

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491894 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.18

(51) Int. Cl. A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.01.25

(54) ИММУНОКОНЬЮГАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ К РОДСТВЕННОЙ КАЛЛИКРЕИНУ ПЕПТИДАЗЕ 2, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/303,083

(32) 2022.01.26

(33) US

(86) PCT/IB2023/050634

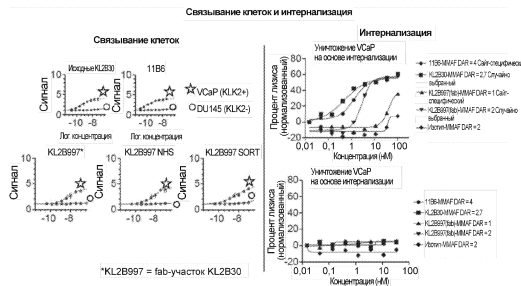
(87) WO 2023/144723 2023.08.03

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Шэнь Фэй, Макдевитт Тереза,
Голдберг Шалом, Уайли Кристен,
Смит Райан М., Венкатарамани
Сатхьядеви (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В настоящем документе предложены иммуноконъюгаты, такие как радиоактивные иммуноконъюгаты, содержащие терапевтический фрагмент, конъюгированный с антителом или антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с hK2. В определенных вариантах осуществления hK2-специфический иммуноконъюгат демонстрирует короткий период полужизни. В настоящем документе также предложены способы использования иммуноконъюгатов для избирательного нацеливания на раковые клетки и для лечения заболеваний, таких как рак предстательной железы.



A1

202491894

202491894

A1

ИММУНОКОНЬЮГАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ К РОДСТВЕННОЙ КАЛЛИКРЕИНУ ПЕПТИДАЗЕ 2, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

5

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 63/303 083, поданной 26 января 2022 г., которая полностью и для всех целей включена в настоящий документ путем ссылки.

10

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Настоящая заявка содержит машиночитаемый перечень последовательностей, который был представлен в формате XML вместе с настоящей заявкой, полное содержание которого включено в настоящий документ путем ссылки во всей его полноте. XML-файл с перечнем последовательностей, представленный с данной заявкой, имеющий название «JBI6697WOPCT1_SL.xml», был создан 07 ноября 2022 г. и имеет размер 747 970 байт.

15

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В изобретении обеспечены иммуноконъюгаты, такие как радиоактивные конъюгаты, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают белок — родственную калликреину пептидазу 2 (hK2), и способы их получения и применения.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рак предстательной железы занимает второе место среди наиболее часто диагностируемых видов рака и шестое среди основных причин смерти от рака у мужчин; на него приходится около 14% от общего числа новых случаев рака и около 6% от общего числа случаев смерти от рака у мужчин во всем мире. Течение рака предстательной железы от постановки диагноза до смерти лучше всего классифицировать как ряд клинических стадий на основании степени заболевания, гормонального статуса и наличия или отсутствия обнаружимых метастазов: локализованное заболевание, повышение уровней простатспецифического антигена (PSA) после лучевой терапии или хирургического вмешательства без обнаружимых метастазов и клинические метастазы в состоянии до или после кастрации. Несмотря на

25

30

то что проведение операции, лучевой терапии или комбинация обоих способов лечения может оказывать лечебный эффект на пациентов с локализованным заболеванием, у значительной части этих пациентов происходит рецидив заболевания, о чем свидетельствует повышающийся уровень PSA, что может привести к развитию метастазов, особенно в группе высокого риска — переход к смертельной стадии заболевания.

Андроген-депривационная терапия (ADT) представляет собой стандартное лечение с по существу прогнозируемым исходом: снижение уровня PSA, период стабильности, в течение которого опухоль не пролиферирует, с последующим возрастанием уровня PSA и рецидивом в форме кастрационно-резистентного заболевания. Исторически ADT стали использовать в качестве стандарта для лечения пациентов с метастатическим раком предстательной железы.

