрадиол (EntreMed)</p> <p>арзоксифен (Eli Lilly)</p> <p>тамоксифен</p> <p>торемофайн</p> <p>гозерелин</p> <p>Леупорелин</p> <p>бикалутамид</p>
Фотодинамические агенты	<p>талапорфин (Light Sciences)</p> <p>Тералюкс (Theratechnologies)</p> <p>мотексафин гадолиний (Pharmacyclics)</p>	<p>Pd-бактериофеофорбид (Yeda)</p> <p>Мотексафин лютеций</p> <p>гиперицин</p>
Ингибиторы киназы	иматиниб (Novartis)	ЕКВ-569 (Wyeth)

Таблица 2		
	<p>лефлуномид (Sugen/Pharmacia) ZD1839 (AstraZeneca) эрлотиниб (Oncogene Science) канертиниб (Pfizer) скваламин (Genaera) SU5416 (Pharmacia) SU6668 (Pharmacia) ZD4190 (AstraZeneca) ZD6474 (AstraZeneca) ваталаниб (Novartis) PKI166 (Novartis) GW2016 (GlaxoSmithKline) ЕКВ-509 (Wyeth) трастузумаб (Genentech) OSI-774 (Tarceva™) CI-1033 (Pfizer) SU11248 (Pharmacia) RH3 (York Medical) Генистеин Радицинол Met-MAb (Roche)</p>	<p>кахалид F (PharmaMar) СЕР-701 (Cephalon) СЕР-751 (Cephalon) MLN518 (Millenium) PKC412 (Novartis) Феноксодиол (Novogen) C225 (ImClone) rhu-Mab (Genentech) MDX-H210 (Medarex) 2C4 (Genentech) MDX-447 (Medarex) ABX-EGF (Abgenix) IMC-1C11 (ImClone) Тирфостины Гефитиниб (Iressa) РТК787 (Novartis) EMD 72000 (Merck) Эмодин Радицинол Вемурафениб (ингибитор фермента B-Raf, Daiichi Sankyo)</p>
SR-27897 (ингибитор ССК А, Sanofi-Synthelabo)	цефлатонин (стимулятор апоптоза, ChemGenex)	
токладезин (циклический агонист AMP, Ribapharm)	BCX-1777 (ингибитор PNP, BioCryst)	
альвоцидиб (ингибитор CDK, Aventis)	ранпирназа (стимулятор рибонуклеазы, Alfacell)	
CV-247 (ингибитор COX-2, Ivy Medical)	галарубицин (ингибитор синтеза РНК, Dong-A)	
P54 (ингибитор COX-2, Phytopharm)		
CapCell™ (стимулятор CYP450, Bavarian Nordic)	тирапазамин (восстановитель, SRI International)	
GCS-100 (антагонист gal3, GlycoGenesys)	N-ацетилцистеин (восстановитель, Zambon)	
иммуноген G17DT (ингибитор гастриина, Aphton)	R-флурбипрофен (ингибитор NF-каппаВ,	

Таблица 2	
эфапроксирал (оксигенатор, Allos Therapeutics)	Encore)
PI-88 (ингибитор гепараназы, Progen)	ЗСПА (ингибитор NF-каппаВ, Active Biotech)
тесмилифен (антагонист гистамина, YM BioSciences)	сеокальцитол (агонист рецептора витамина D, Leo)
гистамин (агонист гистаминового рецептора H2, Maxim)	131-I-TM-601 (антагонист ДНК, TransMolecular)
тиазофурин (ингибитор IMPDH, Ribapharm)	эфлорнитин (ингибитор ODC, ILEX Oncology)
циленгитид (антагонист интегрин, Merck KGaA)	минодроновая кислота (ингибитор остеокластов, Yamanouchi)
SR-31747 (антагонист IL-1, Sanofi-Synthelabo)	индисулам (стимулятор p53, Eisai)
CCI-779 (ингибитор киназы mTOR, Wyeth)	апидин (ингибитор PPT, PharmaMar)
экзисулинд (ингибитор PDE V, Cell Pathways)	гемтузумаб (антитело к CD33, Wyeth Ayerst)
CP-461 (ингибитор PDE V, Cell Pathways)	PG2 (усилитель кроветворения, Фармагенез)
AG-2037 (ингибитор GARFT, Pfizer)	Иммунол™ (триклозан для полоскания рта, Endo)
WX-UK1 (ингибитор активатора плазминогена, Wilex)	триацетилуридин (пролекарство уридина, Wellstat)
PBI-1402 (стимулятор PMN, ProMetic LifeSciences)	SN-4071 (агент саркомы, Signature BioScience)
бортезомиб (ингибитор протеасом, Millennium)	TransMID-107™ (иммунотоксин, KS Biomedix)
SRL-172 (стимулятор Т-клеток, SR Pharma)	РСК-3145 (промотор апоптоза, Procyon)
TLK-286 (ингибитор глутатион S трансферазы, Telik)	доранидазол (промотор апоптоза, Pola)
PT-100 (агонист фактора роста, Point Therapeutics)	CHS-828 (цитотоксический агент, Leo)
мидостаурин (ингибитор PKC, Novartis)	транс-ретиноевая кислота (дифференциатор, NIH)
бриостатин-1 (стимулятор PKC, GPC Biotech)	MX6 (промотор апоптоза, MAXIA)
CDA-II (промотор апоптоза, Everlife)	апомин (промотор апоптоза, ILEX Oncology)
SDX-101 (промотор апоптоза, Salmedix)	
ритуксимаб (антитела CD20, Genentech)	уроцидин (промотор апоптоза, Bioniche)

Таблица 2	
кармустин	Ro-31-7453 (промотор апоптоза, La
Митоксантрон	Roche)
Блеомицин	бросталлицин (промотор апоптоза,
Абсентин	Pharmacia)
Хризофановая кислота	β -лапахон
Оксиды цезия	гелонин
ингибиторы BRAF,	кафестол
ингибиторы PD-L1	кахвеол
ингибиторы MEK	кофеиновая кислота
бевацизумаб	Тирфостин АГ
ингибиторы ангиогенеза	ингибиторы PD-1
дабрафениб	ингибиторы CTLA-4
	сорафениб

[0249] Следующие конкретные примеры следует рассматривать просто как иллюстративные, а не ограничивающие остальную часть изобретения каким-либо образом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Общие материалы и способы

[0250] Лютеций-177 можно получить от ITM Medical Isotopes в виде трихлорида лютеция в 0,05 N растворе хлористоводородной кислоты; индий-111 в виде трихлорида индия в 0,05 N растворе хлористоводородной кислоты можно получить от BWXT; и актиний-225 можно получить в виде тринитрата актиния-225 в Oak Ridge National Laboratories.

[0251] Аналитическую ВЭЖХ-МС проводят с использованием системы ВЭЖХ-МС Waters Acquity, состоящей из бинарного насоса Waters Acquity, администратора образцов Waters Acquity (образцы охлаждают до 10°C), администратора колонки Water Acquity (температура колонки 30°C), детектора с фотодиодной матрицей Waters Acquity (мониторинг при 254 нм и 214 нм), ТКД с ионизацией электрораспылением Waters Acquity и колонки Waters Acquity VEN C18, 2,1 x 50 (1,7 мкм). Препаративную ВЭЖХ можно проводить с использованием системы Waters HPLC, состоящей из насоса для бинарного насоса ВЭЖХ Waters 1525, детектора УФ/видимого света Waters 2489 (мониторинг при 254 нм и 214 нм) и колонки Waters XBridge Prep phenyl или C18 19 x 100 мм (5 мкм).

[0252] Способ элюирования ВЭЖХ 1: колонка Waters Acquity VEN C18 2,1 x 50 мм (1,7 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока=0,3 мл/мин; начальная=90% А, 3-3,5 мин=0% А, 4 мин=90% А, 5 мин=90% А.

[0253] Способ элюирования ВЭЖХ 2: колонка Waters XBridge Prep Phenyl 19 x 100

мм (5 мкм); подвижная фаза А: Н₂О (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока: 10 мл/мин; начальная=80% А, 13 мин=0% А.

[0254] Способ элюирования ВЭЖХ 3: колонка Waters Acquity ВЕН С18 2,1 x 50 мм (1,7 мкм); подвижная фаза А: Н₂О (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока=0,3 мл/мин; начальная=90% А, 8 мин=0% А, 10 мин=0% А, 11 мин=90% А, 12 мин=90% А.

[0255] Способ элюирования ВЭЖХ 4: колонка Waters XBridge Prep С18 OBD 19 x 100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: Н₂О (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока: 10 мл/мин; начальная=80% А, 3 мин=80% А, 13 мин=20% А, 18 мин=0% А.

[0256] Способ элюирования ВЭЖХ 5: колонка Waters XBridge Prep С18 OBD 19 x 100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: Н₂О (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока: 10 мл/мин; начальная=90% А, 3 мин=90% А, 13 мин=0% А, 20 мин=0% А.

[0257] Способ элюирования ВЭЖХ 6: колонка Waters XBridge Prep С18 OBD 19 x 100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: Н₂О (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока: 10 мл/мин; начальная=75% А, 13 мин=0% А, 15 мин=0% А.

[0258] Способ элюирования ВЭЖХ 7: колонка Waters XBridge Prep С18 OBD 19 x 100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: Н₂О (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока: 10 мл/мин; начальная=80% А, 12 мин=0% А, 15 мин=0% А.

[0259] Способ элюирования ВЭЖХ 8: колонка Waters XBridge Prep С18 OBD 19 x 100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: Н₂О (0,1% об./об. ТФК); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об. ТФК); скорость потока: 10 мл/мин; начальная=90% А, 12 мин=0% А, 15 мин=0% А.

[0260] Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) может быть проведена с использованием системы Waters, состоящей из бинарного ВЭЖХ насоса Waters 1525, детектора УФ/видимого света Waters 2489 (мониторинг при 280 нм), радиодетектора Bioscan Flow Count (FC-3300) и колонки TOSOH TSKgel G3000SWxl, 7,8 x 300 мм. Изократный способ SEC может иметь скорость потока, *например*, мл/мин, с подвижной фазой, состоящей из 0,1 М фосфата, 0,6 М NaCl, 0,025% азида натрия, pH=7.

[0261] MALDI-MS (положительный ион) можно проводить с использованием спектрометра MALDI Bruker Ultraflexreme.

[0262] Тонкослойную радиохроматографию (радио-ТСХ) можно проводить с помощью томографа Bioscan AR-2000, и можно проводить на бумаге для хроматографии из стеклянного микроволокна iTLC-SG (Agilent Technologies, SGI0001) с использованием цитратного буфера (0,1 М, pH 5,5).

[0263] Создание и оценка некоторых моноклональных антител EGFRvIII можно найти в WO2020191485A1 (которая полностью включена посредством ссылки).

Пример 2. Синтез 4-{{11-оксо-11-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)ундецил}карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]бутановой кислоты (соединения В)

[0264] Бифункциональный хелат, 4-{{11-оксо-11-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)ундецил}карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]бутановую кислоту (Соединение В) синтезируют по схеме, представленной на **ФИГ. 2**. К раствору 5-(трет-бутокси)-5-оксо-4-(4,7,10-трис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)пентановой кислоты (DOTA-GA-(tBu)₄, 50 мг, 0,07 ммоль) в АЦН (2,0 мл), добавляют DSC (50 мг, 0,21 ммоль), затем пиридин (0,20 мл, 2,48 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 часа. К реакционной смеси добавляют 11-аминоундекановую кислоту (70 мг, 0,36 ммоль), затем раствор PBS (1,0 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают в течение 72 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтруют с помощью шприцевого фильтра и очищают непосредственно преп-ВЭЖХ, используя способ 6, с получением Промежуточного соединения 2-А.

[0265] К раствору Промежуточного соединения 2-А (40 мг, 0,03 ммоль), TFP (90 мг, 0,54 ммоль) и ЭДК (40 мг, 0,27 ммоль) в АЦН (1,0 мл) добавляют пиридин (0,05 мл, 50 мг, 0,62 ммоль) при комнатной температуре. Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 24 часов. Реакционную смесь очищают непосредственно с помощью преп-ВЭЖХ, используя способ 7, с получением Промежуточного соединения 2-В в виде воска после концентрирования с использованием быстрого испарителя Biotage V10.

[0266] Промежуточное соединение 2-В растворяют в ДХМ/ТФК (1,0 мл/2,0 мл) и оставляют перемешиваться при комнатной температуре в течение 24 часов. Реакционную смесь концентрируют потоком воздуха и очищают непосредственно преп-ВЭЖХ, используя способ 8, с получением Соединения В в виде прозрачного воска после концентрирования. Аликвоту анализируют ВЭЖХ-МС способом элюирования 3.

[0267] ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,99-7,88 (м, 1H), 7,82 (т, *J*=5,5 Гц, 1H), 3,78 (шс, 4H), 3,43 (шс, 12H), 3,08 (шс, 4H), 3,00 (м, 3H), 2,93 (шс, 3H), 2,77 (т, *J*=7,2 Гц, 2H), 2,30 (шс, 2H), 1,88 (шс, 2H), 1,66 (п, *J*=7,3 Гц, 2H), 1,36 (м, 4H), 1,32-1,20 (м, 9H).

Пример 3. Синтез 4-{{2-(2-{2-[3-оксо-3-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)пропокси]этокси}этокси)этил}карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]бутановой кислоты (Соединения С)

[0268] Бифункциональный хелат, 4-{{2-(2-{2-[3-оксо-3-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)пропокси]этокси}этокси)этил}карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]бутановую кислоту (Соединение С) синтезируют по схеме, представленной на **ФИГ. 3**.

[0269] К раствору 5-(трет-бутокси)-5-оксо-4-(4,7,10-трис(2-(трет-бутокси)-2-

оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)пентановой кислоты (DOTA-GA(tBu)₄, 100 мг, 0,143 ммоль) в АЦН (8,0 мл) добавляют DSC (73 мг, 0,285 ммоль) и пиридин (0,80 мл, 9,89 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 90 мин при температуре окружающей среды. Этот раствор добавляют к полураствору мино-ПЭГ3-кислоты (63 мг, 0,285 ммоль в 1,2 мл ДМФ) в 100 мл круглодонной колбе. Через 4 часа при комнатной температуре, реакцию концентрируют досуха под потоком воздуха. Неочищенный продукт очищают ВЭЖХ способом элюирования 2 (неочищенный продукт растворяют в 6 мл смеси 20% АЦН/Н₂О). Фракции, содержащие продукт, объединяют и концентрируют в вакууме, а затем упаривают совместно с АЦН (3 x 2 мл).

[0270] В пробирку, содержащую Промежуточное соединение 1-А (82 мг, 60 мкмоль), добавляют АЦН (2 мл), NEt₃ (50 мкл, 360 мкмоль, 6 экв.), ГБТУ (23 мг, 60 мкмоль, 1 экв.) и раствор TFP (50 мг, 300 мкмоль, 5 экв., растворенный в 250 мкл АЦН). Полученный прозрачный раствор перемешивают при температуре окружающей среды в течение 3 часов. Реакционную смесь обрабатывают путем концентрирования раствора досуха под потоком воздуха, затем разбавляют смесью АЦН/Н₂О (1:1, всего 3 мл) и очищают препаративной ВЭЖХ с использованием способа элюирования 4. Фракции, содержащие продукт, объединяют и концентрируют в вакууме и затем упаривают совместно с АЦН (3 x 2 мл). Промежуточное соединение 1-В получают в виде прозрачного остатка.

[0271] В пробирку, содержащую Промежуточное соединение 1-В (67 мг, 64 мкмоль), добавляют ДХМ (2 мл) и ТФК (2 мл). Полученный раствор перемешивают при температуре окружающей среды в течение 16 часов. Дополнительно добавляют ТФК (2 мл) и реакционную смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 6 часов. Реакционную смесь концентрируют досуха в потоке воздуха, при этом неочищенный продукт окончательно растворяют в АЦН/Н₂О (1 мл 10% АЦН/Н₂О). Неочищенный реакционный раствор затем очищают препаративной ВЭЖХ, используя способ элюирования 5. Фракции, содержащие продукт, объединяют, замораживают и лиофилизируют. Соединение С получают в виде белого твердого вещества. Аликвоту анализируют ВЭЖХ-МС способом элюирования 3.

[0272] ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 600 МГц) δ 7,97-7,91 (м, 2H), 3,77 (т, 2H, J=6,0 Гц), 3,58-3,55 (м, 2H), 3,53-3,48 (м, 8H), 3,44-3,38 (м, 10H), 3,23-3,08 (м, 11H), 3,02 (т, 2H, J=6,0 Гц), 2,93 (ш с, 4H), 2,30 (ш с, 2H), 1,87 (шс, 2H).

Пример 4. Конъюгация и радиоактивное мечение для синтеза конъюгатов [¹⁷⁷Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII (Конъюгата А и Конъюгата В).

[0273] ¹⁷⁷Lu-радиомеченные конъюгаты Соединение С-анти-EGFRvIII можно получить следующим образом: Соединение С (1,4 мкмоль) растворяют в растворе хлористоводородной кислоты (0,001 М). Аликвоту раствора Соединения С (19 мкл, 90 нмоль) добавляют к раствору, содержащему анти-EGFRvIII антитело (1,8 нмоль) в карбонатном буфере (рН 9,5). Через 1 час при температуре окружающей среды, полученный иммуноконъюгат очищают через насадочную колонку со смолой Sephadex G-

50. Иммуноконъюгат Соединение С-анти-EGFRvIII элюируют из колонки ацетатным буфером (рН 6,5). Идентичность элюатов может быть подтверждена, *например*, с помощью MALDI-TOF, при котором получают типовые соотношения хелата к антителу (CAR) 3-4.

[0274] ^{177}Lu (1,6 мКи, 3,9 мкл) добавляют к раствору Соединения С-анти-EGFRvIII (150 мкг в ацетатном буфере (рН 6,5)). Через 40 минут при температуре окружающей среды, неочищенный продукт, [^{177}Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII, очищают через насадочную колонку со смолой Sephadex G-50, элюируя ацетатным буфером.

[0275] Два конъюгата [^{177}Lu]-соединение С-анти-EGFRvIII, *т.е.* Конъюгаты А и В, получают с использованием двух анти-EGFRvIII антител. Более конкретно, Конъюгат А получают с использованием антитела hH2-hL3 к EGFRvIII, содержащего область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:182, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:184.; Конъюгат В получают с использованием антитела hH3-hL1 к EGFRvIII, содержащего область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:180, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:185. Конъюгаты А и В получают с химической чистотой >99%, радиохимической чистотой >99% и удельной активностью 7-10 мКи/мг.

Пример 5. Радиосинтез [^{111}In]- и [^{225}Ac]-радиоиммуноконъюгатов.

Радиосинтез радиоиммуноконъюгата [^{111}In]-Соединение С-анти-EGFRvIII

[0276] В 1,5 мл пробирку Эппендорфа загружают раствор SABST иммуноконъюгата Соединение С-анти-EGFRvIII (0,0492 мл, 3,05 мг/мл, т.е. 0,150 мг; полученного из hH3-hL1 антитела к EGFRvIII по протоколам, аналогичным описанным в **Примере 4** выше), дополнительный SABST для приготовления раствора 2,0 мг/мл и 0,05±0,01 М HCl раствор [^{111}In]Cl₃ (2,0 мКи). Через 60 минут при 37°C, радио-ТСХ анализ реакционной смеси (пластины iTLC-SG, 5% метанол в 0,02 М цитратном буфере в качестве подвижной фазы) показывает радиохимическое превращение (RCC) 97%. Очистку проводят с использованием 1 мл колонки, наполненной смолой Sephadex G50 (гидратированной с SABST). Фракции продукта элюируют с применением SABST и объединяют. Добавляют SABST растворы L-аскорбата натрия и гидрата тринатриевой соли кальция диэтиленetriамин-пентауксусной кислоты (ДТРА) с получением конечного состава, содержащего 10 мМ аскорбата и 1 мМ ДТРА. Анализ полученного состава с помощью радио-ТСХ и SEC-ВЭЖХ в конце синтеза (EOS) показывает образование [^{111}In]-Соединения С-анти-EGFRvIII (364 мкл, 0,299 мг/мл, удельная активность 8,9 мКи/мг, радиохимическая чистота 99% и химическая чистота >95%).

Радиосинтез радиоиммуноконъюгата [^{111}In]-Соединение С- IgG4.

[0277] В 1,5 мл пробирку Эппендорфа помещают SABST раствор иммуноконъюгата Соединение С-IgG4 (0,0318 мл, 4,72 мг/мл, т.е. 0,150 мг; полученного из антитела S228P к изотипу IgG4 (приобретенного у Bio X Cell, кат. № BE0349-5MG-R),

следуя протоколам, аналогичным описанным в **Примере 4** выше), дополнительный SABST для приготовления раствора 2,0 мг/мл и 0,05±0,01 М HCl раствор [¹¹¹In]Cl₃ (2,25 мКи). Через 60 минут при комнатной температуре, радио-ТСХ-анализ реакционной смеси (пластины iTLC-SG, 5% метанол в 0,02 М цитратном буфере в качестве подвижной фазы) показывает радиохимическое превращение (RCC) 99%. Очистку проводят с использованием 1 мл колонки, наполненной смолой Sephadex G50 (гидратированной с SABST). Фракции продукта элюируют с использованием SABST и объединяют. Добавляют SABST растворы L-аскорбата натрия и гидрата тринатриевой соли кальция диэтилентриамин-пентауксусной кислоты (ДТРА) с получением конечного состава, содержащего 10 мМ аскорбата и 1 мМ ДТРА. Анализ полученного продукта с помощью радио-ТСХ и SEC-ВЭЖХ в конце синтеза (EOS) показывает образование [¹¹¹In]-Соединение C-IgG4 (364 мкл, 0,362 мг/мл, удельная активность 9,3 мКи/мг, радиохимическая чистота 99% и химическая чистота >95%).