Родственная калликреину пептидаза 2 (hK2, HK2) представляет собой трипсиноподобный фермент с экспрессией, регулируемой андрогеновым рецептором (AR), специфичной для ткани предстательной железы и рака предстательной железы. Экспрессия hK2 ограничена тканями предстательной железы и рака предстательной железы, однако недавно hK2 была обнаружена в клеточной линии рака молочной железы и первичных образцах пациента после соответствующей активации AR-пути стероидными гормонами (U.S. Pat. Publ. No. 2018/0326102). Ретроградное высвобождение каталитически неактивной hK2 в кровь происходит, когда сложная структурная организация предстательной железы нарушается из-за гипертрофии или злокачественной трансформации.

По-прежнему сохраняется потребность в нацеленных на hK2 терапиях для терапевтических и диагностических целей.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к радиоактивному антителу-конъюгату к hK2, содержащему антигенсвязывающий домен, конъюгированный с хелатором, который связывает радиоактивные металлы для терапевтического применения или визуализации. Согласно конкретным вариантам осуществления радиоактивный антитело-конъюгат к hK2, содержащий антигенсвязывающий домен, имеет более короткий период полужизни по сравнению с радиоактивным антителом-конъюгатом к hK2, содержащим полноразмерное антитело.

Во многих случаях период полужизни иммуноглобулина G (IgG) в кровотоке у людей составляет приблизительно 10–21 день. Fc-домен в интактном IgG способен связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), что приводит к рециркуляции антител и минимальной деградации в эндосомах. FcRn играет ключевую роль в гомеостазе IgG в сыворотке, а также в переносе молекул IgG через плаценту от матери к плоду. После пиноцитоза кислотная среда в ранней эндосоме позволяет IgG (а также альбумину) связываться с FcRn, что обеспечивает защиту от деградации и облегчает миграцию IgG обратно в внеклеточную среду, где молекулы распадаются обратно в кровотоки под воздействием физиологического pH.

Период полужизни антигенсвязывающего домена, такого как Fab, в кровотоке, как правило, намного короче, чем у IgG. Поскольку Fab-фрагмент не содержит Fc-домена, опосредованный FcRn механизм увеличения периода полужизни отсутствует, поэтому у Fab самого по себе более короткий период полужизни (например, менее 24 часов или менее 12 часов, а в некоторых случаях около 2–3 часов).

В варианте осуществления настоящего изобретения обеспечен иммуноконъюгат, содержащий терапевтический фрагмент, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтический фрагмент представляет собой цитотоксический агент.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтический фрагмент представляет собой агент для визуализации.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтический фрагмент содержит радиоактивный металл. Не имеющие ограничительного характера примеры приемлемых радиоактивных металлов включают ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{32}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{255}Fm , ^{227}Th , ^{177}Lu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr и ^{111}In .

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтический фрагмент представляет собой цитотоксический агент, содержащий ^{225}Ac .

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтический фрагмент представляет собой агент для визуализации, содержащий ^{111}In или ^{64}Cu .

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтический фрагмент содержит комплекс радиоактивного металла, причем комплекс радиоактивного металла

содержит радиоактивный металл, связанный с хелатором, и при этом хелатор конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

Согласно определенным вариантам осуществления хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту (NOTA), 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA), 3,6,9,15-тетраазабицикло[9.3.1]-пентадека-1(15),11,13-триен-4-(S)-(4-изотиоцианатобензил)-3,6,9-триуксусную кислоту (PCTA), 5-S-(4-аминобензил)-1-окса-4,7,10-триазациклододекан-4,7,10-трис(уксусную кислоту) (DO3A) или их производное.

Согласно определенным вариантам осуществления хелатор представляет собой DOTA.

Согласно определенным вариантам осуществления хелатор представляет собой H₂bp18сб или производное H₂bp18сб.

Согласно определенным вариантам осуществления комплекс радиоактивного металла представляет собой радиоактивный комплекс формулы (I-m), или формулы (II-m), или формулы (III-m), как описано в настоящем документе, причем R₁₁ содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), а М представляет собой радиоактивный металл.