Радиосинтез радиоиммуноконъюгата [²²⁵Ac]-Соединение C-анти-EGFRvIII

[0278] В 1,5 мл пробирку Эппендорфа загружают SABST раствор иммуноконъюгата Соединение C-анти-EGFRvIII (0,0656 мл, 3,05 мг/мл, т.е. 0,200 мг; получен из hH3-hL1 антитела к EGFRvIII в соответствии с протоколами, приведенными в **Примере 4** выше), дополнительный SABST для приготовления раствора 2,0 мг/мл и 0,001 М HCl раствор [²²⁵Ac]Cl₃ (10,9 мКи). Через 2 часа при 37°C, радио-ТСХ-анализ реакционной смеси (пластины iTLC-SG, 5% метанол в 0,02 М цитратном буфере в качестве подвижной фазы) показывает радиохимическое превращение (RCC) 99% (планшет сканируют на радио-ТСХ сканере на следующий день). Очистку проводят с использованием 1 мл колонки, наполненной смолой Sephadex G50 (гидратированной SABST). Фракции продукта элюируют с применением SABST и объединяют. Добавляют SABST растворы L-аскорбата натрия и гидрата тринатриевой соли кальция диэтилентриамин-пентауксусной кислоты (ДТРА) с получением конечного состава, содержащего 10 мМ аскорбата и 1 мМ ДТРА. Анализ полученного состава с помощью радио-ТСХ и SEC-ВЭЖХ в конце синтеза (EOS) показывает образование [²²⁵Ac]-Соединение C-анти-EGFRvIII (461 мкл, 0,406 мг/мл, удельная активность 0,0454 мКи/мг, радиохимическая чистота 99% и химическая чистота >95%).

Радиосинтез радиоиммуноконъюгата [²²⁵Ac]-Соединение C-IgG4

[0279] В 1,5 мл пробирку Эппендорфа загружают SABST раствор иммуноконъюгата IgG4 (0,0847 мл, 4,72 мг/мл, т.е. 0,400 мг; приготовленный из S228P антитела к изотипу IgG4, следуя протоколам, аналогичным описанным в **Примере 4** выше), дополнительный SABST для получения раствора 2,0 мг/мл и 0,001 М HCl раствор [²²⁵Ac]Cl₃ (21,1 мКи). Через 2 часа при 37°C, радио-ТСХ-анализ реакционной смеси (пластины iTLC-SG, 5% метанол в 0,02 М цитратном буфере в качестве подвижной фазы) показывает радиохимическое превращение (RCC) 68% (планшет сканируют на радио-ТСХ сканере на следующий день). Очистку проводят с использованием 1 мл колонки, наполненной смолой Sephadex G50 (гидратированной SABST). Фракции продукта

элюируют с помощью SABST и объединяют. Добавляют SABST растворы L-аскорбата натрия и гидрата тринатриевой соли кальция диэтиленetriамин-пентауксусной кислоты (ДТРА) с получением конечного состава, содержащего 10 мМ аскорбата и 1 мМ ДТРА. Анализ полученного продукта с помощью радио-ТСХ и SEC-ВЭЖХ в конце синтеза (EOS) показывает образование [²²⁵Ac]-Соединения С-IgG4 (463 мкл, 0,773 мг/мл, удельная активность 0,0427 мКи/мг, радиохимическая чистота 99% и химическая чистота 95%).

Пример 6. Связывание *in vitro* конъюгатов [¹⁷⁷Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII

[0280] Исследование проводят для оценки аффинности связывания рецептора конъюгатов [¹⁷⁷Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII, *m.e.* Конъюгатов А и В, с клеточной линией глиобластомы U87-EGFRvIII, сверхэкспрессирующей EGFRvIII (полученной из National Research Council of Canada).

[0281] Материалы, использованные в этом исследовании, суммированы в Таблице 3 ниже.

Таблица 3. Материалы

Название	ММ или количество	Компания	Каталожный №	Характеристики
Конъюгат А	144 кДа			
Конъюгат В	144 кДа			
PBS		Invitrogen		pH 7,4
BSA	□66 кДа	Sigma	A7906	pH 6,5-7,5/1% в 0,15 М NaCl
FBS	500 мл	Invitrogen	12483-020	одобрен, канадское происхождение
Трипсин/ЭДТК		Sigma	T4049	0,25%, 0,2 г ЭДТК
Трипановый синий	960,81	Sigma	T8154	Стерильно фильтрованный, протестирован на клеточной культуре
RPMI	500 мл	Invitrogen	11875-093	С L-глутамином, феноловым красным, без HEPES
DMEM	500 мл	Invitrogen		
Triton X-100	ср. 625	Sigma	T8787	Степень очистки для молекулярной биологии

Буферы:

1. Буфер для клеточного лизата готовят с использованием PBS с 1% Triton X-100.
2. Буфер для связывания клеток готовят с использованием PBS с 0,5% BSA.

[0282] Это исследование проводят в соответствии с процедурами, описанными ниже:

1. Подготовка клеток:

a. Собирают прикрепленные клетки: восстанавливают достаточное количество клеток U87-EGFRvIII из колб T225 с использованием трипсина/ЭДТК и переносят в 50 мл культуральную пробирку. Помещают 50 мкл образца ресуспендированных клеток в микропробирку Эппендорфа и разводят 50 мкл трипанового синего. Заполняют камеру гемоцитометра (10 мкл) и подсчитывают количество присутствующих клеток

i. Подсчитывают клетки в четырех квадрантах области подсчета

ii. Рассчитывают клетки/мл: количество/4 квадранта x коэффициент разведения x 10^4 =клеток/мл

b. Ресуспендируют клетки в среде до конечной концентрации 3×10^5 клеток/мл

c. Высевают $3 \times 10^5/1$ мл U87-EGFRvIII в обозначенную лунку 24-луночного планшета и аккуратно постукивают для равномерного распределения клеток (всего готовят 6 планшетов - 4 U87-EGFRvIII, 2 пустых)

d. Инкубируют планшеты в течение ночи при 37°C и 5% CO₂

2. Анализ связывания:

Блокирующий агент готовят следующим образом: 4500 мкл в концентрации 4 мкМ; Конечная концентрация блокатора 2 мкМ

Для Конъюгата А

- исходный раствор=7,58 мг/мл
- мг/мл=52,64 мкМ, добавляют 342 мкл
- Связывающий буфер: 4158 мкл

Для Конъюгата В

- исходный раствор=6,7 мг/мл
- мг/мл=46,53 мкМ, добавляют 387 мкл
- Связывающий буфер: 4113 мкл

a. Удаляют среду из двух планшетов

b. Промывают планшеты один раз 1 мл PBS

c. Добавляют 200 мкл связывающего буфера в ТВ лунку и пустую лунку

d. Добавляют 200 мкл блокирующего агента в NSB лунку и инкубируют 1 ч на льду

Приготовление горячего изделия:

i. Готовят 4000 мкл 160 нМ Конъюгата А. (Пробирка 1) из исходного раствора (0,390 мг/мл=2,71 мкМ) с использованием связывающего буфера

- Конъюгат А: 236,2 мкл
- Связывающий буфер: 3763,8 мкл
- 2-кратное разведение Пробирки 1 (всего 8 разведений)

ii. Готовят 4000 мкл 160 нМ Конъюгата В (Пробирка 1) из исходного раствора

(0,341 мг/мл=2,37 мкМ) с использованием связывающего буфера

- Конъюгат В: 270 мкл
- Связывающий буфер: 3730 мкл
- 2-кратное разведение Пробирки 1 (всего 8 разведений)

e. Добавляют 200 мкл конц. Конъюгата А или Конъюгата В (всего 8 конц.) в ТВ, NSB и пустую лунку

f. Инкубируют 2 часа на льду

g. Готовят стандарты для концентраций 160, 80, 40 и 20 нМ - 200 мкл исходных растворов (Пробирки 1, 2, 3, 4 в двух экземплярах) для добавления в другую пробирку для счета гамма-излучения

h. Постукивают по планшету, чтобы выбить клетки из планшета, и ресуспендируют клетки в каждой лунке планшета

i. Переносят связывающий раствор и клетки из каждой лунки в 1,5 мл пробирки

j. Промывают планшет 1 мл холодного PBS и переносят в пробирки

k. Вращают на максимальной скорости в течение 15 секунд

l. Отсасывают раствор и добавляют в пробирки по 1 мл холодного 1x PBS

m. Повторяют промывку всего (2) промывками PBS

n. Центрифугируют и отсасывают

o. Лизируют клетки с 300 мкл 1% Triton X-100. Инкубируют пробирки в течение 30 секунд при комнатной температуре, слегка покачивая

p. Переносят 250 мкл клеток лизата в обозначенную пробирку для подсчета гамма-излучения

q. Подсчитывают стандарты на дозкалибраторе

r. Подсчитывают образцы и стандарты на гамма-счетчике

s. Определяют концентрацию белка (анализ BCA), используя оставшийся лизат (25 мкл)

t. Рассчитывают Kd с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Анализируют кривую прямого связывания, используя нелинейную аппроксимацию кривой с помощью модели связывания с одним сайтом.

[0283] Результаты исследования связывания *in vitro* показаны на **ФИГ. 5А** и **5В**. Обнаружено, что два радиоиммуноконъюгата EGFRvIII, *т.е.* Конъюгаты А и В, демонстрируют высокую аффинность связывания 6,78 нМ и 2,75 нМ, соответственно.

Пример 7. Оценка интернализации конъюгатов [¹⁷⁷Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII

[0284] Проводят исследование для оценки интернализации конъюгатов [¹⁷⁷Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII, *т.е.* Конъюгатов А и В, с клеточной линией глиобластомы U87-EGFRvIII, сверхэкспрессирующей EGFRvIII (полученной от National Research Council of Canada) следуя протоколу, описанному ниже.

[0285] Основная цель данного исследования состоит в том, чтобы: 1) количественно измерить количество радиоактивно меченного тестируемого изделия, *т.е.*

радиоиммуноконъюгата EGFR ν III, на клеточной поверхности и внутри клеток; и 2) определить количество интернализированного тестируемого изделия, которое извлекают из среды, сохраняют в клетках или возвращают обратно на поверхность клетки.

[0286] Материалы, использованные в этом исследовании, суммированы в Таблице 4 ниже.

Таблица 4. Материалы

Название	ММ или количество	Компания	Каталожный №	Характеристики
Тестируемое изделие (mAb)	144 кДа	Fusion	Конъюгат А-03 Конъюгат В-03	Моноклональное антитело
PBS				pH 7,4
BSA	□66 кДа	Sigma	A7906	pH 6,5-7,5/1% в 0,15 М NaCl
FBS	500 мл	Invitrogen	12483-020	одобрен, канадское происхождение
Трипсин/ЭДТК		Sigma	T4049	0,25%, 0,2 г ЭДТК
Трипановый синий	960,81	Sigma	T8154	Стерильно фильтрованный, протестирован на клеточной культуре
DMEM	500 мл	Invitrogen	11995-073	С высоким содержанием глюкозы, L-глутамина, фенолового красного, пирувата натрия, без HEPES
Пенициллин/стрептомицин		Sigma	P0781	С 10000 единиц Pen и 10 мг Strep/мл в солевом растворе
NaCl	58,44	Sigma	S3014	

CaCl ₂	110,98	Sigma	C5670	Безводный
ацетат Na	82,03	Sigma	S8750	
NaOH	40	Sigma	S5881	гранулы
HCl	36,46	Sigma	H1758	36,5-38%
Triton X-100	пр. 625	Sigma	T8787	Степень очистки для молекулярной биологии

Буферы:

3. Мягкий кислотный промывочный буфер (pH 4,6) готовят из 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ и 20 mM NaAc.

4. Кислотный промывочный буфер (pH 2,5) готовят из 500 mM NaCl и 200 mM NaAc.

5. Буфер для клеточного лизата Triton готовят с использованием 1,0% Triton X-100. [0287] В этом исследовании применяют следующие процедуры:

1. Получение клеток:

a. За 16-24 часа до начала анализа собирают клетки U87-EGFR^{vIII}: удаляют среду из клеток в T75, промывают PBS и ресуспендируют клетки в 1 мл питательной среды, пипетируя вверх и вниз для ресуспендирования. Заполняют камеру гемоцитометра (10 мкл) и подсчитывают количество присутствующих клеток

b. Ресуспендируют клетки в среде до конечной концентрации 3×10^5 клеток/мл

c. Высевают 3×10^5 клеток в обозначенную лунку 24-луночного планшета и аккуратно постукивают для равномерного распределения клеток

d. Высевают три пустых (без клеток) лунки, заполненные 1 мл среды DMEM/лунку

e. Инкубируют в течение ночи при 37°C и 5% CO₂.

Планшет 0 ч, 2 ч, 24 ч для каждого антитела (6 планшетов):

2. Получение тестируемого изделия и стандартов:

a. Готовят 15 мл 10 нМ радиоактивно меченного тестируемого изделия (примерно 2х Кд) из исходного раствора, используя среду без FBS (DMEM):

Конъюгат А=0,421 мг/мл=2,8 мкМ

15000 мкл x 10 нМ=2,8 мкМ (x мкл)

53,6 мкл исходного антитела Конъюгата А в 15 мл DMEM (без FBS)

Конъюгат В=0,448 мг/мл=2,99 мкМ

15000 мкл x 10 нМ=2,99 мкМ (x мкл)

50,2 мкл исходного антитела Конъюгата В в 15 мл DMEM (без FBS)

b. Готовят 3 стандартных аликвоты по 800 мкл каждая на пробирку (и считывают на дозкалибраторе на следующий день)

3. Методика:

a. Удаляют среду из планшетов

b. Сывороточное голодание: добавляют 1 мл свежей среды без FBS в каждую лунку

на 1 час при 37°C.

- c. Промывают планшеты один раз 1 мл PBS (стерилизованным)
- d. Загружают 500 мкл тестируемого изделия во все лунки. Готовят тестируемое изделие в среде менее чем за 15 минут до добавления
- e. Инкубируют планшеты в течение 2 часов при 37°C
- f. После инкубации, сразу же удаляют планшеты из инкубатора и помещают на лед
- g. Обработывают планшеты следующим образом:
 - 1) Планшет 2 ч и 24 ч:
 - Переносят среду в предварительно маркированные пробирки для счета гамма-излучения (не связанную)
 - Промывают клетки один раз холодным PBS (1 мл) и добавляют в не связанную пробирку
 - Добавляют мягкий кислотный промывочный буфер (pH=4,6) (500 мкл) во все лунки
 - Инкубируют 15 секунд при 4°C и переносят раствор в предварительно маркированную пробирку для счета гамма-излучения (мембраносвязанную)
 - Добавляют 1 мл подогретой среды во все лунки и инкубируют планшеты при 37°C с 5% CO₂ в течение назначенного времени (2 часа и 24 часа).
 - 2) Планшет 0 ч:
 - Переносят среду в предварительно маркированную пробирку для счета гамма-излучения (не связанную)
 - Промывают планшеты один раз 1 мл холодного PBS и добавляют в несвязанную пробирку
 - Добавляют в лунки 500 мкл промывочного буфера с сильной кислотой (pH=2,5)
 - Инкубируют 5 секунд на льду
 - Собирают кислотный промывочный буфер в предварительно маркированную пробирку для счета гамма-излучения (мембраносвязанную)
 - Лизируют клетки 300 мкл 1% буфера Triton X-100 в течение 30 секунд при комнатной температуре с легким встряхиванием
 - Переносят 250 мкл лизата в обозначенную пробирку для счета гамма-излучения (интернализированную)
 - Подсчитывают образцы и стандарт на гамма-счетчике на следующий день
- h. После инкубации
 - 1) Планшет 2 ч и 24 ч:
 - Останавливают инкубацию в разное время, поместив планшеты на лед
 - Переносят среду в предварительно маркированную пробирку для счета гамма-излучения (эффлюксную)
 - Промывают планшеты один раз 1 мл холодного PBS и добавляют в эффлюксную пробирку
 - Добавляют в лунки 500 мкл промывочного буфера с сильной кислотой (pH=2,5)

- Инкубируют 5 секунд на льду
- Собирают кислотный промывочный буфер в предварительно маркированную пробирку для счета гамма-излучения (рециркулированную)
- Лизируют клетки 300 мкл 1% Triton X-100 в течение 30 секунд при комнатной температуре и слегка встряхивают
- Переносят 250 мкл клеток лизата в обозначенную пробирку для счета гамма-излучения (удержанную)
- Подсчитывают образцы и стандарт на гамма-счетчике на следующий день

4. Анализ

а. Рассчитывают долю несвязанного, мембраносвязанного, интернализованного, эффлюксного, рециркулированного или удержанного тестируемого изделия, соответственно.

i. Расчеты общей активности:

- Доля свободного (несвязанного; F)=CPM (несвязанный)/CPM (несвязанный+мембраносвязанный+интернализированный)
- Доля клеточно-ассоциированного=100 - доля свободного
- Доля интернализованного=CPM (интернализированный)/CPM (несвязанный+мембраносвязанный+интернализированный)

ii. Расчеты клеточно-ассоциированной активности:

Для 0 ч планшета (t= 0)

- Доля мембраносвязанного=CPM (мембраносвязанный)/CPM (мембраносвязанный+интернализированный)
- Доля интернализованного=CPM (интернализированный)/CPM (мембраносвязанный+интернализированный)

Для 2, 24 ч планшетов

- Доля мембраносвязанного (при t=0)=CPM (мембраносвязанный)/CPM (мембраносвязанный+эффлюксный+рециркулированный+удержанный)
- Доля интернализованного (при t=0)=CPM (эффлюксный+рециркулированный+удержанный)/CPM (мембраносвязанный+эффлюксный+рециркулированный+удержанный)

iii. Расчеты внутренней активности (t=2 ч или 24 ч):

- Доля эффлюксного=CPM (эффлюксный)/CPM(эффлюксный+рециркулированный+удержанный)
- Доля рециркулированного=CPM (рециркулированный)/CPM (эффлюксный+рециркулированный+удержанный)
- Доля удержанного=CPM (удержанный)/CPM (эффлюксный+рециркулированный+удержанный)

б. CPM (интернализированный) и CPM (удержанный) необходимо скорректировать с учетом объема (300/250), и 24 ч подсчет необходимо скорректировать с учетом затухания с использованием стандартов

с. Строят график доли клеточно-ассоциированного интернализованного тестируемого изделия (ii; $t=0$), и удержанного тестируемого изделия (iii; $t=2$ и 24 часа) в зависимости от времени инкубации с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®.

[0288] Результаты исследования интернализации показаны на **ФИГ. 6А-6В** и **7А-7С**. Как показано на **ФИГ. 6А** и **6В**, оба Конъюгата А и В имеют примерно 70% мембраносвязанных и примерно 30% интернализированных через 24 ч, без существенной разницы между двумя конъюгатами.

[0289] Как показано на **ФИГ. 7А-7С**, оба Конъюгата А и В показывают сходную кинетику. По сравнению с Конъюгатом А, Конъюгат В имеет несколько более высокий эффлюкс (42% против 26% через 24 часа). % удержанного через 24 ч немного ниже для Конъюгата В (51%) по сравнению с Конъюгатом А (66%), что можно объяснить более высоким эффлюксом при использовании Конъюгата В.

Пример 8. Биораспределение *in vivo* конъюгатов [^{177}Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII в модели подкожной U87-EGFRvIII

[0290] Модель ксенотрансплантата клеточной линии U87-EGFRvIII используют для оценки *in vivo* биораспределения конъюгатов [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII. Два конъюгата [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII, *т.е.* Конъюгаты А и В, синтезируют с использованием чистого R энантиомера Соединения С (см. Пример 4), двух гуманизированных вариантов анти-EGFRvIII антитела 4E11 и лютеция-177.

[0291] Группам животных с опухолями внутривенно вводят конъюгаты [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII. Дозы содержат примерно 9,6-9,8 микрокюри (мкКи)/мкг активности на 2 мкг (0,1 мг/кг) антитела. Животных подвергают эвтаназии через 4, 24, 96 и 168 ч после инъекции для определения уровней радиоактивности в крови, сердце, кишечнике, почках, печени, легких, селезенке, опухоли, моче и хвосте ($n=3$ на момент времени).

[0292] Результаты выражают как доли инъецированной дозы на грамм ткани (% ИД/г) и они показаны на **ФИГ. 8А** и **8В** (для Конъюгата А и Конъюгата В, соответственно). Оба конъюгата показывают выведение радиоактивности из крови в течение 168 часов, низкое поглощение [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII в нормальных тканях и высокое поглощение [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII в опухолях. Превосходное поглощение опухолью через 96 часов продемонстрировано для обоих конъюгатов. Например, Конъюгаты А и В показывают превосходное поглощение опухолью с примерно $88,6 \pm 9,5\%$ ИД/г и примерно $85,5 \pm 9,9\%$ ИД/г, соответственно, через 96 часов после введения дозы в модели подкожных U87-EGFRvIII.

Пример 9. Биораспределение *in vivo* конъюгатов [^{177}Lu]-Соединение С-анти-EGFRvIII в ортотопической модели U87-EGFRvIII-GFP-Luc

[0293] Ортотопическую модель U87-EGFRvIII-GFP-Luc используют для оценки *in vivo* биораспределения радиоактивно меченых конъюгатов анти-EGFRvIII, *т.е.* Конъюгатов А и В.

[0294] Группам животных с опухолями внутривенно вводят [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII. Дозы содержат примерно 9,6-9,8 микрокюри (мкКи)/мкг активности на 2 мкг (0,1 мг/кг) антитела. Животных подвергают этаназии через 96 часов после инъекции для определения уровней радиоактивности в крови, опухоли, нормальном головном мозге, селезенке, печени, почках и хвосте (n=10 на каждый момент времени для Конъюгата А и n=10 на каждый момент времени для Конъюгата В).

[0295] Результаты выражают как долю инъецированной дозы на грамм ткани (% ИД/г) и они изображены на **ФИГ. 9**. Оба конъюгата показывают хорошее поглощение крови [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII, низкое поглощение [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII в нормальных тканях и высокое поглощение [^{177}Lu]-ДОТА-анти-EGFRvIII в опухолях головного мозга через 96 часов. Например, Конъюгаты А и В показывают превосходное поглощение опухолью головного мозга с примерно $52,4 \pm 2,9\%$ ИД/г и примерно $49,1 \pm 2,6\%$ ИД/г, соответственно, через 96 часов после дозирования в ортотопической модели U87-EGFRvIII-GFP-Luc. Высокое поглощение опухолью головного мозга указывает на хорошую проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и, вероятно, связано с негерметичной сосудистой сетью.

Пример 10. Биораспределение *in vivo* [^{111}In]-Соединение С-анти-EGFRvIII и [^{111}In]-Соединение С-IgG4 в ортотопических моделях ксенотрансплантатов, полученных от пациента (PDX)

[0296] Специфичность к мишени и поглощение опухолью [^{111}In]-соединения С-анти-EGFRvIII (см. **Пример 5** выше) исследуют в исследовании биораспределения с визуализацией с использованием моделей ортотопической мультиформной глиобластомы (GBM) PDX с различной степенью проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Хотя все опухоли GBM имеют некоторую степень проницаемости ГЭБ как характеристику заболевания, она может значительно различаться между опухолями и даже внутри одной и той же опухоли. Большой размер антител (примерно 150 кДа) не позволяет им пересекать интактный ГЭБ, и внутривенное введение радиоактивно меченных анти-EGFRvIII иммуноконъюгатов может зависеть от проницаемости ГЭБ для доставки в опухоли GBM. Чтобы охарактеризовать степень поглощения опухолью после внутривенного введения [^{111}In]-Соединение С-анти-EGFRvIII, проводят исследование биораспределения с визуализацией на модели GBM PDX с относительно интактным ГЭБ (G06-GFP-Luc) и другой модели с полностью нарушенным ГЭБ (G39-GFP-Luc). Кроме того, для подтверждения специфичности к мишени, биораспределение не таргетного [^{111}In]-Соединение С-IgG4 (см. **Пример 5** выше) также оценивают для сравнения.

[0297] Ортотопические опухоли GBM PDX создают у самок бестимусных голых мышей Balb/c в возрасте 7-8 недель путем внутривенной инъекции 3×10^5 клеток G06-GFP-Luc или $2,5 \times 10^5$ клеток G39-GFP-Luc в 3 мкл PBS. Клетки вводят в правое полушарие головного мозга на 1 мм сзади от брегмы, на 1,5 мм правее сагиттального шва и на глубину 2,5 мм. Биоломинесцентную 3D-томографию (BLT) проводят через 13 дней после внутривенной инъекции для подтверждения наличия опухолей и определения их

объемов. 150 мг/кг D-люциферина в PBS вводят мышам внутрибрюшинно за 15 минут до визуализации. Мышей анестезируют изофлураном и помещают на слой для визуализации. Изображения получают с использованием модуля оптической визуализации (OI) системы визуализации VECTor⁶CT SPECT/PET/CT/OI и реконструируют с использованием программного обеспечения MiLabs BLT Recon 1.0. Объем опухоли количественно определяют с использованием программного обеспечения Imalytics и анализа исследуемой области (ROI). Мышей делят на группы в зависимости от размера опухоли так, чтобы каждая группа имела относительно равное распределение объемов опухоли.

[0298] Мышам с опухолями внутривенно через латеральную хвостовую вену вводят 0,2 мл [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII или [¹¹¹In]-Соединение С-IgG4, содержащего 100 мкКи радиоактивности (10,8-11,8 мкг антитела), составленных в 20 мМ цитрата натрия, pH 5,5, 0,82% NaCl, 0,01% Tween 80 (n=4 мыши/соединение). Визуализацию BLT и ОФЭКТ/КТ проводят через 96 часов после инъекции с использованием системы визуализации VECTor⁶CT SPECT/PET/CT/OI для определения биораспределения в тканях. Изображения реконструируют с использованием программного обеспечения MiLabs BLT Recon 1.0, и поглощение опухолью/нормальной тканью определяют с использованием программного обеспечения PMOD. Поглощение рассчитывают как долю введенной дозы на кубический сантиметр ткани (% ИД/см³).

[0299] В модели G39-GFP-Luc PDX с нарушенным ГЭБ, данные биораспределения [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII демонстрируют высокое поглощение опухолью 50,2±13,6% ИД/см³ через 96 ч. Для сравнения, не таргетное [¹¹¹In]-Соединение С-IgG4 имеет поглощение опухолью 17,4±1,2% ИД/см³ через 96 часов, подтверждая, что большая часть поглощения [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII опухолью является мишень-специфическим. Важно отметить, что нормальный головной мозг демонстрирует очень низкое поглощение (1,6-2,1% ИД/см³), что является дополнительным доказательством опухолеспецифического поглощения [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII (**ФИГ. 10В и 11D**). Все другие оцениваемые нормальные органы имеют поглощение ≤10% ИД/см³, за исключением органов с высокой перфузией, таких как печень и сердце, которые представляют большую часть пула крови.

[0300] В модели G06-GFP-Luc PDX с относительно интактным ГЭБ, данные биораспределения [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII демонстрируют поглощение опухолью 10,4±1,6% ИД/см³ через 96 ч, в то время как не таргетный [¹¹¹In]-Соединение С-IgG4 имеет поглощение опухолью 9,4%±1,7% ИД/см³ через 96 ч (**ФИГ. 11В и 11D**). Эти результаты согласуются с неспособностью антител пересекать интактный ГЭБ в этой модели. Поглощение в нормальных тканях аналогично опухолевому (<10% ИД/см³), за исключением органов с высокой перфузией, таких как печень и сердце, которые составляют большую часть пула крови.

[0301] Результаты исследований биораспределения с визуализацией подтверждают, что поглощение [¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII является высоко опухолеспецифичным с минимальным нецелевым поглощением в нормальных тканях.

Далее продемонстрировано, что высокое поглощение опухолями [^{111}In]-Соединение С-анти-EGFRvIII может быть достигнуто посредством внутривенного введения в опухолях с сильно разрушенным ГЭБ, но поглощение ограничивается интактным ГЭБ.

Пример 11. Радиотерапевтическая эффективность однократной дозы [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII на моделях ортотопической глиобластомы на мышах

[0302] Радиотерапевтическую эффективность однократной дозы [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII (см. **Пример 5** выше) определяют с использованием моделей мультиформной ортотопической глиобластомы (GBM), созданных с использованием клеточной линии U87-EGFRvIII-GFP-Luc или модели ксенотрансплантата, полученного от пациента (PDX), G06-GFP-Luc. Как клеточную линию GBM, так и клетки PDX трансдуцируют лентивирусными частицами, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок (GFP) и люциферазу (Luc), для целей визуализации *in vivo* и *ex vivo*. Опухоли головного мозга GBM создают у самок бестимусных голых мышей Balb/c в возрасте 7-8 недель путем внутривенной инъекции 2×10^4 клеток U87-EGFRvIII-GFP-Luc или 3×10^5 клеток G06-GFP-Luc в 3 мкл PBS. Клетки вводят в правое полушарие головного мозга на 1 мм сзади от брегмы, на 1,5 мм правее сагиттального шва и на глубину 2,5 мм. Биоломинесцентную визуализацию (BLI) проводят через 8-10 дней после внутривенных инъекций для подтверждения наличия опухолей и количественной оценки опухолевой нагрузки. 150 мг/кг D-люциферина в PBS вводят мышам внутривенно за 15 мин до визуализации. Сигнал BLI количественно оценивают в исследуемой области (ROI), нарисованной вокруг опухоли, и выражают как усредненный по площади сигнал. Усредненный по площади сигнал представляет собой измерение опухолевой нагрузки, и мышам распределяют по группам таким образом, чтобы средний сигнал опухоли BLI был одинаковым во всех группах.

[0303] Терапию начинают через 10-13 дней после внутривенной инъекции и после того, как опухоли подтверждают визуализацией. Мышам с опухолями вводят внутривенно (в/в) через латеральную хвостовую вену 0,2 мл [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII, составленного в 20 мМ цитрате натрия, pH 5,5, 0,82% NaCl, 0,01% Tween 80 или только носителе для контрольных мышей (n=5/группу). Тестируемые образцы, радиоактивно меченные актинием-225, содержат 100-200 нКи активности (до 4 мкг белка антитела/дозу). Мышей взвешивают три раза в неделю и ежедневно проверяют на наличие признаков развития опухоли головного мозга, таких как сгорбленная поза, летаргия, судороги, нарушение подвижности, паралич или увеличение черепа. Для модели клеточной линии U87-EGFRvIII-GFP-Luc, BLI используют для мониторинга опухолевой нагрузки и ответа на терапию с течением времени. Мышей визуализируют один раз в неделю, как описано выше, и сигналы BLI наносят на график как кратное изменение от усредненного сигнала опухоли по площади до обработки для определения терапевтического ответа. Животных подвергают эвтаназии при достижении гуманных конечных точек (потеря веса >20%, BC2) или при появлении признаков опухолей головного мозга (как описано выше). Общую выживаемость строят по кривой

выживаемости Каплана-Мейера. Лог-ранговый тест (Мантеля-Кокса) используют для статистического сравнения выживаемости между группами и определения р-значений. Чтобы облегчить интерпретацию ответа на лечение между моделями, преимущество в выживаемости для данного лечения рассчитывают путем определения соотношения медианы выживаемости мышей, получающих лечение, по сравнению с контролем носителем.

[0304] Радиотерапевтические исследования [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII на модели клеточной линии U87-EGFRvIII-GFP-Luc демонстрируют значительную терапевтическую эффективность как при дозах 100 нКи, так и при дозах 200 нКи. Анализ ВЛI показал, что рост опухоли значительно подавлен по сравнению с контрольной группой носителя (**ФИГ. 12А**). В группе с дозой 200 нКи, опухоли демонстрируют почти полное подавление опухоли вплоть до 28 дня. Подавление роста опухоли в ответ на лечение приводит к значительному увеличению выживаемости. Медиана выживаемости в контрольной группе носителя составляет 17 дней против 43 дней в группе 100 нКи и 55 дней в группе 200 нКи, что соответствует увеличению выживаемости 2,5 и 3,2, соответственно. Эти различия в выживаемости являются статистически значимыми ($p < 0,05$, тест Мантеля-Кокса) (**ФИГ. 12В; ФИГ. 12С**). Аналогично, модель G06-GFP-Luc PDX демонстрирует значительное улучшение выживаемости в ответ на лечение [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII. Медиана выживаемости в контрольной группе носителя составляет 26 дней, тогда как в группах с дозами 100 нКи и 200 нКи медиана выживаемости составляет 39 дней и 80 дней, соответственно. По сравнению с контрольной группой носителя, группа с дозой 200 нКи демонстрирует значительное преимущество в выживаемости, равное 3,1, тогда как группа с дозой 100 нКи демонстрирует более скромное преимущество в выживаемости, равное 1,5 (**ФИГ. 13А и 13В**). В совокупности, эти результаты демонстрируют, что однократная доза [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII значительно замедляет рост опухоли дозозависимым образом и продлевает выживаемость на множественных моделях ортотопических ксенотрансплантатов GBM.

Пример 12. Фракционная многодозовая радиотерапевтическая эффективность [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII на моделях ортотопической глиобластомы на мышах

[0305] Радиотерапевтическую эффективность [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII исследуют с использованием модели ортотопического ксенотрансплантата GBM, полученного от пациента (PDX). Множественные фракционированные дозы [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII или [^{225}Ac]-Соединение С-IgG4 (см. **Пример 5** выше) сравнивают с введением однократной дозы для определения оптимальной схемы дозирования для максимизации терапевтической эффективности. Помимо схемы дозирования, исследование проводят, как описано выше для исследований радиотерапевтической эффективности однократной дозы.

[0306] Мышам с ортотопическими опухолями G39-GFP-Luc вводят [^{225}Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII в однократной дозе 100, 200 или 400 нКи или общей

суммарной радиохимической дозе 400 нКи, фракционированной следующим образом: вводят 100 нКи один раз в неделю в течение 4 недель (100 нКи x 4) или 200 нКи каждые 2 недели по 2 дозы (200 нКи x 2). Каждая доза содержит 8,6 мкг белка антитела. Контрольным группам вводят разовую дозу [²²⁵Ac]-Соединение С-IgG4, содержащего либо 200 нКи, либо 400 нКи радиоактивности (9,4 мкг белка антитела/дозу), либо только носитель (n=5 мышей/группу).

[0307] Анализ выживаемости показывает дозозависимое увеличение выживаемости в ответ на лечение [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII. Преимущества в выживаемости в группах, получающих 400 нКи однократную дозу или фракционированную дозу [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII, сопоставимы с соотношениями преимущества в выживаемости 3,1, 3,2 и 3,1 для групп однократной дозы 400 нКи, фракционированной 200 нКи x 2, и фракционированной дозы 100 нКи x 4, соответственно. Эти результаты дополнительно демонстрируют, что эффективность связана с общей дозой радиоактивности, независимо от схемы дозирования. Кроме того, преимущество в выживаемости при однократной дозе 400 нКи [²²⁵Ac]-Соединение С-IgG4 значительно ниже (1,9), подтверждая, что, по меньшей мере, некоторая терапевтическая эффективность [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII опосредована мишенью (**ФИГ. 14А и 14В**).

Пример 13. Терапевтическая эффективность [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII в комбинации со стандартом лечения

[0308] Стандартом лечения (SoC) пациентов с GBM является максимальная хирургическая резекция с последующей дистанционной лучевой терапией (EBRT) в комбинации с химиотерапевтическим темозоломидом (TMZ). Терапевтическую эффективность комбинированного SoC и [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII по сравнению с моноагентом тестируют с использованием ортотопической модели G06-GFP-Luc GBM PDX. Опухоли прививают и проверяют с помощью BLT визуализации, как описано выше. Мышам с опухолями вводят однократную внутривенную дозу (0,2 мл) только носителя, дозу 200 нКи [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII или дозу 200 нКи [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII в комбинации с TMZ (25 мг/кг вводят ежедневно в течение 5 дней через пероральный зонд). Две дополнительные группы лечения (только SoC и группа комбинации) получают 2 Гр DLT один раз в день в течение 5 дней подряд в комбинации с 25 мг/кг темозоломид (вводят ежедневно в течение 5 дней через пероральный зонд за 1 час до DLT). Затем группа комбинации получают однократную дозу 200 нКи [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII через 6 дней после завершения лечения EBRT/TMZ (n=5 мышей/группу).

[0309] Анализ выживаемости показывает, что все из только SoC (2 Гр x 5 EBRT+25 мг/кг TMZ), 200 нКи [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII и 200 нКи [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII в комбинации с TMZ значительно увеличивают выживаемость по сравнению с группой контрольного носителя с преимуществом в выживаемости примерно 2 для всех. Однако комбинированное лечение SoC (2 Гр x 5 EBRT+25 мг/кг TMZ) с

последующим введением 200 нКи [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII приводит к значительному увеличению выживаемости (преимущество в выживаемости 3,6) по сравнению с лечением только SoC, [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII или [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII в комбинации с TMZ (преимущество в выживаемости составляет приблизительно 2) (ФИГ. 15А и 15В). Эти результаты позволяют предположить, что комбинированное лечение [²²⁵Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII и SoC может обеспечить значительное преимущество в выживаемости по сравнению с обычным лечением GBM только SoC.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0310] Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дальнейшие модификации, и данная заявка предназначена для охвата любых вариаций, применений или адаптаций изобретения, следующих в целом принципам изобретения и включающих такие отклонения от настоящего описания, которые входят в известную или общепринятую практику в области техники, к которой относится изобретение, и могут быть применены к существенным признакам в настоящем документе, изложенным выше.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности.

В некоторых последовательностях, CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

ИД посл.	Описание	Последовательность
1	Аминокислотная последовательность EGFR человека дикого типа (сигнальный пептид выделен жирным и подчеркнут)	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTS NKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQR NYDLSFLKTIQEVAGYVLIANTVERIPLLENLQIRGN MYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHG AVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNH LGSCQKCDPSPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCS GRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRD EATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCV KKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCK KCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSIS GDLHILPVAFRGDSFHTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSL NITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGP EPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVK TCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGC TGPGLGECPTNGPKIPSIAATGMVGALLLLLVALGIGL FMRRRHIVRKRTLRLQLERELVEPLTPSGEAPNQALL RILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPV AIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLG ICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLN WCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTQPQHV KITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVIKWMALLESILH RIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSI

		<p>LEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRE LIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRAL MDEEDMDDVVDADAYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLS ATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGAL TEDSIDDFTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPL NPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFD SPAHWAAQKGSQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKG STAENAEYLRVAPQSSEFIGA</p>
2	<p>Последовательность кДНК эктодомена EGFR человека дикого типа</p>	<p>CTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCACGAGTAA CAAGCTCACGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATT TCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTGAGGT GGTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAG GAATTATGATCTTTCTTCTTAAAGACCATCCAGGA GGTGGCTGGTTATGTCCTCATTGCCCTCAACACAGT GGAGCGAATTCCTTTGGAAAACCTGCAGATCATCA GAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCTTA GCAGTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCGG ACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAAATTTACAGGAAA TCCTGCATGGCGCCGTGCGGTTTCAGCAACAACCTG CCCTGTGCAACGTGGAGAGCATCCAGTGGCGGGAC ATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTCCGATG GACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTG TGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCTGCTGGGGTG CAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATC ATCTGTGCCAGCAGTGCTCCGGGCGCTGCCGTGGC AAGTCCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCT GCAGGCTGCACAGGCCCGGGAGAGCGACTGCCT GGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCACGTGCA AGGACACCTGCCCCCACTCATGCTCTACAACCCCA CCACGTACCAGATGGATGTGAACCCCGAGGGCAA TACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCC CGTAATTATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCGTC CGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGA AGACGGCGTCCGCAAGTGTAAGAAGTGC GAAGGGC CTTGCCGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGT GAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAAT ATTAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGC GATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGAC TCCTTACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAA CTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGG GTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGAC GGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATA CGGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTG</p>

		<p>CAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTAC GCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATA ATTTAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATAC AATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTC AGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAA CAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCT TGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCC AGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGG CAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGG GTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGC ATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCAT GAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAAC GTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCACT GCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAA ACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGG CCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTA CGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAA CGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCC</p>
3	Аминокислотная последовательность эктодомена EGFR человека	<p>LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEV VLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVER IPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKEL PMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFL SNMSMDFQNHLSGQKCDPSPNGSCWGAGEENCQ KLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRE SDCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTYQMDVNP EGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGGSCVRACGADSYE MEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELD ILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQ HGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCY ANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHA LCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGE PREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCH LCHPNCTYGCTGPGLEGCPNPKIPS</p>
4	Последовательность кДНК эктодомена EGFRvIII человека (нуклеотиды 1-996)	<p>CTGGAAGAGAAGAAAGGCAACTACGTCGTGACCGA CCACGGCAGCTGTGTGCGGGCTTGTGGCGCCGATA GCTACGAGATGGAAGAGGACGGCGTGCGGAAGTGC AGAAGTGCGAGGGCCCCTGCCGAAAGTGTGCAA CGGCATCGGCATCGGAGAGTTCAAGGACAGCCTGA GCATCAACGCCACCAACATCAAGCACTTCAAGAAC TGCACCAGCATCAGCGGCGACCTGCACATCCTGCC CGTGGCCTTTAGAGGGCGACAGCTTACCCACACCCC CCCCTGGACCCCCAGGAACTGGACATCCTGAAAA CCGTGAAAGAGATCACCGGCTTTCTGCTGATTCAGG CCTGGCCCCGAGAACCGGACAGACCTGCACGCCTTC GAGAACCTGGAAATCATCCGGGGCAGGACCAAGCA GCACGGCCAGTTTTCTCTGGCCGTGGTGTCCCTGAA CATCACCAGCCTGGGCCTGCGGAGCCTGAAAGAAA TCAGCGACGGCGACGTGATCATCTCCGGCAACAAG AACCTGTGCTACGCCAACACCATCAACTGGAAGAA GCTGTTCGGCACCTCCGGCCAGAAAACAAGATCA</p>