Согласно определенным вариантам осуществления комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (IV-m), или формулы (V-m), или формулы (VI-m), как описано в настоящем документе, причем R₄ содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), а М⁺ представляет собой радиоактивный металл.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтический фрагмент представляет собой производное ауристатина, такое как MMAE (монометил ауристатин E) или MMAF (монометил ауристатин F).

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, F(ab')₂, Fd, dAb или VHH.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, представляет собой Fab.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170

(SYYWS), SEQ ID NO: 171 (YIYYSGSTNYPNPSLKS), SEQ ID NO: 172 (TTIFGVVTPNFYYGMDV), SEQ ID NO: 173 (RASQGISSYLA), SEQ ID NO: 174 (AASTLQS) и SEQ ID NO: 175 (QQLNSYPLT) соответственно.

5 Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH с SEQ ID NO: 162 (QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS 10), и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL с SEQ ID NO: 163 (DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK).

15 Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, который содержит: А) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или В) 20 VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.

Согласно определенным вариантам осуществления иммуноконъюгат представляет собой иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни.

Согласно определенным вариантам осуществления способ лечения рака с экспрессией hK2 у субъекта включает введение субъекту терапевтически эффективного 25 количества иммуноконъюгата в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления.

Согласно определенным вариантам осуществления способ уменьшения количества экспрессирующих hK2 опухолевых клеток у субъекта включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата в соответствии с 30 любым из вышеупомянутых вариантов осуществления.

Согласно определенным вариантам осуществления способ лечения рака предстательной железы у субъекта включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления.

Согласно определенным вариантам осуществления рак предстательной железы представляет собой рецидивирующий, рефрактерный, злокачественный или кастрационно-резистентный рак предстательной железы или любую их комбинацию.

5 Согласно определенным вариантам осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

10 Согласно определенным вариантам осуществления способ обнаружения наличия рака предстательной железы у субъекта включает введение иммуноконъюгата в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления субъекту, предположительно имеющему рак предстательной железы, и визуализацию биологических структур, с которыми связывается конъюгат (например, с помощью компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом наличия рака предстательной железы, причем иммуноконъюгат предпочтительно содержит агент для визуализации, такой как ^{111}In или ^{64}Cu . Согласно определенным вариантам осуществления способ включает конъюгирование терапевтического фрагмента с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

15 Согласно определенным вариантам осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата, описанного в настоящем документе, включает связывание радиоактивного металла с хелатором, который конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

20 Согласно определенным вариантам осуществления радиоактивный иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни содержит комплекс радиоактивного металла, причем комплекс радиоактивного металла содержит ^{225}Ac , связанный с хелатором, и при этом хелатор конъюгирован с Fab, специфически связывающимся с hK2, причем указанный Fab содержит: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно. Согласно определенным вариантам осуществления указанный Fab содержит VH с SEQ ID NO: 30 162 и VL с SEQ ID NO: 163.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Вышеупомянутое краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения станут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми

графическими материалами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

На графических материалах:

5 На **ФИГ. 1** показано связывание с клетками и интернализация иммуноконъюгата настоящего изобретения, содержащего Fab KL2B30 (идентифицирован как KL2B997), конъюгированный с ММАF (монометилауристатином F) в клетках VCaP, экспрессирующих hK2.

10 На **ФИГ. 2** показаны аминокислотные последовательности (последовательности тяжелой цепи и легкой цепи) KL2B997 и KL2B1251. KL2B997 имеет His-метку и сортазную метку (подчеркнуты на **ФИГ. 2**) на тяжелой цепи, а KL2B1251 не имеет метки.

15 На **ФИГ. 3А** показано связывание Fab KL2B30 (KL2B1251) и KL2B1251, конъюгированных с производным NOTA (NODA-GA) в клетках VCaP, экспрессирующих hK2; и на **ФИГ. 3Б** показано отсутствие связывания в hK2-отрицательных клетках DU145.

На **ФИГ. 4** показана репрезентативная структура NODA-GA в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

20 На **ФИГ. 5** представлены данные по индивидуальным массам тела и дозам, вводимым самцам яванских макак, которым вводили однократные в/в дозы KL2B1251-NOTA (в группе 1) и KL2B1251-ТОРА (в группе 2).