		TCAGCAACCGGGGCGAGAACAGCTGCAAGGCCACA GGACAAGTGTGCCACGCCCTGTGTAGCCCTGAGGG CTGTTGGGGACCCGAGCCCAGAGATTGCGTGTCTT GCAGAAACGTGTCCCGGGGCAGAGAATGCGTGGAC AAGTGCAACCTGCTGGAAGGCGAGCCCCGCGAGTT CGTGGAACACAGCGAGTGCATCCAGTGCCACCCCG AGTGTCTGCCCCAGGCCATGAACATTACCTGCACCG GCAGAGGCCCCGACAACCTGTATCCAGTGCGCCAC TACATCGACGGCCCCACTGCGTGAAAACCTGTCCT GCTGGCGTGATGGGAGAGAACAACACCCTCGTGTG GAAGTACGCCGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGT GTCACCCCAAT
5	Аминокислотная последовательность эктодомена EGFRvIII человека (аминокислоты 1- 332)	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKC KKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGF LLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVS LNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGP EPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVK TCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPN
6	EGFRvIII человека, аминокислотные остатки 15-37	SCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK
7	Вариабельная область легкой цепи 5G6 (CDR выделены жирным)	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTY <u>LNWLLQRPQGQSPKRLIYLASKLDS</u> GVDPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYYC <u>WQATHFPWT</u> FGGGTKLE IK
8	5G6 CDRL1	KSSQSLLDSDGKTYLN
9	5G6 CDRL2	LASKLDS
10	5G6 CDRL3	WQATHFPWT
11	5G6 - κДНК вариабельной области легкой цепи	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCG GTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAG TCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGAC ATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCTGGCCAGTC TCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGCGTCTAAACTGGA CTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATC AGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAG CTACACATTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAA
12	Вариабельная область тяжелой цепи 5G6	EVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMH WVKQRPQGLEWIGAIYPGNSDISYNQKFKGKAKLT AVTSATTAAYMELSSLTNEDSAVYYCTLYDYDPDYWG QGTTTLTVSS
13	5G6 CDRH1	SYWMH
14	5G6 CDRH2	AIYPGNSDISYNQKFKG
15	5G6 CDRH3	YDYDPDY
16	5G6 - κДНК вариабельной	GAGGTCCAACCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGC AAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGG

	области тяжелой цепи	CTTCTGGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATGCACT GGGTA AACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGG ATTGGCGCTATTTATCCTGGAAATAGTGATATTAGC TACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTGAC TGCAGTCACATCCGCCACCACTGCCTACATGGAGCT CAGCAGCCTAACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATT ACTGTACCCTCTATGATTACGACCCTGACTACTGGG GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
17	1A8 вариабельная область легкой цепи	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNC <u>KSSQSLLNSSNQK</u> <u>NYLAWFQ</u> QKPGQSPKLLVY <u>FASTRES</u> GVPDRFIGSGS GTDFTLTISSVQAEDLADYFC <u>QQHYSTPLT</u> FGAGTKL ELK
18	1A8 CDRL1	KSSQSLLNSSNQKNYLA
19	1A8 CDRL2	FASTRES
20	1A8 CDRL3	QQHYSTPLT
21	1A8 кДНК вариабельной области легкой цепи	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCT ATGTCAGTAGGACAGAAGGTCACTATGAACTGCAA GTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAA AGAACTATTTGGCCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGA CAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCTTCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTCA GCAACATTATAGCACTCCTCTCACGTTCCGGTGCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA
22	1A8 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIK <u>DYYMH</u> VKQRPEQGLEWIG <u>WIDPENGNTIYDPKFOG</u> KATITA DTSSNTAYLQLSSLASEDTAVYYCARG <u>WLLL</u> WGQG TTLTVSS
23	1A8 CDRH1	DYYMH
24	1A8 CDRH2	WIDPENGNTIYDPKFOG
25	1A8 CDRH3	GWLLL
26	1A8 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGT GAGGCCAGGGGCCTTAGTCAAGTTGTCCTGCAAAG CTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTATATGCACT GGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGG ATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTAATACTATA TATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAAC AGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGC TCAGCAGCCTGGCATCTGAGGACACTGCCGTCTATT ACTGTGCTAGAGGATGGTTACTACTTTGGGGCCAA GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
27	4B3 вариабельная область легкой цепи	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITC <u>SVSSSISSNLH</u> WYQ QKSETSPKPWIY <u>GTSNLAS</u> GVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYC <u>QQWSSYPLT</u> FGAGTKLELE
28	4B3 CDRL1	SVSSSISSNLH
29	4B3 CDRL2	GTSNLAS
30	4B3 CDRL3	QQWSSYPLT

31	4B3 кДНК вариабельной области легкой цепи	GAAATTGTGCTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGGCT GCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATCACCTGCAG TGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAGCAACTTGCAGT GTACCAGCAGAAGTCAGAAACCTCCCCCAAACCT GGATTTATGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCC CTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTT ATTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGAT GCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTAC CCTACTACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAAC TGAA
32	4B3 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFTDYNMDW VKQSHGKSLEWIGTINPNNGGTSYNQKFKGKATLTV DKSSNTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGYDYDLWFA YWGQGT LVT VSA
33	4B3 CDRH1	DYNMD
34	4B3 CDRH2	TINPNNGGTSYNQKFKG
35	4B3 CDRH3	GYDYDLWFAY
36	4B3 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGTCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAAG CTTCTGGATACACATTCAGTACTACAACATGGACT GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGTACTATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGAC TGTAGACAAGTCCTCCAACACAGCCTACATGGAGC TCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATT ACTGTGCAAGAGGCTATGATTACGACTTGTGGTTTG CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTG CA
37	4E11 вариабельная область легкой цепи	DILMTQSPSSMSVSLGDTV SITCHASOGINSNIGWLLQ KPGKSFKGLIYHG TNLEDGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS SLESEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGKLEIK
38	4E11 CDRL1	HASQGINSNIG
39	4E11 CDRL2	HG TNLED
40	4E11 CDRL3	VQYAQFPYT
41	4E11 кДНК вариабельной области легкой цепи	GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCT GTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCCAT GCAAGTCAGGGCATTAAACAGTAATATAGGGTGGTT GCTGCAGAAACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGA TCTATCATGGAACCAACTTGAAGATGGAGTTCCAT CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGATTAT TCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATCTGAGGATTTT GCTGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTTCCG TACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAACTGGAAATAAA A
42	4E11 вариабельная область тяжелой цепи	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWN IRQFPGNKLEWMGYIGYNGR ^T SYNPSLKS ^R RISITRDT ^S KNQFFLQLNYVTTEDTATFYCARLGRGFAYWGQGT LTVSA
43	4E11 CDRH1	SDYAWN
44	4E11 CDRH2	YIGYNGR ^T SYNPSLKS
45	4E11 CDRH3	LGRGFAY

46	4E11 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGT GAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGT CACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAA CTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGT GGATGGGCTACATAGGCTACAATGGTAGAACTAGT TACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACT CGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCACTT AATTATGTGACTACTGAGGACACAGCCACATTTTAC TGTGCAAGACTGGGCCGAGGGTTTGTACTGGGG CCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
47	5D8 вариабельная область легкой цепи	EIVLTQSPVFMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSETSPKPWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTI SSMEAEDAATYYCQOWSSYPLTFGAGTKLELK
48	5D8 CDRL1	SVSSSISSSNLH
49	5D8 CDRL2	GTSNLAS
50	5D8 CDRL3	QOWSSYPLT
51	5D8 кДНК вариабельной области легкой цепи	GAAATTGTGCTCACCCAGTCTCCAGTATTCATGGCT GCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATCACCTGCAG TGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAGCAACTTGCCTG GTACCAGCAGAAGTCAGAAACCTCCCCAAACCT GGATTTATGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCC CTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTT ATTCTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGAT GCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTAC CCTCACGTTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAA
52	5D8 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPDLVKPGSSVKISCKASGYTFTDYNIDWV KQSHGKSLEWIGTINPNYGGTSYNQKFKGKATLTVD KSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGYDYDLWFAY WGQGLVTVSA
53	5D8 CDRH1	DYNID
54	5D8 CDRH2	TINPNYGGTSYNQKFKG
55	5D8 CDRH3	GYDYDLWFAY
56	5D8 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGACCTGGT GAAGCCTGGGTCTTCAGTGAAGATTTCTGCAAAG CTTCTGGATACACATTCAGTACTACAACATGACT GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGAATTAATCCTAACTATGGTGGTACTTCC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGAC TGTAGACAAGTCCCTCAGCACAGCCTACATGGAGC TCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATT ACTGTGCAAGAGGCTATGATTACGACTTGTGGTTT CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTG CA
57	9C9 вариабельная область легкой цепи	EIVLTQSPTLMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQ QKSETSPKPWIYDTSNLASGVPPIRFSGSGSGTSYSLTIS SVEAEDAATYYCQOWSSYPLTFGSGTKLEIK
58	9C9 CDRL1	SVSSSISSSNLH
59	9C9 CDRL2	DTSNLAS
60	9C9 CDRL3	QOWSSYPLT

61	9С9 кДНК вариабельной области легкой цепи	GAAATTGTGCTCACCCAGTCTCCAACACTCATGGCT GCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATCACCTGCAG TGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAGCAACTTGCAGT GTACCAGCAGAAGTCAGAAACCTCCCCCAAACCT GGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCC CTATTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTT ATTCTCTACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGAT GCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTAC CCTACTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAAT AAAA
62	9С9 вариабельная область тяжелой цепи	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT SYWMH WVKQRPQDLEWIG EIDPSDSYTNYNQKFKG KATLT VDKSSSTAYIQLSSLTSEDSALYYCAR FDFA YWGQGT LTVSA
63	9С9 CDRH1	SYWMH
64	9С9 CDRH2	EIDPSDSYTNYNQKFKG
65	9С9 CDRH3	FDFA
66	9С9 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTTGCAGG CTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACT GGGTGAAACAGAGGCCTGGACAAGACCTTGAGTGG ATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATACTAAC TACAATCAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGAC TGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATTCAGCT CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGCTCTATTA CTGTGCAAGATTTCGATTTTCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
67	11В1 вариабельная область легкой цепи 1 (L1) (доминантная)	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCR SSQSLVYSNGNTY LHWY LQKPGQSPKLLIY KVSNRFS GVDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPFT FGSGTKLEIK
68	11В1 L1 CDRL1	RSSQSLVYSNGNTYLH
69	11В1 L1 CDRL2	KVSNRFS
70	11В1 L1 CDRL3	SQSTHVPFT
71	11В1 кДНК вариабельной области легкой цепи 1 (L1) (доминантная)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCT GTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGA TCTAGTCAGAGCCTTGTATATAGTAATGGAAACACC TATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCT CCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC AGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAA GTACACATGTTCCATTCAGTTTCGGCTCGGGGACAA AGTTGGAAATAAAA
72	11В1 вариабельная область легкой цепи 2 (L2)	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSC RASSSVNYMY WCQ QKSDASPKLWIYY YTSNLAP GVPARFSGSGSGNSYSLTI SSMEGEDVATYYC QQFTSSPSMHT FGGGTKLEIK
73	11В1 L2 CDRL1	RASSSVNYMY
74	11В1 L2 CDRL2	YTSNLAP
75	11В1 L2 CDRL3	QQFTSSPSMHT

76	11B1 кДНК вариабельной области легкой цепи 2 (L2)	GAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCT GCATCTCTAGGGGAGAAGGTCACCATGAGCTGCAG GGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGTACTGGTGCC AGCAGAAGTCAGATGCCTCCCCCAAATATGGATT TATTACACATCCAACCTGGCTCCTGGAGTCCCAGCT CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAACTCTTATTCT CTCACAATCAGCAGCATGGAGGGTGAAGATGTTGC CACTTATTACTGCCAGCAGTTTACTAGTTCCCCATC CATGCACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA TAAAA
77	11B1 вариабельная область тяжелой цепи	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTT <u>TAGMQW</u> VKKMPGKGFKWIG <u>WINTHSGDPKYAEDFKGRFAFS</u> LETYASTAYLQISNLKNEDTASYFCAR <u>THIYDGYNYA</u> <u>MDYWGQGTSVTVSS</u>
78	11B1 CDRH1	TAGMQ
79	11B1 CDRH2	WINTHSGDPKYAEDFKG
80	11B1 CDRH3	THIYDGYNYAMDY
81	11B1 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAA GAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGG CTTCTGGGTATACCTTCACAACCTGCTGGAATGCAGT GGGTAAAAAAGATGCCAGGAAAGGGTTTTAAGTGG ATTGGCTGGATAAACACCCACTCTGGAGATCCAAA ATATGCAGAAGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTC TTTGAAACCTACGCCAGTACTGCATATTTGCAGAT AAGCAACCTCAAAAACGAGGACACTGCTTCGTATT TCTGTGCGAGGACCCACATCTATGATGGTTATAACT ATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA
82	11C8 вариабельная область легкой цепи 1 (L1) (доминантная)	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCR <u>RSSQSLVYSNGNTY</u> <u>LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS</u> GVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYFC <u>SQSTHVPFT</u> FGSGTKLEIK
83	11C8 L1 CDRL1	RSSQSLVYSNGNTYLH
84	11C8 L1 CDRL2	KVSNRFS
85	11C8 L1 CDRL3	SQSTHVPFT
86	11C8 кДНК вариабельной области легкой цепи 1 (L1) (доминантная)	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCT GTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGA TCTAGTCAGAGCCTTGTATATAGTAATGGAAACACC TATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCT CCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC AGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAA GTACACATGTTCCATTCAGTTCCGGCTCGGGGACAA AGTTGGAAATAAAA
87	11C8 вариабельная область легкой цепи 2 (L2)	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCR <u>RASSSVNYMY</u> WCQ QKSDASPKLWIYY <u>YTSNLAP</u> GVPARFSGSGSGNSYSLTI SSMEGEDVATYYC <u>QQFTSSPSMHT</u> FGGGTKLEIK
88	11C8 L2 CDRL1	RASSSVNYMY
89	11C8 L2 CDRL2	YTSNLAP
90	11C8 L2 CDRL3	QQFTSSPSMHT

91	11С8 кДНК вариабельной области легкой цепи 2 (L2)	GAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCT GCATCTCTAGGGGAGAAGGTCACCATGAGCTGCAG GGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGTACTGGTGCC AGCAGAAGTCAGATGCCTCCCCCAAATATGGATT TATTACACATCCAACCTGGCTCCTGGAGTCCCAGCT CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAACTCTTATTCT CTCACAATCAGCAGCATGGAGGGTGAAGATGTTGC CACTTATTACTGCCAGCAGTTTACTAGTTCCCCATC CATGCACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA TAAAA
92	11С8 вариабельная область тяжелой цепи	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT <u>TAGMQW</u> VQKMPGKGFKWIG <u>WINTHSGDPKYAEDFKGRFAFS</u> LETYASTAYLQISNLKNEEDTASYFCAR <u>THIYDGYNYA</u> <u>MDYWGQGTSVTVSS</u>
93	11С8 CDRH1	TAGMQ
94	11С8 CDRH2	WINTHSGDPKYAEDFKG
95	11С8 CDRH3	THIYDGYNYAMDY
96	11С8 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAA GAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGG CTTCTGGGTATACCTTACAACCTGCTGGAATGCAGT GGGTACAAAAGATGCCAGGAAAGGGTTTTAAGTGG ATTGGCTGGATAAACACCCACTCTGGAGATCCAAA ATATGCAGAAGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTC TTTGAAACCTACGCCAGTACTGCATATTTGCAGAT AAGCAACCTCAAAAACGAGGACACTGCTTCGATT TCTGTGCGAGGACCCACATCTATGATGGTTACAAC ATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA
97	11Н3 вариабельная область легкой цепи	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCR <u>RSSQSLVYSNGNTY</u> <u>LHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS</u> GVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDLGVYFCS <u>SQSTHVPFT</u> FGSGTKLEIK
98	11Н3 CDRL1	RSSQSLVYSNGNTYLH
99	11Н3 CDRL2	KVSNRFS
100	11Н3 CDRL3	SQSTHVPFT
101	11Н3 кДНК вариабельной области легкой цепи	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCT GTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGA TCTAGTCAGAGCCTTGTATATAGTAATGGAAACACC TATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCT CCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC AGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAA GTACACATGTTCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAA AGTTGGAAATAAAA
102	11Н3 вариабельная область тяжелой цепи	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT <u>TAGMQW</u> VQKMPGKGFKWIG <u>WINTHSGDPKYAEDFKGRFAFS</u> LETYASTAYLQISNLKNEEDTASYFCAR <u>THIYDGYNYA</u> <u>MDYWGQGTSVTVSS</u>
103	11Н3 CDRH1	TAGMQ
104	11Н3 CDRH2	WINTHSGDPKYAEDFKG
105	11Н3 CDRH3	THIYDGYNYAMDY

106	11Н3 кДНК вариабельной области тяжелой цепи	CAGATCCAGTTGGTGCAAGTCTGGACCTGAGCTGAA GAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGG CTTCTGGGTATACCTTCACAACTGCTGGAATGCAGT GGGTACAAAAGATGCCAGGAAAGGGTTTTAAGTGG ATTGGCTGGATAAACACCCACTCTGGAGATCCAAA ATATGCAGAAGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTC TTTGAAACCTACGCCAGCACTGCATATTTGCAGAT AAGCAACCTCAAAAACGAGGACACTGCTACGTATT TCTGTGCGAGGACCCATATCTATGATGGTTATAATT ATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA
107	4E11 Тяжела цепь IgG1 человека (вариабельная область подчеркнута)	<u>DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWN</u> <u>WIRQFPGNKLEWMGYIGYNGRTSYNPSLKSRI</u> <u>SITRDTSKNQFFLQLNYVTTEDTATFYCARLGR</u> <u>GFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKST</u> <u>SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT</u> <u>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT</u> <u>QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH</u> <u>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PVEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTTPREEQYNSYRQVVSIVLTVLHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREP</u> <u>QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK</u> <u>LTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKS</u> <u>LSLSPG</u>
108	4E11 Легкая цепь Каппа человека (вариабельная область подчеркнута)	<u>DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHASQGIN</u> <u>SNIGWLLQKPGKSFKGLIYHGNTLEDGVP</u> <u>SRFSGSGSDYSLTISLSESEDFADYYCVQYA</u> <u>QFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS</u> <u>DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV</u> <u>DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK</u> <u>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
109	5G6 Тяжелая цепь IgG1 человека (вариабельная область подчеркнута)	<u>EVQLQDSGAEELARPGASVKMSCKASGYTFT</u> <u>SYWMHWVKQRPQGLEWIGAIYPGNSDISYNQ</u> <u>KFKGKAKLTAVTSATTAYMELSSLTNEDSA</u> <u>VYYCTLYDYPDYWGQGTTLTVSSASTKGPS</u> <u>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK</u> <u>KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL</u> <u>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE</u> <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR</u> <u>VVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
110	5G6 Легкая цепь Каппа человека (вариабельная область подчеркнута)	<u>DVVMTQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSL</u> <u>LDSDGKTYLWLLQRPQSPKRLIYLASKL</u> <u>DSGVPDRFTGSGSGDTFTLKISRVEAEDL</u> <u>GVYYCWQATHFPWTFGGGTKLEIKRTVA</u> <u>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u> <u>YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS</u> <u>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</u> <u>QGLSSPVTKSFNRGEC</u>

111	13.1.2 Тяжелая цепь IgG1 человека (вариабельная область подчеркнута)	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW</u> <u>VRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYVDSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGWQQLAPE</u> <u>DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG</u> <u>LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK</u> <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN</u> <u>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV</u> <u>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD</u> <u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY</u> <u>TQKSLSLSPG</u>
112	13.1.2 Легкая цепь Каппа человека (вариабельная область подчеркнута)	<u>DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYL</u> <u>SWLHQRPQPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTAF</u> <u>TLKISRVEAEDVGVYYCMQATQLPRTFGQGTKVEIKR</u> <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV</u> <u>QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL</u> <u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
113	Сигнальная последовательность N-концевой легкой цепи	MVLQTQVFISLLLWISGAYG
114	Сигнальная последовательность N-концевой тяжелой цепи	MDWTWRILFLVAAATGTHA
115	консенсусные VL из 4B3 и 5D8	EIVLTQSPX _{1a} X _{2a} MAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHW YQKSETSPKRWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTYS LTISSMEAEDAATYYCQOWSSYPLTFGAGTKLELX _{3a} Где X _{1a} может быть консервативной аминокислотной заменой на аланин (A) или валин (V) или представляет собой аланин или валин Где X _{2a} может быть консервативной аминокислотной заменой на лейцин (L) или фенилаланин (F) или представляет собой лейцин или фенилаланин Где X _{3a} может быть консервативной аминокислотной заменой на лизин (K) или глутаминовую кислоту (E) или представляет собой лизин или глутаминовую кислоту
116	консенсусные VH из 4B3 и 5D8	EVQLQQSGPX _{1b} LVKPGSSVKISCKASGYTFTDYNX _{2b} D WVKQSHGKSLEWIGTINPNX _{3b} GGTSYNQKFKGKAT LTVDKSSX _{4b} TAYMELRSLTSEDSAVYYCARGYDYDL WFAYWGQGLTVTSA Где X _{1b} может быть консервативной аминокислотной заменой на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) или представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту Где X _{2b} может быть консервативной аминокислотной заменой на метионин (M) или изолейцин (I) или представляет собой метионин или изолейцин Где X _{3b} может быть консервативной аминокислотной заменой на аспарагин (N) или тирозин (Y) или

		представляет собой аспарагин или тирозин Где X _{4b} может быть консервативной аминокислотной заменой на аспарагин (N) или серин (S) или представляет собой аспарагин или серин
117	Консенсусные VH из 11B1, 11C8 и 11H3	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT <u>TAGMQW</u> VX _{1c} KMPGKGFKWIG <u>WINTHSGDPKYAEDFKGRFAF</u> SLETYASTAYLQISNLKNEDTAX _{2c} YFCAR <u>THIYDGYN</u> <u>YAMDYWGQGTSVTV</u> Где X _{1c} может быть консервативной аминокислотной заменой на лизин (K) или глутамин (Q) или представляет собой лизин или глутамин Где X _{2c} может быть консервативной аминокислотной заменой на серин (S) или треонин (T) или представляет собой серин или треонин
118	консенсусные VL из 4B3, 5D8 и 9C9	EIVLTQSPX _{1d} X _{2d} MAASPGEKVTITCS <u>VSSSISSSNLHW</u> YQKSETSPKPWIYX _{3d} <u>TSNLAGV</u> VPX _{4d} RFSGSGSGTS YSLTISSX _{5d} EAEDAATYYC <u>QQWSSYPLT</u> FGX _{6d} GTKLE X _{7d} X _{8d} Где X _{1d} может быть консервативной аминокислотной заменой на аланин (A), треонин (T) или валин (V) или представляет собой аланин, треонин или валин Где X _{2d} может быть консервативной аминокислотной заменой на лейцин (L) или фенилаланин (F) или представляет собой лейцин или фенилаланин Где X _{3d} может быть консервативной аминокислотной заменой на глицин (G) или аспарагиновую кислоту (D) или представляет собой глицин или глутаминовую кислоту Где X _{4d} может быть консервативной аминокислотной заменой на изолейцин (I) или валин (V) или представляет собой изолейцин или валин Где X _{5d} может быть консервативной аминокислотной заменой на метионин (M) или валин (V) или представляет собой метионин или валин Где X _{6d} может быть консервативной аминокислотной заменой на аланин (A) или серин (S) или представляет собой аланин или серин Где X _{7d} может быть консервативной аминокислотной заменой на изолейцин (I) или лейцин (L) или представляет собой изолейцин или лейцин Где X _{8d} может быть консервативной аминокислотной заменой на лизин (K) или глутаминовую кислоту (E) или представляет собой лизин или глутаминовую кислоту
119	Аминокислотные остатки 1-76 EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKC KKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SG
120	Аминокислотные остатки 1-62 EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKC KKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINA
121	Аминокислотные остатки 1-49 EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKC KKCEGPCRKVCNGI

122	Аминокислотные остатки 1-45 EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKC KKCEGPCRKV
123	Аминокислотные остатки 1-37 EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKC KK
124	Аминокислотные остатки 1-33 EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVR
125	Аминокислотные остатки 1-18 EGFRvIII	LEEKKGNYVVTDHGSCVR
126	Аминокислотные остатки 3-49 EGFRvIII	EKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK CEGPCRKVCNGI
127	Аминокислотные остатки 3-45 EGFRvIII	EKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK CEGPCRKV
128	Аминокислотные остатки 3-37 EGFRvIII	EKKGNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK
129	Аминокислотные остатки 3-18 EGFRvIII	EKKGNYVVTDHGSCVR
130	Аминокислотные остатки 6-49 EGFRvIII	GNVYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEG PCRKVCNGI
131	Аминокислотные остатки 6-45 EGFRvIII	GNVYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEG PCRKV
132	Аминокислотные остатки 6-37 EGFRvIII	GNVYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK
133	Аминокислотные остатки 10-49 EGFRvIII	VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRK VCNGI
134	Аминокислотные остатки 10-45 EGFRvIII	VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRK V
135	Аминокислотные остатки 10-37 EGFRvIII	VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK
136	Аминокислотные остатки 15-49 EGFRvIII	SCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGI
137	Аминокислотные остатки 15-45 EGFRvIII	SCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKV
138	Аминокислотные остатки 19-76 EGFRvIII	ACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEF KDSLSINATNIKHFNCTSIG

139	Аминокислотные остатки 19-62 EGFRvIII	ACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEF KDSLSINA
140	Аминокислотные остатки 19-49 EGFRvIII	ACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGI
141	Аминокислотные остатки 19-45 EGFRvIII	ACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKV
142	Аминокислотные остатки 19-37 EGFRvIII	ACGADSYEMEEDGVRKCKK
143	Аминокислотные остатки 28-45 EGFRvIII	EEDGVRKCKKCEGPCRKV
144	Аминокислотные остатки 28-37 EGFRvIII	EEDGVRKCKK
145	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Ser15 на Ala	<u>A</u> CVRACGADSYEMEEDGVRKCKK
146	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Cys16 на Ala	S <u>A</u> VRACGADSYEMEEDGVRKCKK
147	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Val17 на Ala	SC <u>A</u> RACGADSYEMEEDGVRKCKK
148	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Arg18 на Ala	SCV <u>A</u> ACGADSYEMEEDGVRKCKK
149	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Cys20 на Ala	SCVRA <u>A</u> GADSYEMEEDGVRKCKK
150	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Gly21 на Ala	SCVRAC <u>A</u> ADSYEMEEDGVRKCKK
151	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Asp23 на	SCVRACGA <u>A</u> SYEMEEDGVRKCKK

	Ala	
152	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Ser24 на Ala	SCVRACGADA <u>A</u> YEMEEDGVRKCKK
153	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Tyr25 на Ala	SCVRACGADS <u>A</u> EMEEDGVRKCKK
154	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Glu26 на Ala	SCVRACGADSY <u>A</u> MEEDGVRKCKK
155	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Met27 на Ala	SCVRACGADSYE <u>A</u> EEDGVRKCKK
156	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Glu28 на Ala	SCVRACGADSYEM <u>A</u> EDGVRKCKK
157	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Glu29 на Ala	SCVRACGADSYEME <u>A</u> DGVRKCKK
158	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Asp30 на Ala	SCVRACGADSYEMEE <u>A</u> GVRKCKK
159	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Gly31 на Ala	SCVRACGADSYEMEED <u>A</u> VRKCKK
160	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Val32 на Ala	SCVRACGADSYEMEEDG <u>A</u> RKCKK
161	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Arg33 на Ala	SCVRACGADSYEMEEDGV <u>A</u> KCKK

162	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Lys34 на Ala	SCVRACGADSYEMEEDGVR <u>A</u> CKK
163	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Cys35 на Ala	SCVRACGADSYEMEEDGVRK <u>A</u> KK
164	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Lys36 на Ala	SCVRACGADSYEMEEDGVRK <u>C</u> A <u>K</u>
165	Аминокислотные остатки 15-37 EGFRvIII, с мутацией Lys37 на Ala	SCVRACGADSYEMEEDGVRK <u>C</u> K <u>A</u>
166	Аминокислотная последовательность для одноцепочечного вариабельного фрагмента, состоящего из VH, линкера, VL последовательности, полученной из 5G6 антитела Линкерная последовательность, включающая сайты рестрикции, подчеркнута, но могут использоваться любые подходяще в данной области техники линкеры	EVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMH WVKQRPQGQLEWIGAIYPGNSDISYNQKFKGKAKLT AVTSATTAYMELSSLTNE DS AVYYCTLYDYDPDYWG QGTTLTVSSGTGGGSGGGGSGGGGSDV V MTQTPLTL SVTIGQPASISCKSSQSL L SDGKTYLNWLLQRP G QSP KRLIYLASKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCWQATHFPWTFGGG T KLEIK
167	Аминокислотная последовательность для одноцепочечного вариабельного фрагмента, состоящего из VH, линкера, VL последовательности, полученной из 4E11 антитела	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWN W IRQFPGNKLEWMGYIGYNGR T SYNPSL K SRISITR D TS KNQFFLQLN Y VTTEDTATFYCARLGRGFAYWGQGT L VTVSAGTGGGSGGGGSGGGGSDV D ILMTQSPSSMSV SLGDTVSITCHASQGIN S NIGWLLQKPGKSF K GLIYHG TNLEDGVP S RFSGSGSGTDYSLT I SSLESEDFADYYCV QYAQFPYTFGGG T KLEIK

	<p>Линкерная последовательность, включающая сайты рестрикции, подчеркнута, но могут использоваться любые подходяще в данной области техники линкеры</p>	
168	<p>Типовая аминокислотная последовательность для 5G6-CD28-CD3 дзета, содержащего молекулу химерного антигенного рецептора Состоит из 5G6 scFV, CD8 шарнира, трансмембранного домена CD28 человека, сигнального домена CD28 человека и сигнального домена CD3-дзета человека</p>	<p>MLRLLLALNLFPSIQVTGEVQLQQSGAELARPGASVK MSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGGLEWIGAIYPG NSDISYNQKFKGKAKLTAVTSATTAYMELSSLTNEDS AVYYCTLYDYDPDYWGQGTTLTVSSGTGGGSGGGG SGGGGSDVVMQTPLTSLVTVIGQPASISCKSSQSLDS DGKTYLNLWLLQRPGQSPKRLIYLASKLDSGVPDRFTG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQATHFPWTFGG GTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTV VAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP YAPPRDFAAYRSASLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKQRRKPNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
169	<p>Типовая аминокислотная последовательность для 4E11-CD28-CD3 дзета, содержащего молекулу химерного антигенного рецептора Состоит из 4E11 scFV, CD8 шарнира, трансмембранного домена CD28 человека, сигнального домена CD28 человека и сигнального домена CD3-дзета человека</p>	<p>MLRLLLALNLFPSIQVTGDVQLQESGGLVKPSQSLSL TCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKLEWMGYIGYNG RTSYNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLQLNYVTTEDTATFY CARLGRGFAYWGQGTTLTVSAGTGGGSGGGGSGGG GSDVDILMTQSPSSMSVSLGDTVSTCHASQGINSNIG WLLQKPGKSFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDY SLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGKLEIKTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRSASLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKQRRKPNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQUALPPR</p>
170	<p>Аминокислотная последовательность для типовой последовательности 4E11 биспецифического</p>	<p>DVQLQESGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWR IRQFPGNKLEWMGYIGYNGRTSYNPSLKSRSISITRDTS KNQFFLQLNYVTTEDTATFYCARLGRGFAYWGQGTTL VTVSAKTTPPSVYPLAPGSLGTGGGSGGGGSGGGGSD VDILMTQSPSSMSVSLGDTVSTCHASQGINSNIGWLL QKPGKSFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYSLTI</p>

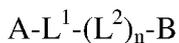
	Т-клеточного рекрутера Линкерные последовательности подчеркнуты, но могут использоваться любые подходяще в данной области техники линкеры CD3-специфический scFv рекрутер показан жирным	SSLESEDFADYYCVQYAQFPYTFGGG TKLEIK RADAA PTVSIFPPSSKLGDLGGG SRDDDIKLQQSGAELARP GASVKM SCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEW IGYINPSR GYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSE DAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPAIMSASP GEKVTMT CRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYD TSKVASG VPYRFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATY YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
171	Типовой линкер	GTGGGGSGGGGSGGGGSDV
172	Гуманизованная 4E11 вариабельная область легкой цепи, вариант 1 (hVL1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWYQQ KPGKAPKLLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIK
173	Гуманизованная 4E11 вариабельная область легкой цепи, вариант 2 (hVL2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWLQQ KPGKAPKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIK
174	Гуманизованная 4E11 вариабельная область легкой цепи, вариант 3 (hVL3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWLQQ KPGKAFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIK
175	Гуманизованная 4E11 вариабельная область тяжелой цепи, вариант 1 (hVH1)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNW IRQPPGKGLEWIGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARLGRGFAYWGQGT LTVSS
176	Гуманизованная 4E11 вариабельная область тяжелой цепи, вариант 2 (hVH2)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNW IRQPPGKGLEWIGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISRDT KNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARLGRGFAYWGQGT LTVSS
177	Гуманизованная 4E11 вариабельная область тяжелой цепи, вариант 3 (hVH3)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNW IRQPPGKGLEWMGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISRDT KNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARLGRGFAYWGQGT LTVSS
178	Константная область легкой цепи каппа человека	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
179	Константная область тяжелой цепи IgG4 человека (S228P)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVKDKRVESKYGPPCP PC PAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ

		EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
180	Гуманизированная 4E11 легкая цепь, вариант 1 (hL1) (Вариабельная область подчеркнута)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGINSNIGWYQQ</u> <u>KPGKAPKLLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS</u> <u>SLOPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
181	Гуманизированная 4E11 легкая цепь, вариант 2 (hL2) (Вариабельная область подчеркнута)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGINSNIGWLQQ</u> <u>KPGKAPKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS</u> <u>SLOPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
182	Гуманизированная 4E11 легкая цепь, вариант 3 (hL3) (Вариабельная область подчеркнута)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGINSNIGWLQQ</u> <u>KPGKAFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS</u> <u>SLOPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
183	Гуманизированная 4E11 тяжелая цепь, вариант 1 (hH1) (Вариабельная область подчеркнута)	<u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNW</u> <u>IRPPGKGLEWIGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISVDTS</u> <u>KNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARLGRGFAYWGQGL</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF</u> PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
184	Гуманизированная 4E11 тяжелая цепь, вариант 2 (hH2) (Вариабельная область подчеркнута)	<u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNW</u> <u>IRPPGKGLEWIGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISRDT</u> <u>KNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARLGRGFAYWGQGL</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF</u> PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
185	Гуманизированная 4E11 тяжелая цепь, вариант 3 (hH3) (Вариабельная область подчеркнута)	<u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNW</u> <u>IRPPGKGLEWMGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISRDT</u> <u>KNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARLGRGFAYWGQGL</u> <u>VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF</u> PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

		VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
--	--	---

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее структуру Формулы I, или его фармацевтически приемлемая соль:



Формула I

в которой

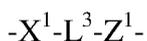
A представляет собой хелатирующий фрагмент или его металлокомплекс,

B представляет собой таргетную группу, которая способна связываться с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII) или его фрагментом, где EGFRvIII или его фрагмент содержит пептид, состоящий из аминокислотных остатков 1-76 SEQ ID NO:119;

L^1 представляет собой связь, C=O, C=S, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

n представляет собой целое число от 1 до 5 (включительно); и

L^2 каждый независимо имеет структуру Формулы II:



Формула II

в которой

X^1 представляет собой $-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-*$, $-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-*$, $-OC(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)O-*$, $-NR^1C(O)NR^1-$, $-CH_2-Ph-C(O)NR^1-*$, $-NR^1C(O)-Ph-CH_2-*$, $-CH_2-Ph-NH-C(S)NR^1-*$, $-NR^1C(S)-NH-Ph-CH_2-*$, $-O-$ или $-NR^1-$, где «*» указывает точку присоединения к L^3 , и R^1 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

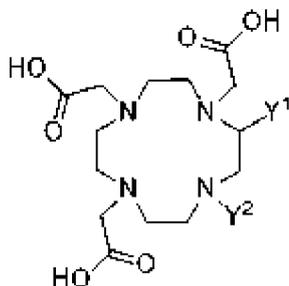
L^3 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_{50} алкил или необязательно замещенный C_1-C_{50} гетероалкил; и

Z^1 представляет собой $-CH_2-#$, $-C(O)-#$, $-C(S)-#$, $-OC(O)-#$, $-C(O)O-#$, $-NR^2C(O)-#$, $-C(O)NR^2-#$ или $-NR^2-#$, где «#» указывает точку присоединения к B, и R^2 представляет собой водород, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

2. Соединение по п.1, где указанный хелатирующий фрагмент выбран из группы, состоящей из DOTA (1,4,7,10-тетраазаацклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты), DOTMA (1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазаацклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты, DOTAM (1,4,7,10-тетраакис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазаацклододекана), DOTPA (1,4,7,10-тетраазаацклододекан-1,4,7,10-тетрапропионовой кислоты), DOЗAM-уксусной кислоты (2-(4,7,10-трис(2-амино-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазаацклододекан-1-ил)уксусной кислоты), DOTA-GA ангидрида (2,2',2''-(10-(2,6-диоксотетрагидро-2H-пиран-3-ил)-1,4,7,10-тетраазаацклододекан-1,4,7-триил)триуксусной кислоты, DOTP (1,4,7,10-тетраазаацклододекан-1,4,7,10-

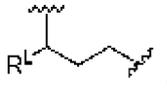
тетра(метиленфосфоновой кислоты), DOTMP (1,4,6,10-тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетраметиленфосфоновой кислоты), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновой кислоты), CB-TE2A (1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусной кислоты), NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты), NOTP (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-три(метиленфосфоновой кислоты), ТЕТРА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовой кислоты), ТЕТА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты), НЕНА (1,4,7,10,13,16-гексаазациклогексадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусной кислоты), ПЕРА (1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан-N, N', N'', N''', N''''-пентауксусной кислоты), H₄октапа (N, N'-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-этилендиамин-N, N'-диуксусной кислоты), H₂дедпа (1,2-[[6-(карбокси)-пиридин-2-ил]-метиламино]этана), H₆фоспа (N, N'-(метиленфосфонат)-N, N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтана), ТТНА (триэтилететрамин-N, N, N', N'', N''', N''''-гексауксусной кислоты), DO2P (тетраазациклододекандиметанфосфоновой кислоты), HP-DO3A (гидроксипропилтетраазациклододекантриуксусной кислоты), ЭДТК (этилендиаминтетрауксусной кислоты), Дефероксамина, ДТРА (диэтилентриаминпентауксусной кислоты), ДТРА-ВМА (диэтилентриаминпентауксусной кислоты-бисметиламида), октадентат-НОРО (октадентатных гидроксипиридинонов) и порфирина.

3. Соединение по п.2, где соединение представлено:



где Y¹ представляет собой -CH₂OCH₂(L²)_n-B, C=O(L²)_n-B или C=S(L²)_n-B и Y² представляет собой -CH₂CO₂H; или

где Y¹ представляет собой H и Y² представляет собой L¹-(L²)_n-B.

4. Соединение по любому из пп. 1-3, где L¹ представляет собой ,

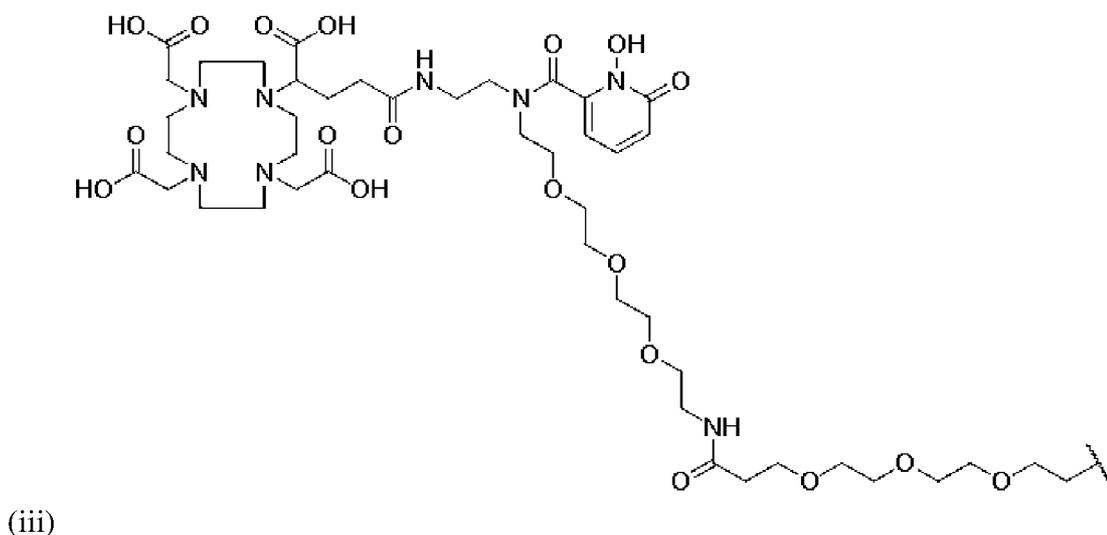
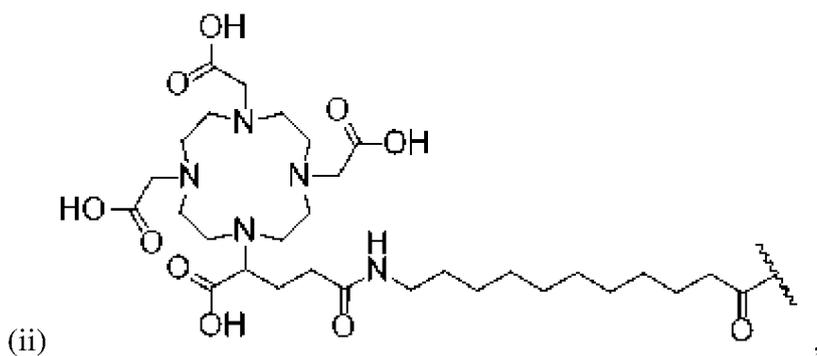
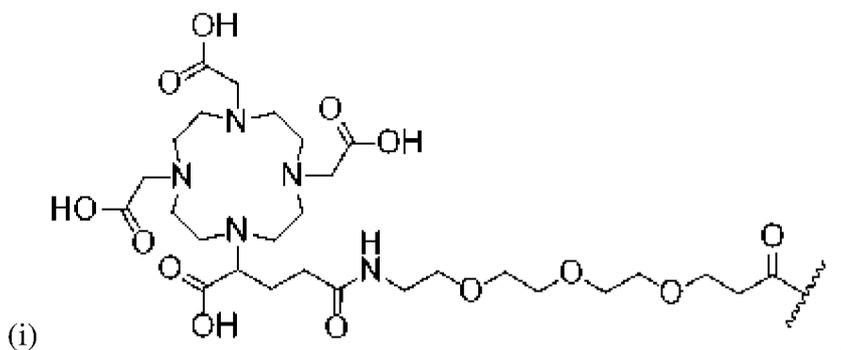
где R^L представляет собой водород или -CO₂H.