На **ФИГ. 6** показаны индивидуальные и средние (СО) оценки фармакокинетики KL2B1251-NOTA (в группе 1) и KL2B1251-ТОРА (в группе 2) в сыворотке после однократного в/в введения самцам яванских макак дозы 1 мг/кг.

25 На **ФИГ. 7** показаны средние (СО) концентрации KL2B1251-NOTA и KL2B1251-ТОРА в сыворотке в зависимости от времени после однократного в/в введения дозы 1 мг/кг самцам яванских макак.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящего описания изобретения приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание изобретения, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких

источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

5 Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в данном документе имеют значения, установленные в данном описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в данном документе, включены в него посредством ссылки, как если бы они полностью излагались в данном документе.

10 В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий в себя как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого.
15 Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте настоящего документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно,
20 удовлетворяет требованию термина «и/или».

В попытке помочь читателю заявки описание было разделено на различные абзацы или разделы или направлено на различные варианты осуществления заявки. Эти
25 подразделения не следует рассматривать как разъединение сущности абзаца, или раздела, или вариантов осуществления от сущности другого абзаца, или раздела, или вариантов осуществления. Напротив, специалисту в данной области техники будет понятно, что описание имеет широкое применение и охватывает все комбинации различных разделов, абзацев и предложений, которые могут быть рассмотрены. Обсуждение
любого варианта осуществления предназначено только для примера и не предполагает, что объем описания, включая формулу изобретения, ограничен этими примерами.

30 В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

В случае представления списка, если не указано иное, следует понимать, что каждый отдельный элемент этого списка и каждая комбинация из этого списка является отдельным вариантом осуществления. Например, список вариантов осуществления, представленный в виде «А, В или С», следует интерпретировать как включающий в себя варианты осуществления «А», «В», «С», «А или В», «А или С», «В или С» или «А, В или С».

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает в себя комбинацию двух или более клеток и т. п.

Переходные термины «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т. е. (i) термин «содержащий», который является синонимом терминов «включающий (в себя)», «содержащий» или «характеризующийся», является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или этапы способа; (ii) термин «состоящий из» исключает любые элемент, этап или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения; и (iii) термин «состоящий по существу из» ограничивает объем пункта формулы изобретения конкретными материалами или этапами «и теми, которые не оказывают существенного влияния на основную (-ые) и новую (-ые) характеристику (-и)» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы «содержащий» (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из».

Термин «около» означает «в пределах приемлемого диапазона ошибки» для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения.

Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность», «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к механизму индукции гибели клеток, которая зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например натуральными киллерными клетками (NK), моноцитами, макрофагами и

нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (Fc γ R), экспрессирующихся на эффекторных клетках.

5 Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» или «ADCP» относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки.

10 Термин «антиген» относится к любой молекуле (например, белку, пептиду, полисахариду, гликопротеину, гликолипиду, нуклеиновой кислоте, их части или их комбинации), способной связываться с антигенсвязывающим доменом или T-клеточным рецептором, способным опосредовать иммунный ответ. Примеры иммунных ответов включают в себя выработку антител и активацию иммунных клеток, таких как T-клетки, B-клетки или NK-клетки. Антигены могут экспрессироваться генами, синтезироваться или быть полученными путем очистки из биологических образцов, таких как образец ткани, образец опухоли, клетка или жидкость с помощью других биологических компонентов, организмов, субъединиц белков/антигенов, 15 убитых или инактивированных цельных клеток или лизатов.

«Антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий домен» относится к части изолированного белка, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды и включают части 20 иммуноглобулина, которые связывают антиген, такие как VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, переменные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, VHH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки 25 FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, альтернативные каркасы, которые связывают антиген, и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие фрагменты. Антигенсвязывающие фрагменты (такие как VH и VL) могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одиночных антител, в которых домены 30 VH/VL можно объединять в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными цепями с образованием моновалентного антигенсвязывающего домена, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело. Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий

фрагмент» или «антигенсвязывающий домен» не применяется к полноразмерному антителу, имеющему Fc-область.