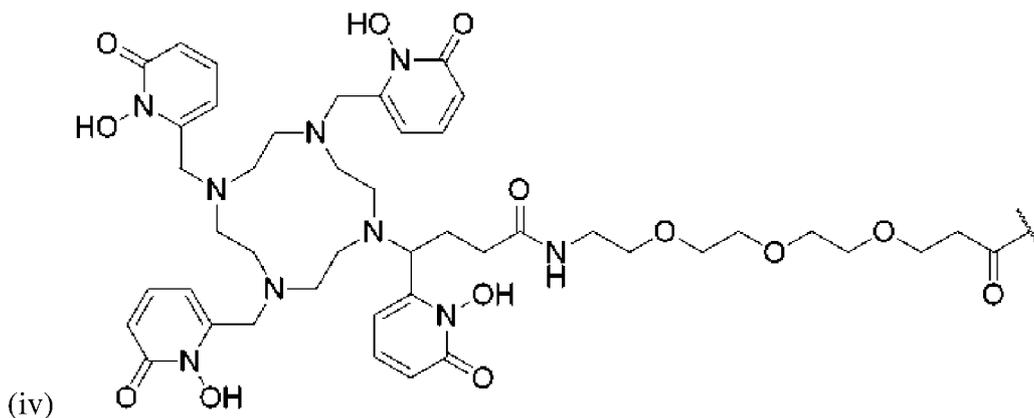
5. Соединение по любому из пп. 1-4,

где металлокомплекс содержит металл, выбранный из группы, состоящей из Bi, Pb, Y, Mn, Cr, Fe, Co, Zn, Ni, Tc, In, Ga, Cu, Re, лантанида и актинида; или

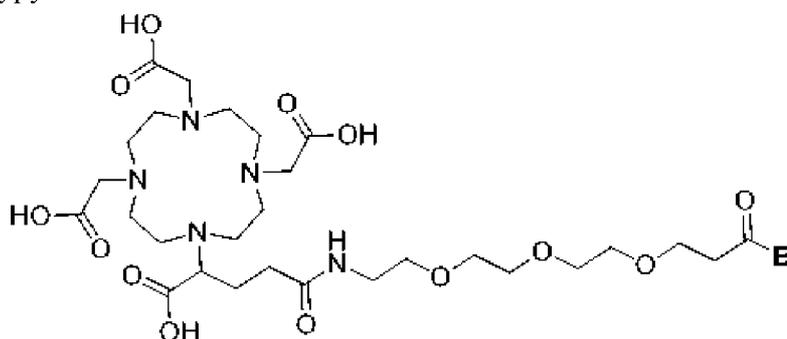
где металлокомплекс содержит радионуклид, выбранный из группы, состоящей из ⁴³Sc, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁵⁵Co, ⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸²Rb, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ⁹⁷Ru, ⁹⁹Tc, ^{99m}Tc, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹³³La, ¹³⁴Ce, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²⁰¹Tl, ²⁰³Pb, ²¹¹At, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²²⁷Th и ²²⁹Th.

6. Соединение по любому из пп. 3-5, где Y^1 представляет собой H.
7. Соединение по любому из пп.1-6, где X^1 представляет собой $-C(O)NR^1-^*$ или $-NR^1C(O)-^*$, «*» указывает точку присоединения к L^3 и R^1 представляет собой X.
8. Соединение по любому из пп.1-7, где Z^1 представляет собой $-CH_2-$.
9. Соединение по любому из пп.1-8, где n равно 1 и L^3 включает $(CH_2CH_2O)_{2-20}$.
10. Соединение по любому из пп.1-8, где n равно 1, и L^3 представляет собой $(CH_2CH_2O)_m(CH_2)_w$, где m и w каждый независимо представляет собой целое число от 0 до 10 (включительно), и по меньшей мере один из m и w не равен 0.
11. Соединение по п. 1, где A-L- содержит одну из следующих структур или ее металлокомплекс:





12. Соединение по п. 1, где радиоиммуноконъюгат содержит следующую структуру или ее металлокомплекс:



13. Соединение по любому из пп.1-12, где А представляет собой металлокомплекс хелатирующего фрагмента, и металлокомплекс содержит радионуклид.

14. Соединение по п.13, где радионуклид представляет собой ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu или ^{225}Ac .

15. Соединение по п.13, где радионуклид представляет собой ^{225}Ac .

16. Соединение по п.13, где радионуклид представляет собой альфа-излучатель, выбранный из группы, состоящей из астата-211 (^{211}At), висмута-212 (^{212}Bi), висмута-213 (^{213}Bi), актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), свинца-212 (^{212}Pb), тория-227 (^{227}Th) и тербия-149 (^{149}Tb) или их дочерних изотопов.

17. Соединение по п.16, где альфа-излучатель представляет собой ^{225}Ac или его дочерние изотопы.

18. Соединение по любому из пп. 1-17, где таргетный фрагмент содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

19. Соединение по п. 18, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а варибельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, последовательность CDRL2 SEQ ID NO:9 и последовательность CDRL3 SEQ ID NO:10, и варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1 SEQ ID NO:13, последовательность CDRH2 SEQ ID NO:14 и последовательность CDRH3 SEQ ID NO:15;

б. варибельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:63, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:64, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:65;

г. переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:68, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:69, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:70, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:78, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:79, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:80; или

д. переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:73, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:74, и CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:75, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:78, CDRH2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:79, и CDRH3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:80.

20. Соединение по п. 18, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:118, или по существу идентичную SEQ ID NO:118, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, или по существу идентичную SEQ ID NO:116;

б. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:115, или по существу идентичную SEQ ID NO:115, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, или по существу идентичную SEQ ID NO:116; или

в. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO:118, или по существу идентичную SEQ ID NO:118, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:62, или по существу идентичную SEQ ID NO:62.

21. Соединение по п. 18, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:7, или по существу идентичную SEQ ID NO:7, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:12 или по существу идентичную SEQ ID NO:12;

b. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:17, или по существу идентичную SEQ ID NO:17, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:22, или по существу идентичную SEQ ID NO:22;

c. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:27, или по существу идентичную SEQ ID NO:27, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:32, или по существу идентичную SEQ ID NO:32;

d. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:37, или по существу идентичную SEQ ID NO:37, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:42, или по существу идентичную SEQ ID NO:42;

e. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:47, или по существу идентичную SEQ ID NO:47, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:52, или по существу идентичную SEQ

ID NO:52;

f. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:57, или по существу идентичную SEQ ID NO:57, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:62, или по существу идентичную SEQ ID NO:62;

g. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:67, или по существу идентичную SEQ ID NO:67, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:77, или по существу идентичную SEQ ID NO:77, аминокислоте, представленной в SEQ ID NO:92, или по существу идентичную SEQ ID NO:92, или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:102 или по существу идентичную SEQ ID NO:102; или

h. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:72, или по существу идентичную SEQ ID NO:72, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:77, или по существу идентичную SEQ ID NO:77, или аминокислоте, представленной в SEQ ID NO:92, или по существу идентичную SEQ ID NO:92.

22. Соединение по п.18, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:108, или по существу идентичную SEQ ID NO:108, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:107 или по существу идентичную SEQ ID NO:107; или

b. легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:110, или по существу идентичную SEQ ID NO:110, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:109, или по существу идентичную SEQ ID NO:109.

23. Соединение по п.19, где указанное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент содержит:

а. вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:174, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:176; или

б. вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:172, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:177.

26. Соединение по п. 23, 24 или 25, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:180, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:183;

б. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:181, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:183;

с. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:182, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:183;

д. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:180, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:184;

е. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:181, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:184;

ф. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:182, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:184;

г. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:180, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:185;

h. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:181, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:185; или

і. область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:182, и область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:185.

27. Соединение по любому из пп.18-26, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, антитело человека, одноцепочечное

антитело, мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

28. Соединение по любому из пп.18-27, где антитело представляет собой гуманизованное моноклональное антитело.

29. Соединение по любому из пп. 1-25, 27 и 28, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG1 человека.

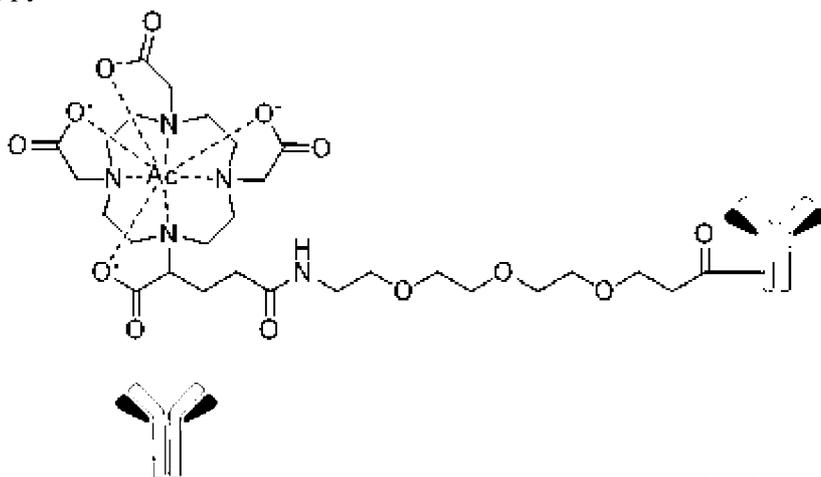
30. Соединение по любому из пп. 1-21, 23-25, 27 и 28, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG2 человека.

31. Соединение по любому из пп. 1-22 и 24-28, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека.

32. Соединение по п.26, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4(S228P) человека.

33. Соединение по любому из пп.1-32, где антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

34. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что соединение имеет следующую структуру:



где  антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с EGFRvIII или его фрагментом.

35. Соединение по п.34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с A-L- через аминогруппу боковой цепи лизинового остатка.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-35 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

37. Способ планирования лучевой терапии и/или лучевой терапии рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения по любому из пп. 1-35 или фармацевтической композиции по п. 36.

38. Способ лечения или профилактики рака, включающий клетки, экспрессирующие EGFRvIII, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения по любому из пп. 1-35 или фармацевтической композиции по п. 36 в терапевтически эффективном количестве.

39. Способ лечения или профилактики рака, включающий клетки, экспрессирующие EGFRvIII, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в

этом, первой дозы соединения по любому из пп. 1-35 или фармацевтической композиции по п. 36 в количестве, эффективном для планирования лучевого лечения, с последующим введением последующих доз соединения по любому из пп. 1-35 или фармацевтической композиции по п. 36 в терапевтически эффективном количестве.

40. Способ по п.39, где соединение или фармацевтическая композиция, вводимые в первой дозе, и соединение или фармацевтическая композиция, вводимые в последующей дозе, являются одинаковыми.

41. Способ по п.39, где соединение или фармацевтическая композиция, вводимые в первой дозе, и соединение или фармацевтическая композиция, вводимые в последующей дозе, являются разными.

42. Способ по любому из пп.37-41, где рак представляет собой мультиформную глиобластому или карциному.

43. Способ по любому из пп.37-42, дополнительно включающий введение антипролиферативного агента, сенсibilизатора радиации или иммуномодулирующего агента.

44. Способ по п.43, включающий введение соединения по любому из пп.1-35 или фармацевтической композиции по п.36 в комбинации с антипролиферативным агентом в отсутствие или в присутствии дистанционной лучевой терапии.

45. Способ по п.44, где антипролиферативный агент представляет собой темозоломид (TMZ).

46. Способ по любому из пп. 38-45, где терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп. 1-35 или фармацевтической композиции по п.36 вводят в виде нескольких доз.

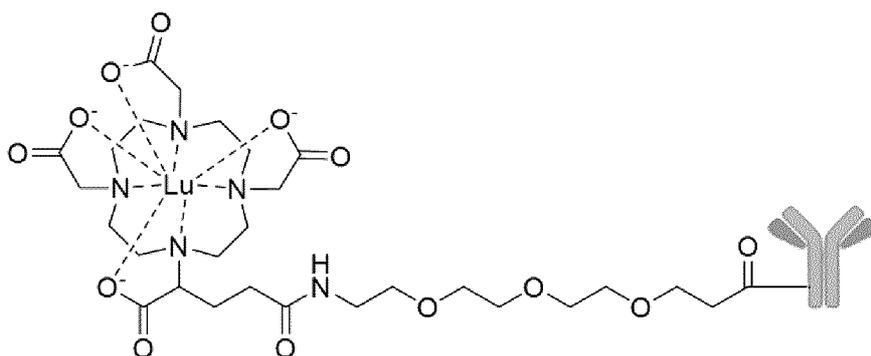
47. Способ по любому из пп. 38-45, где терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп. 1-35 или фармацевтической композиции по п.36 вводят в виде однократной дозы.



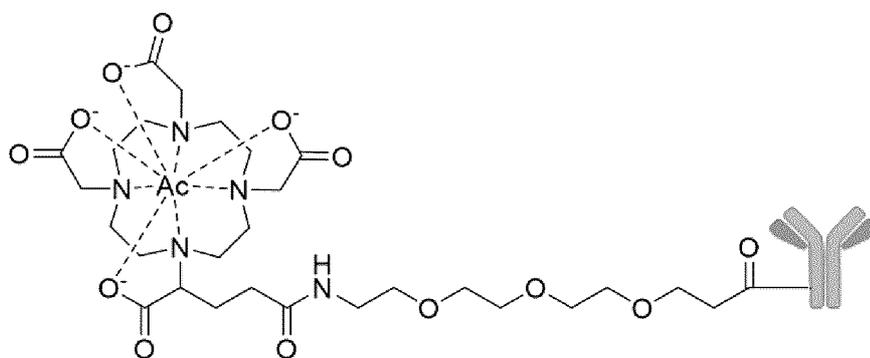
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

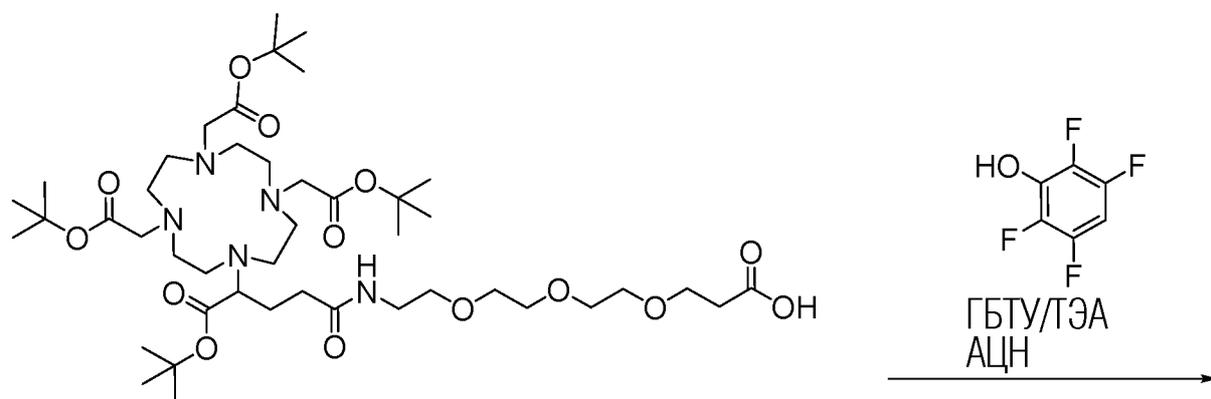
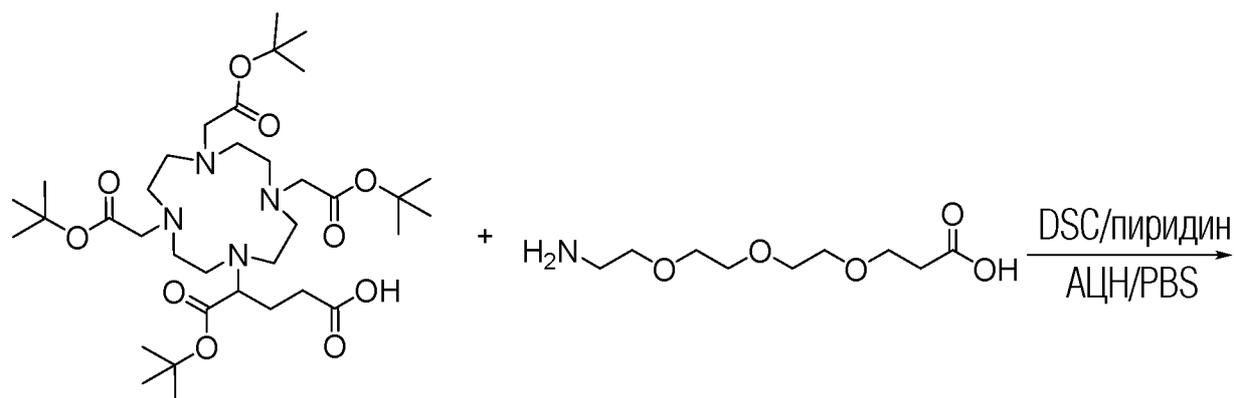


ФИГ. 1С

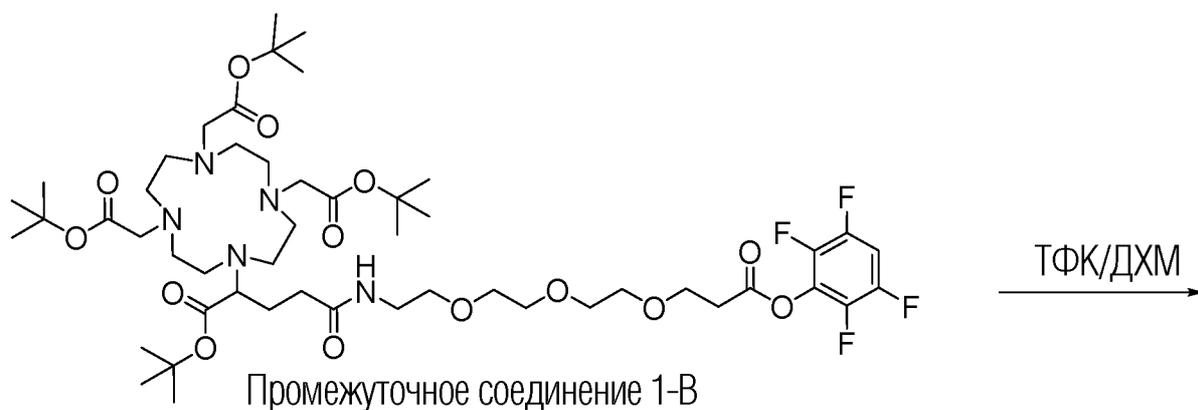


ФИГ. 1D

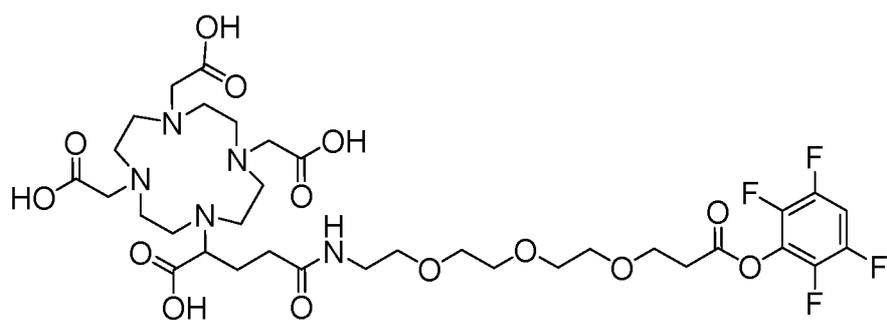
3/17



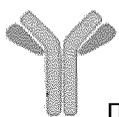
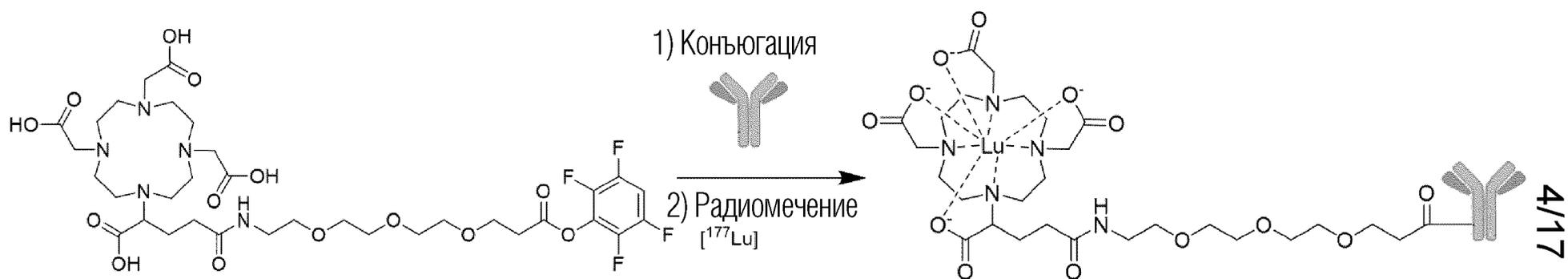
Промежуточное соединение 1-А



Промежуточное соединение 1-В

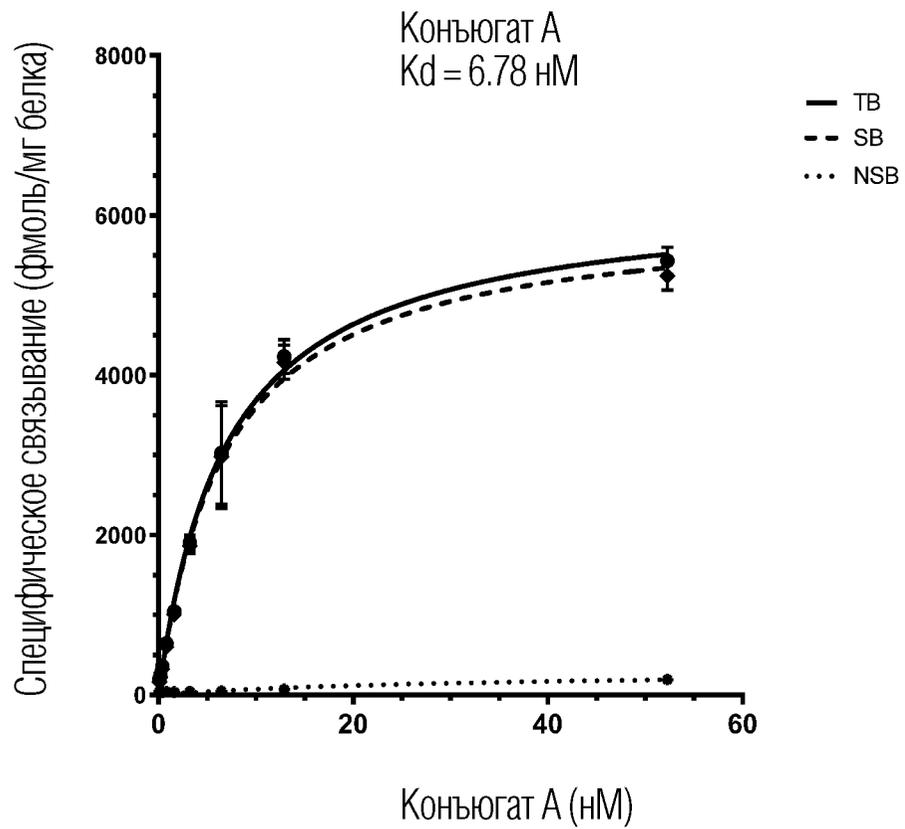


ФИГ. 3

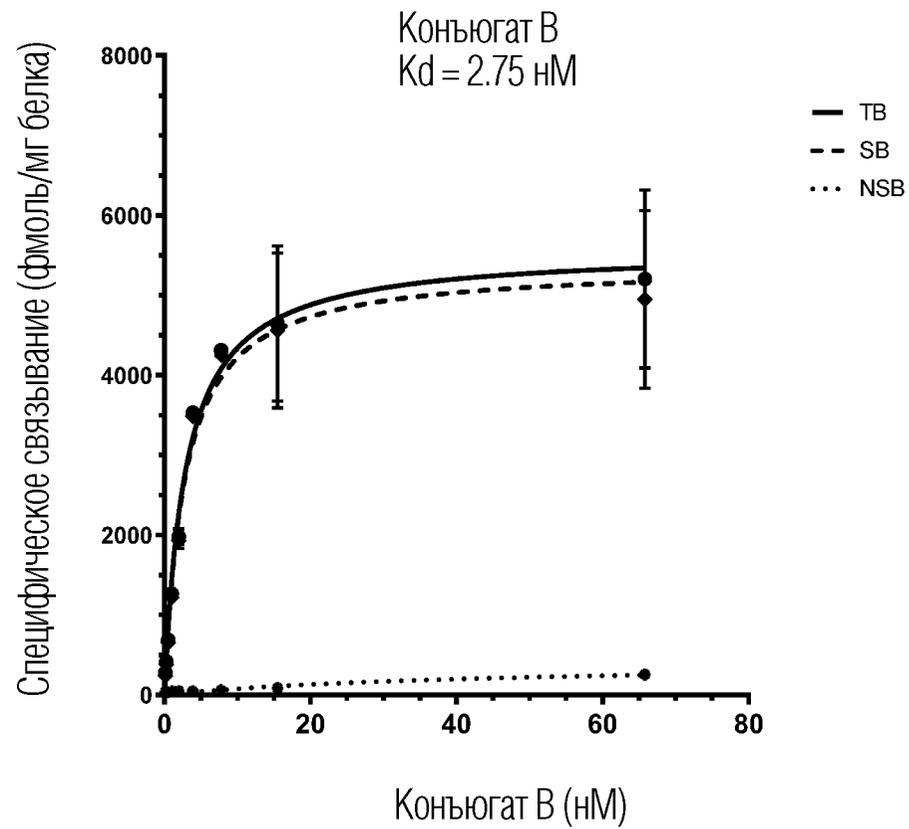


представляет собой антитело, которое специфически связывается с EGFRvIII, где антитело конъюгировано с Соединением С через аминогруппу боковой цепи лизинового остатка

ФИГ. 4

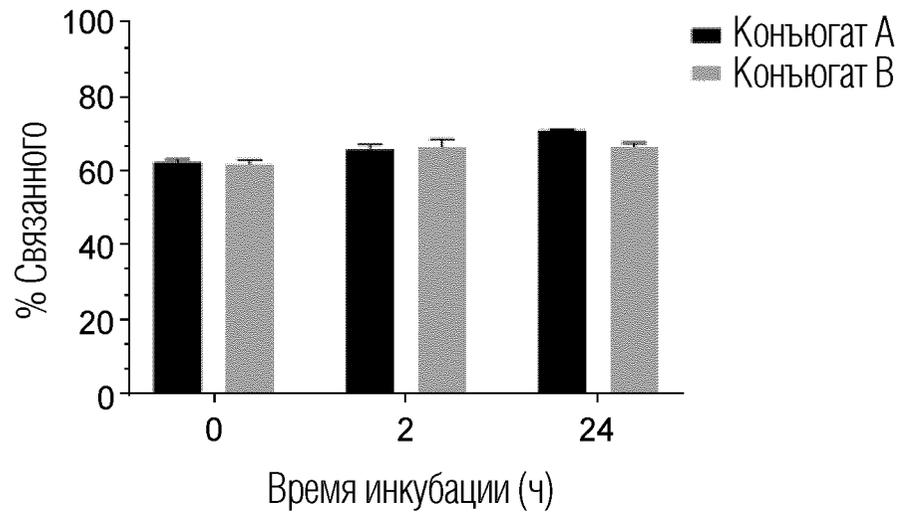


ФИГ. 5А



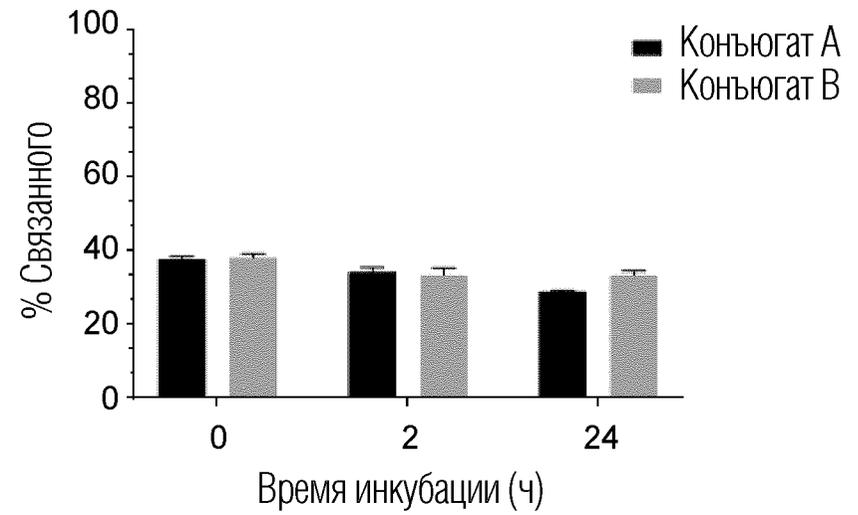
ФИГ. 5В

Клеточноассоциированный: Мембраносвязанный

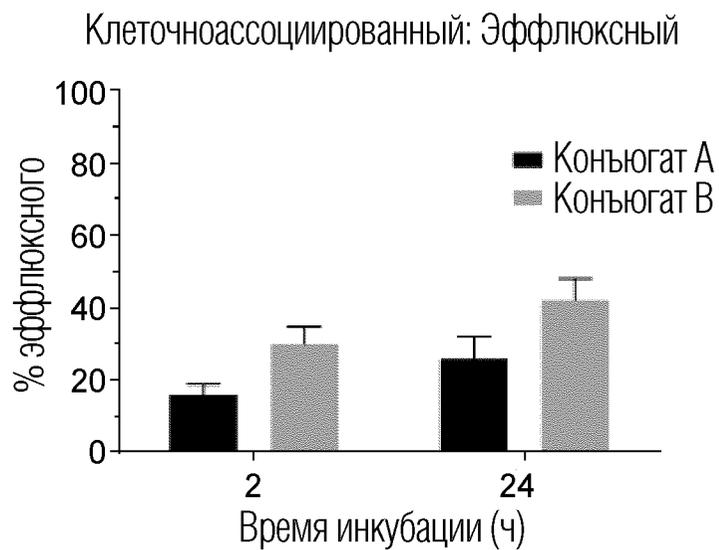


ФИГ. 6А

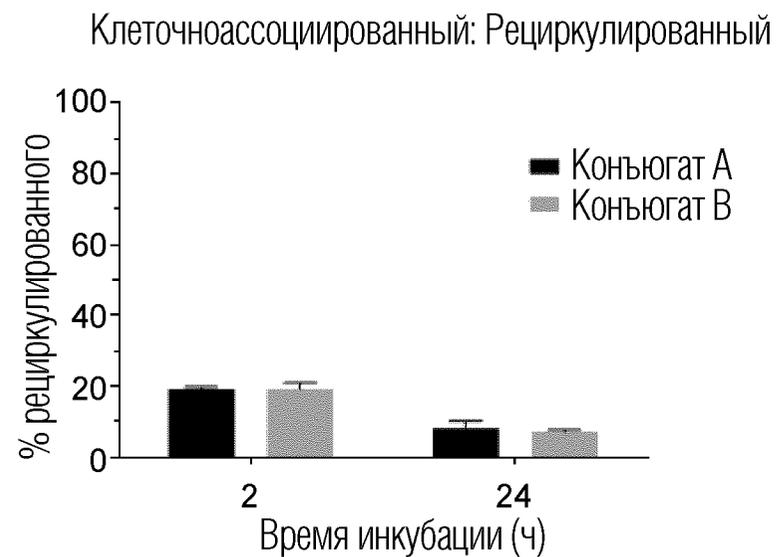
Клеточноассоциированный: Интернализованный