Термин «антитела» подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, в том числе мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические, триспецифические, тетраспецифические, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт с необходимой специфичностью.

«Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина могут относиться к пяти основным классам — IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин «рак» обозначает широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые прорастают в соседние ткани и могут также метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. «Рак» или «раковая ткань» может включать в себя опухоль.

«Определяющие комплементарность области» (CDR) представляют собой области антител, которые связывают антиген. Существуют три CDR в области VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в области VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). CDR можно определить с помощью различных систем разграничения, таких как Kabat (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211–50; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55–77) и AbM (Martin and Thornton J Vmol Biol 263: 800–15, 1996).
 5
 10
 15
 20
 25
 30

Описано соответствие между различными системами разграничения и нумерациями переменных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55–77; Honegger and Pluckthun, J Mol Biol (2001) 309:657–70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы, [http://www_imgt_org](http://www.imgt.org)). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Применяемые в настоящем документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабату, по Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

Термин «уменьшение», «меньший» «уменьшать», «снижать» или «ослаблять» относится по существу к способности тестируемой молекулы опосредовать сниженный ответ (т. е. эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, опосредованным контролем или несущей средой. Иллюстративные ответы представляют собой размножение Т-клеток, активацию Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fc γ или улучшенные эффекторные функции Fc, такие как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Уменьшение может представлять собой статистически значимое различие в измеренном ответе между тестируемой молекулой и контролем (или несущей средой) или снижение измеренного ответа, например, уменьшение в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например, в 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз или более (включая все целые числа и десятичные точки в интервале между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин «дифференциация» относится к способу уменьшения потенциала или пролиферации клетки или перевода клетки в состояние, более ограниченное с точки зрения развития.

Термин «кодировать» или «кодирующий» относится к возможности осуществлять функцию матриц, присущей конкретным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Термины «усиливать», «активировать», «увеличивать», «расширять» или «улучшать» относятся по существу к способности тестируемой молекулы опосредовать более высокий ответ (т. е. эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, опосредуемым контрольным образцом или несущей средой. Иллюстративные ответы представляют собой размножение Т-клеток, активацию Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fc γ или улучшенные эффекторные функции Fc, такие как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Усиление может представлять собой статистически значимое различие в измеренном ответе между тестируемой молекулой и контролем (или несущей средой) или повышение измеренного ответа, например, повышение в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например, в 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз или более (включая все целые числа и десятичные точки в интервале между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин «эпитоп» относится к части антигена, с которой специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, формирующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена

подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка. «Эпитоп» антитела зависит от методологии, применяемой для выявления эпитопа.

Термин «рост» обозначает результат деления и гибели клеток.

5 Термин «экспрессировать» и «экспрессия» относится к хорошо изученным транскрипции и трансляции, происходящим в клетках или *in vitro*. Таким образом, продукт экспрессии, например белок, экспрессируется клеткой или *in vitro* и может представлять собой внутриклеточный, внеклеточный или трансмембранный белок.

10 Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин «dAb» или «фрагмент dAb» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена VH (Ward et al., Nature 341:544 546 (1989)).

15 Термин «Fab», или «фрагмент Fab», или «область Fab» относится к области антитела, которая связывается с антигенами. Традиционный IgG, как правило, содержит две области Fab, причем каждая из них находится в одном из двух плеч Y-образной структуры IgG. Каждая область Fab обычно образована одной варибельной областью и одной константной областью каждой из тяжелой и легкой цепей. Более
20 конкретно, варибельная область и константная область тяжелой цепи в области Fab представляют собой области VH и CH1, а варибельная область и константная область легкой цепи области Fab представляют собой области VL и CL. VH, CH1, VL и CL в области Fab могут быть организованы различным образом, чтобы обеспечивать способность связывать антиген в соответствии с настоящим описанием.
25 Например, области VH и CH1 могут располагаться в одном полипептиде, а области VL и CL могут находиться в другом полипептиде, подобно области Fab в традиционном IgG. Альтернативно области VH, CH1, VL и CL могут находиться в одном и том же полипептиде и размещаться в различном порядке.

30 Термин «F(ab')₂» или «фрагмент F(ab')₂» относится к фрагменту антитела, содержащему два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

Термин «Fd» или «фрагмент Fd» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и CH1.

Термин «Fv» или «фрагмент Fv» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и VL из одного плеча антитела. Фрагменты Fv не содержат константных областей Fab (CH1 и CL). Домены VH и VL в фрагментах Fv удерживаются вместе за счет нековалентного взаимодействия.

5 Термин «Fc полипептид» димерного Fc относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен. Например, Fc полипептид димерного FC IgG содержит последовательность константного домена CH2 IgG и CH3 IgG).

10 «Полноразмерное антитело» состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена тяжелой цепи (VH) и константного домена тяжелой цепи, состоящего из субдоменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменного домена легкой цепи (VL) и константного домена легкой цепи (CL). VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые
15 определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми располагаются каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

20 Термин «клетка-хозяин» обозначает любую клетку, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Типичная гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой вектор (*например*, вектор экспрессии).

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Переменные области человеческого антитела получают из
25 последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если переменные области
30 человеческого антитела получены из системы, в которой применяют иммуноглобулин зародышевой линии человека или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемых на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое

антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в каркасные участки или CDR или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности по меньшей мере на около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57–86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемых на фаге, например, как описано в Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385–96 и международной публ. пат. № WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере одна CDR получена от видов, отличных от человека, не подходят под определение «человеческого антитела».

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором по меньшей мере одна CDR получена из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать в себя замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Выражение «в комбинации с» означает, что два или более терапевтических средства вводят субъекту вместе в смеси, одновременно в виде отдельных средств или последовательно в виде отдельных средств в любом порядке.

Термин «выделенный» относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или полипептиды), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с

большей чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%-я чистота.

Термин «родственная калликреину пептидаза 2» или «hK2» (также называемая «KLK2») относится к изученному белку, который также называется калликреином-2, эндокринным калликреином-2 или hK2. hK2 получают в виде препропротеина и расщепляют во время протеолиза для получения активной протеазы. Все изоформы и варианты hK2 включены в термин «hK2». Аминокислотные последовательности различных изоформ извлекают из номеров доступа в GenBank NP_005542.1, NP_001002231.1 и NP_001243009. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого hK2 приведена в SEQ ID NO: 62. Последовательность включает сигнальный пептид (остатки 1–18) и пропептидную область (остатки 19–24). SEQ ID NO: 62

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLV
 HPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSL
 RPDEDSSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLRPRS
 LQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQG
 ITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP

Термин «модулятор» относится к повышенной или пониженной способности тестируемой молекулы опосредовать усиленный или ослабленный ответ (т. е. эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, опосредованным контролем или несущей средой.

Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или деамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или деамидирование глутамин. Моноклональные антитела, как правило, связывают один антигенный эпитоп. Биспецифическое моноклональное антитело связывает два разных антигенных эпитопа. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

Термин «функционально связанный» и аналогичные фразы, при их использовании в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот, относятся к фактической связи нуклеотидных последовательностей или аминокислотной последовательности соответственно, находящихся в функциональных отношениях друг с другом.

5 Например, функционально связанный промотор, энхансер, открытая рамка считывания, 5-штрих и 3-штрих нетранслируемая область (UTR) и последовательности терминации приводят к точной продукции молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК) и в некоторых случаях к продукции полипептида (т. е., экспрессии открытой рамки считывания). Функционально связанный пептид относится к пептиду, в котором
10 функциональные домены пептида размещены на соответствующем расстоянии друг от друга для того, чтобы наделить каждый домен предполагаемой функцией.

Термин «паратоп» относится к участку или области молекулы антитела, которые участвуют в связывании антигена и содержат остатки, взаимодействующие с антигеном. Паратоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся
15 аминокислот, формирующих конформационное пространственное звено. Паратоп для данного антитела может быть определен и охарактеризован на разных уровнях детализации с использованием различных экспериментальных и вычислительных способов. Экспериментальные способы включают масс-спектрометрию с водородно-дейтериевым обменом (HX-MS). Паратоп будет определяться по-разному в
20 зависимости от используемого способа сопоставления.