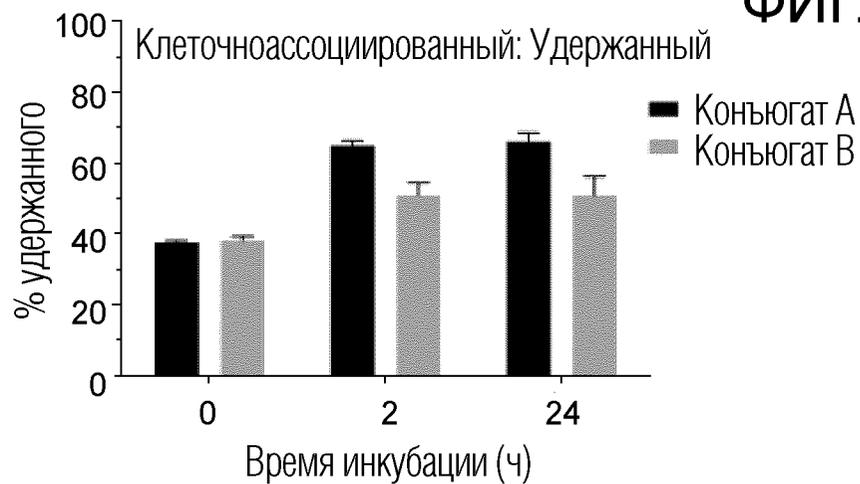
ФИГ. 6В



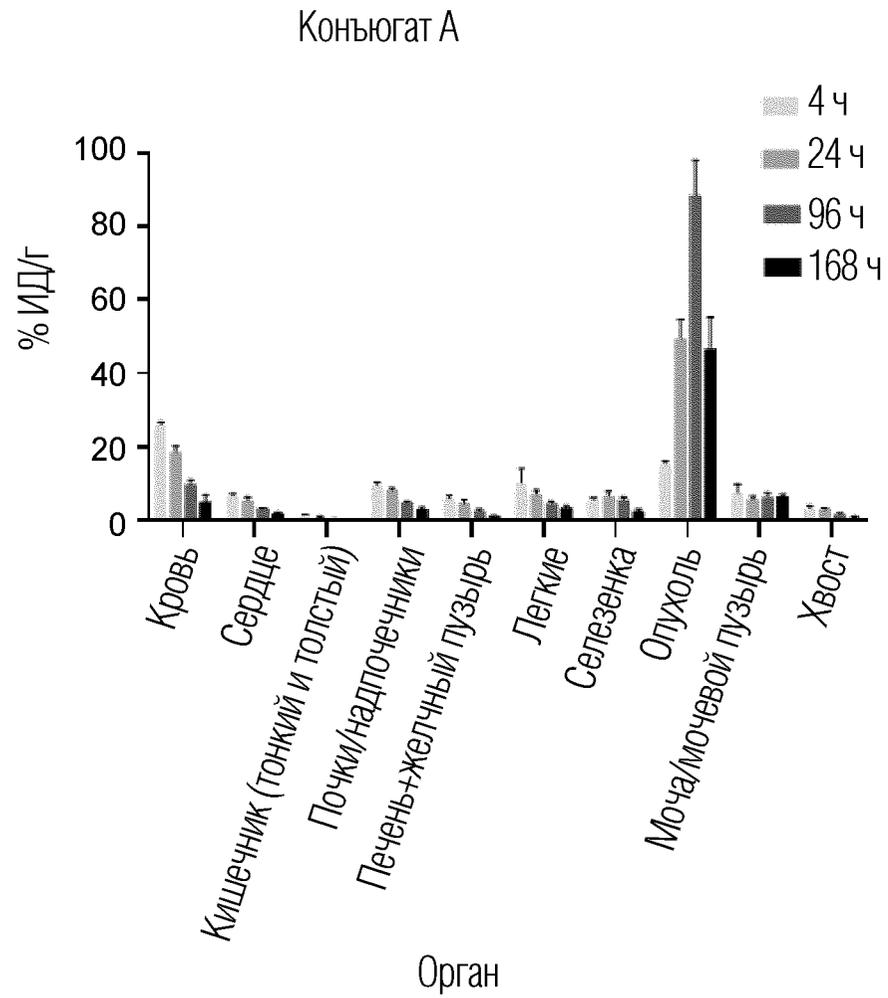
ФИГ. 7А



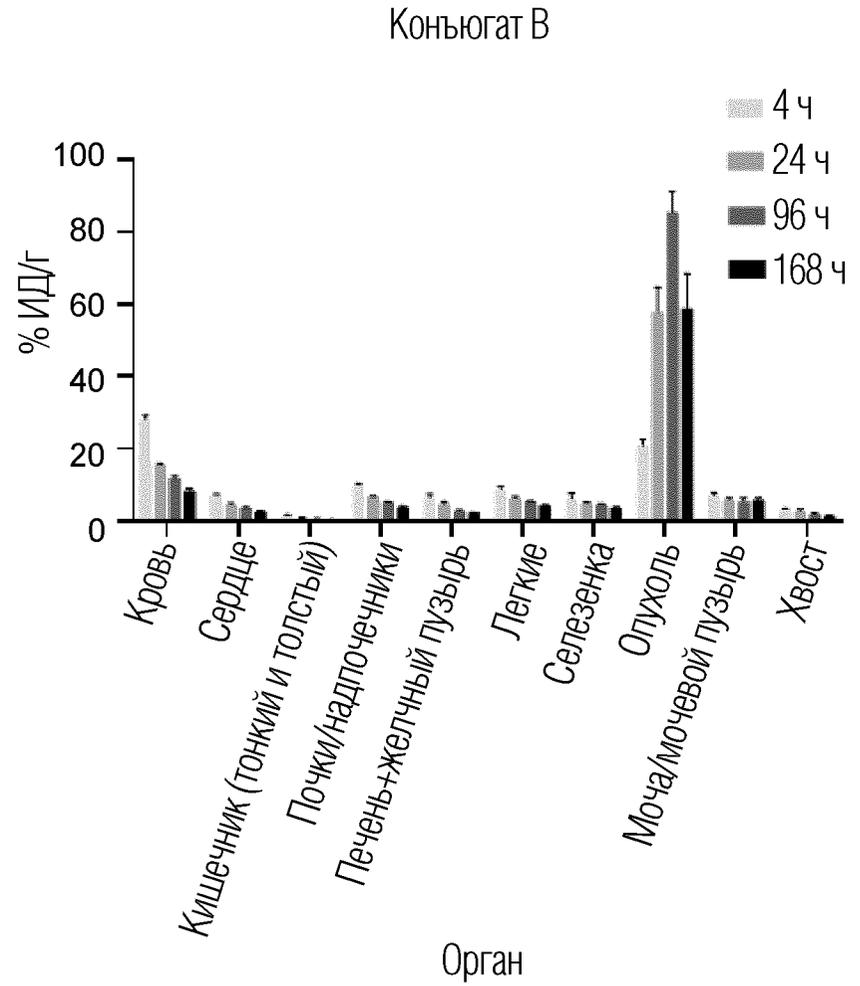
ФИГ. 7В



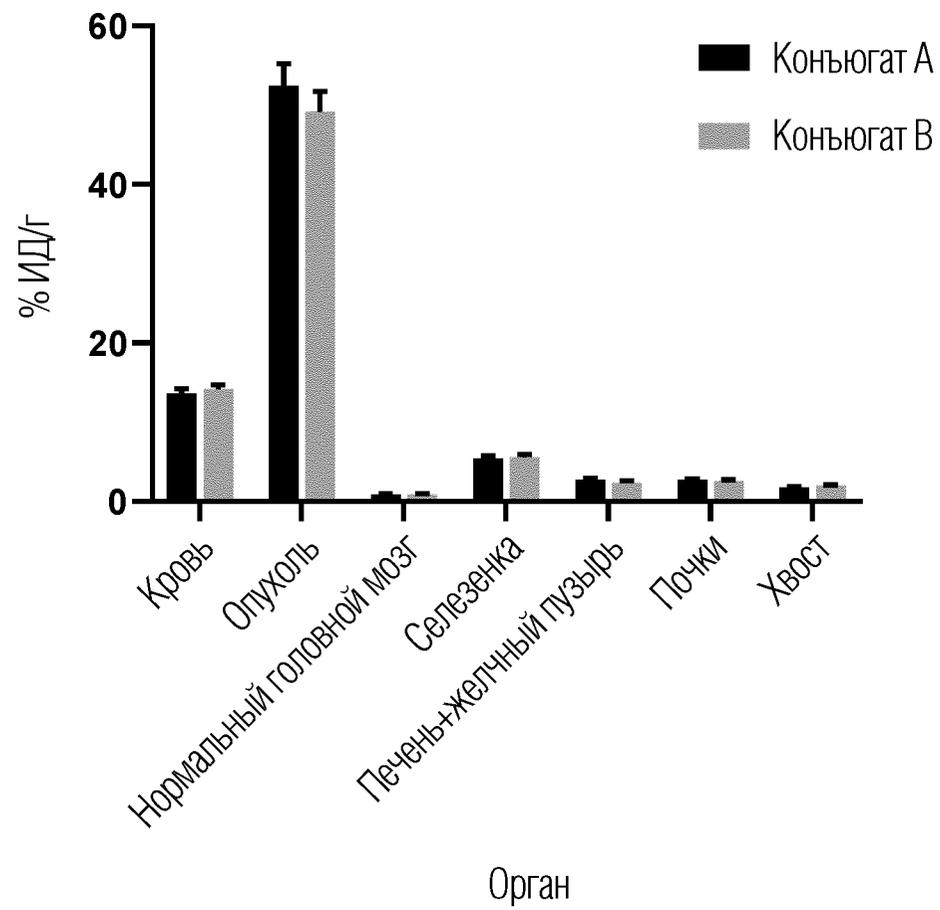
ФИГ. 7С



ФИГ. 8А



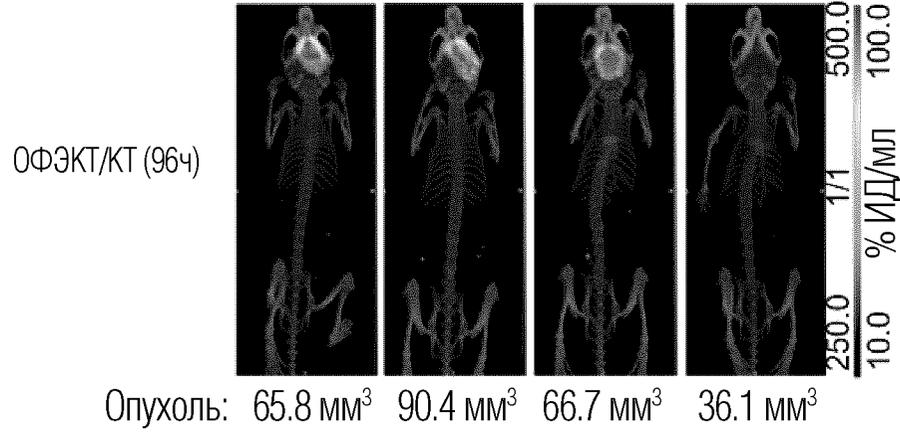
ФИГ. 8В



ФИГ. 9

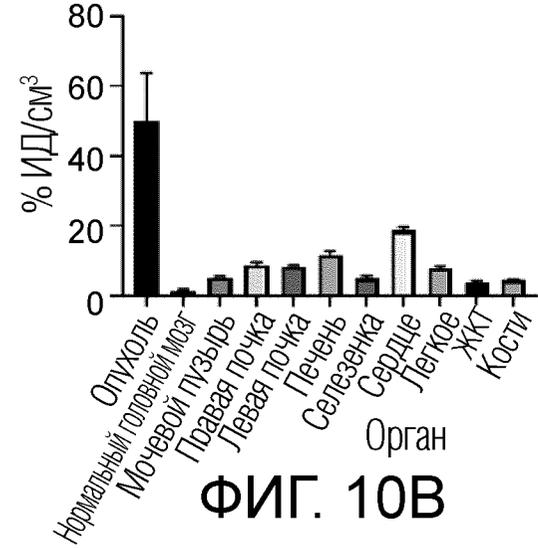
Ортотопическая G39-GFP-Luc модель

[¹¹¹In]-Соединение C-анти-EGFRvIII



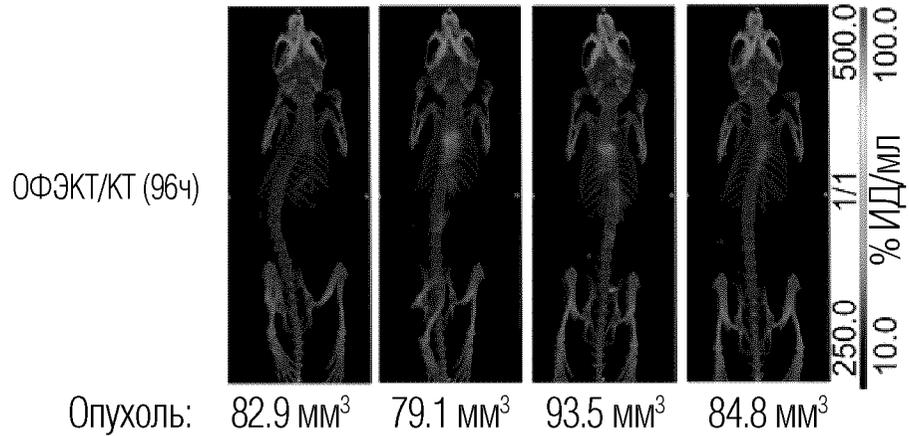
ФИГ. 10А

[¹¹¹In]-Соединение C-анти-EGFRvIII



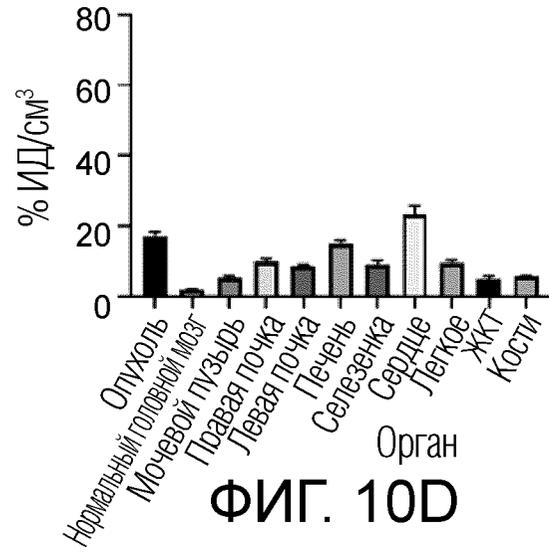
ФИГ. 10В

[¹¹¹In]-Соединение C-анти-IgG4



ФИГ. 10С

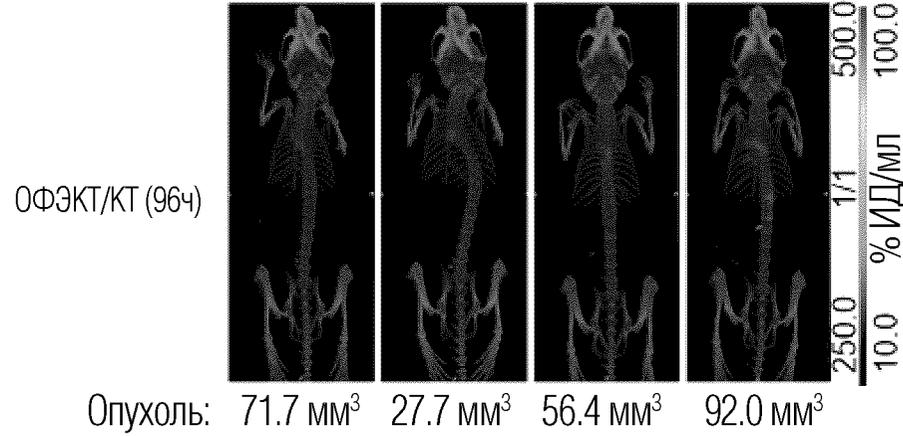
[¹¹¹In]-Соединение C-анти-IgG4



ФИГ. 10D

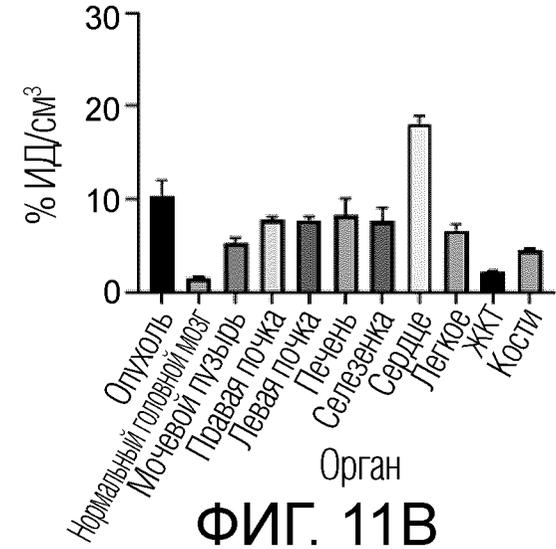
Ортопическая G06-GFP-Luc модель

[¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII



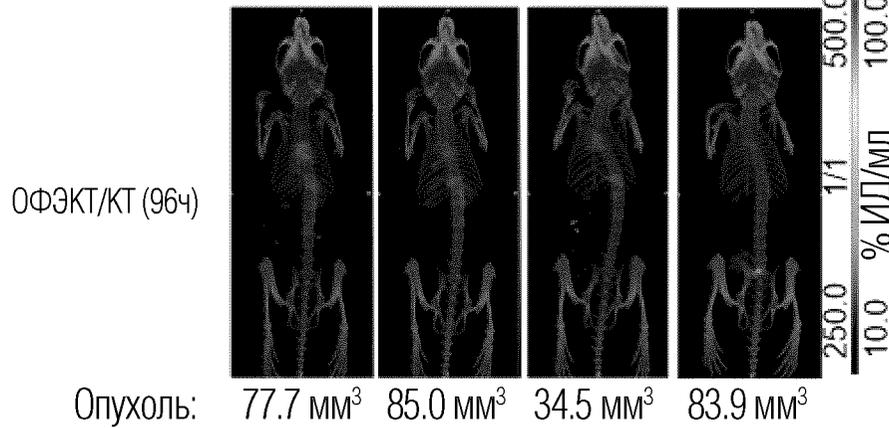
ФИГ. 11А

[¹¹¹In]-Соединение С-анти-EGFRvIII



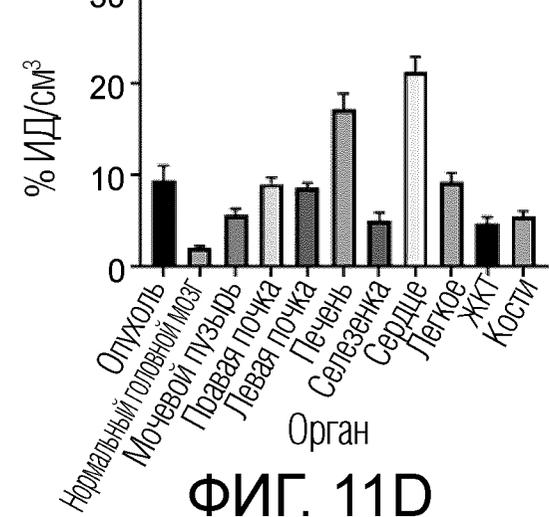
ФИГ. 11В

[¹¹¹In]-Соединение С-анти-IgG4



ФИГ. 11С

[¹¹¹In]-Соединение С-анти-IgG4



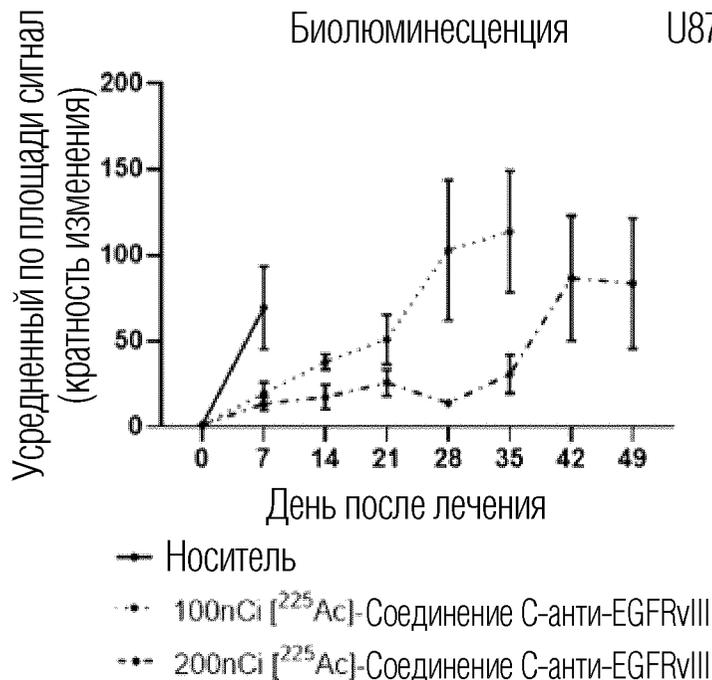
ФИГ. 11D

Ортотопическая

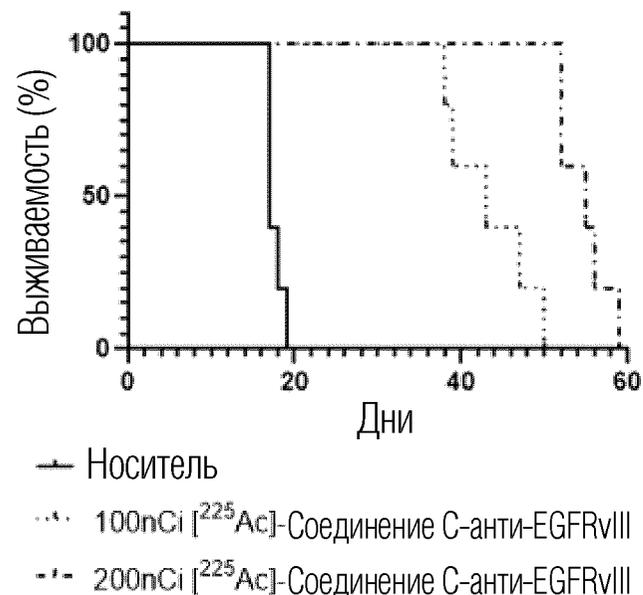
Биолюминесценция

U87-EGFRvIII-GFP-Luc модель

Выживаемость



ФИГ. 12А

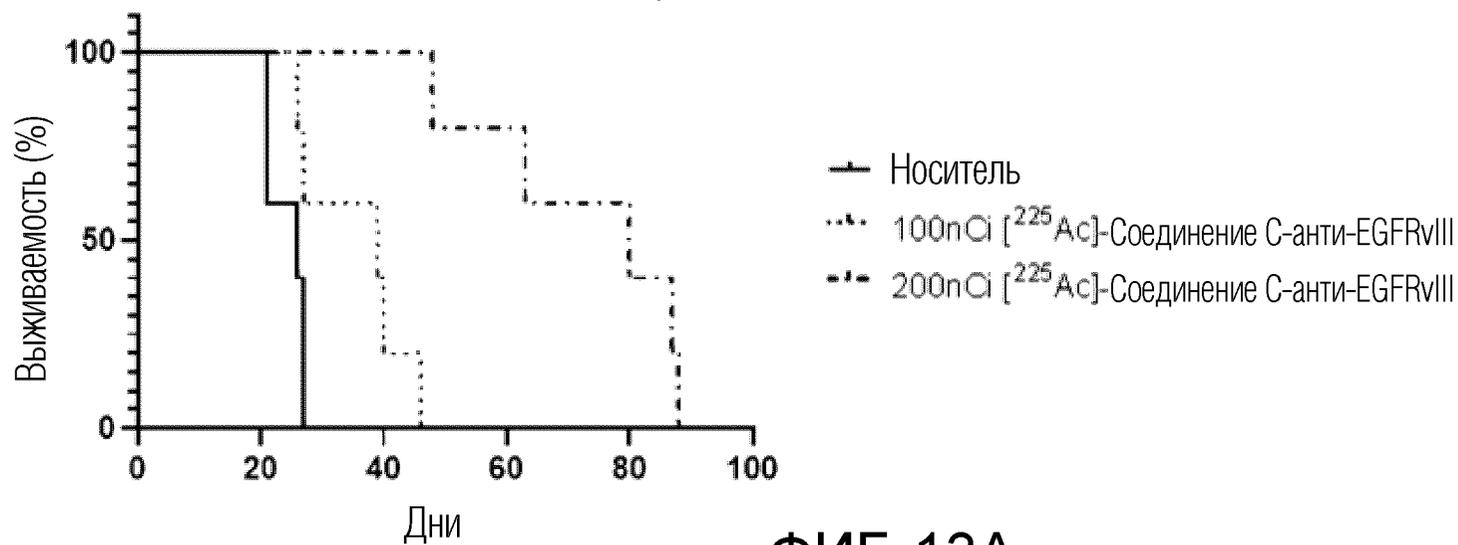


ФИГ. 12В

Группа лечения	n	Медианная выживаемость (дни)	Преимущество в выживаемости	p-значение (к носителю)
Носитель	5	17	1.0	
100nCi [²²⁵ Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII	5	43	2.5	0.02
200nCi [²²⁵ Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII	5	55	3.2	0.02

ФИГ. 12С

Ортопическая G06-GFP-Luc модель

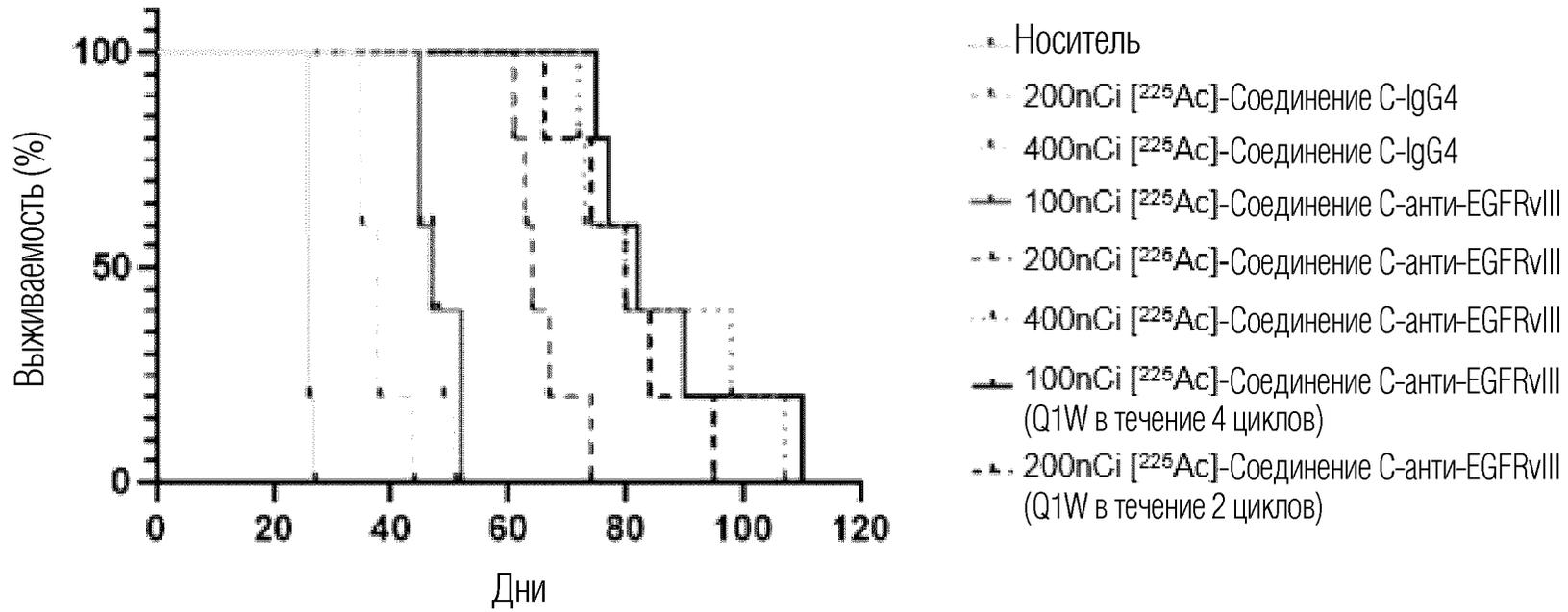


ФИГ. 13А

Группа лечения	n	Медианная выживаемость (дни)	Преимущество в выживаемости	p-значение (к носителю)
Носитель	5	26	1.0	
100nCi [²²⁵ Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII	5	39	1.5	0.04
200nCi [²²⁵ Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII	5	80	3.1	0.003

ФИГ. 13В

Ортопическая G39-GFP-Luc PDX модель



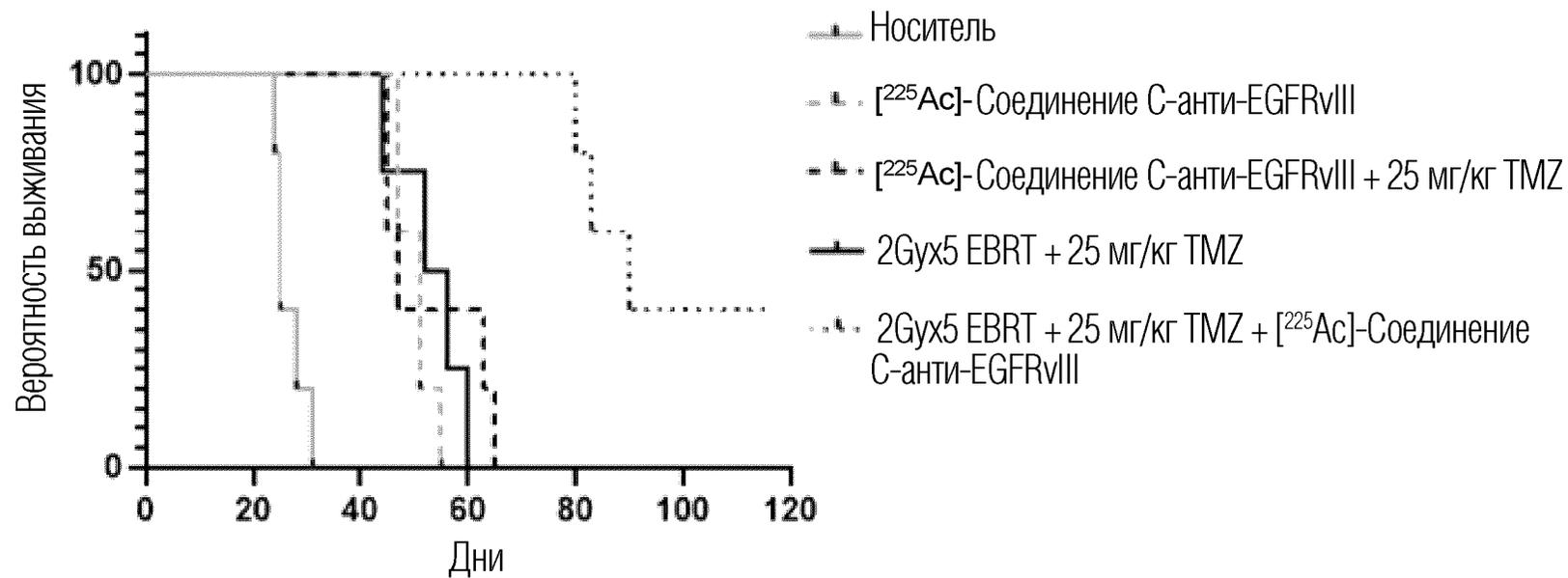
ФИГ. 14А

Ортотопическая G39-GFP-Luc PDX модель

Группа лечения	n	Медианная выживаемость (дни)	Преимущество в выживаемости	p-значение (к носителю)
Носитель	5	26	1.0	
200nCi [²²⁵ Ac]-Соединение C-IgG4	5	38	1.5	0.002
400nCi [²²⁵ Ac]-Соединение C-IgG4	5	48	1.9	0.002
100nCi [²²⁵ Ac]-Соединение C-анти-EGFRvIII	5	47	1.8	0.002
200nCi [²²⁵ Ac]-Соединение C-анти-EGFRvIII	5	64	2.5	0.002
400nCi [²²⁵ Ac]-Соединение C-анти-EGFRvIII	5	80	3.1	0.002
100nCi [²²⁵ Ac]-Соединение C-анти-EGFRvIII (Q1W в течение 4 циклов)	5	82	3.2	0.002
200nCi [²²⁵ Ac]-Соединение C-анти-EGFRvIII (Q1W в течение 2 циклов)	5	80	3.1	0.002

ФИГ. 14В

Ортотопическая G06-GFP-Luc PDX модель



ФИГ. 15А

Ортотопическая G06-GFP-Luc PDX модель

Группа лечения	n	Медианная выживаемость (дни)	Преимущество в выживаемости	p-значение (к носителю)
Носитель	5	25	1.0	
[²²⁵ Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII	5	51	2.0	0.002
[²²⁵ Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII + 25 мг/кг TMZ	5	47	1.9	0.002
2Gyx5 EBRT + 25 мг/кг TMZ	5	52	2.1	0.005
2Gyx5 EBRT + 25 мг/кг TMZ + [²²⁵ Ac]-Соединение С-анти-EGFRvIII	5	90	3.6	0.002

ФИГ. 15В