Термин «фармацевтическая комбинация» обозначает комбинацию двух или более активных ингредиентов, вводимых либо вместе, либо по отдельности.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, которая получается при комбинировании активного ингредиента и фармацевтически
25 приемлемого носителя.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «эксципиент» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, за исключением активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя буфер, стабилизатор или консервант.

30 Термин «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК представляет собой типичный пример полинуклеотида. Полинуклеотид может представлять собой ДНК или молекулу РНК.

Термины «предотвращать», «предотвращение», «предупреждение» или «профилактика» заболевания или расстройства означают предотвращение возникновения расстройства у субъекта.

5 Термин «пролиферация» относится к увеличению деления клеток, симметричному или асимметричному разделению клеток.

Термин «промотор» относится к минимальным последовательностям, необходимым для инициации транскрипции. Промотор также может включать энхансеры или репрессоры, которые усиливают или подавляют транскрипцию соответственно.

10 Термины «белок» или «полипептид» в настоящем документе используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле, которая содержит один или более полипептидов, каждый из которых состоит из по меньшей мере двух аминокислотных остатков, связанных пептидной связью. Белок может представлять собой мономер или белковый комплекс двух или более субъединиц, причем субъединицы идентичны или
15 отличаются друг от друга. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами». Белок может представлять собой гетерологичный слитый белок, гликопротеин или белок, модифицированный посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, ацетилирование, миристилирование, пальмитоилирование, гликозилирование,
20 окисление, формилирование, амидирование, цитруллинирование, полиглутамилирование, АДФ-рибозилирование, пегилирование или биотинилирование. Белок может быть рекомбинантно экспрессированным.

Термин «рекомбинантный» относится к полинуклеотидам, полипептидам, векторам, вирусам и другим макромолекулам, которые получены, экспрессированы,
25 созданы или выделены рекомбинантными средствами.

Термин «регуляторный элемент» относится к любому генетическому элементу, действующему в цис- или транс-положении, который контролирует некоторые аспекты экспрессии нуклеотидных последовательностей.

Термин «рецидивирующий» относится к повторному возникновению заболевания
30 или признаков и симптомов заболевания после периода улучшения после предшествующего лечения терапевтическим средством.

Термин «рефрактерный» относится к заболеванию, которое не реагирует на лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

Термин «одноцепочечный Fv» или «scFv» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи (VL), и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), причем VL и VH непрерывно соединены посредством полипептидного линкера и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида. Если не указано иное, в контексте данного документа scFv может иметь вариабельные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и C-терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Фрагменты «(scFv)₂», или «тандемный scFv», или «бис-scFv» представляют собой слитый белок, содержащий две вариабельные области легкой цепи (VL) и две вариабельные области тяжелой цепи (VH), причем две области VL и две области VH непрерывно связаны посредством полипептидных линкеров и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида. Две области VL и две области VH, сшитые пептидными линкерами, образуют двухвалентную молекулу VL_A-линкер-VH_A-линкер-VL_B-линкер-VH_B с образованием двух сайтов связывания, способных одновременно связываться с двумя разными антигенами или эпитопами.

Термины «специфически связывается», «специфическое связывание», «специфически связывает» или «связывает» относятся к связыванию молекулы белка с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, молекула белка связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 1 × 10⁻⁷ М или менее, например около 5 × 10⁻⁸ М или менее, около 1 × 10⁻⁸ М или менее, около 1 × 10⁻⁹ М или менее, около 1 × 10⁻¹⁰ М или менее, около 1 × 10⁻¹¹ М или менее или около 1 × 10⁻¹² М или менее, как правило, со значением K_D, которое по меньшей мере в сто раз ниже его значения K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В контексте неоантигенов предстательной железы, описанных в настоящем документе, термин «специфическое связывание» относится к связыванию молекулы белка с неоантигеном предстательной железы без обнаруживаемого связывания с белком дикого типа, вариантом которого является неоантиген. Используемый в настоящем документе термин «антитело или антигенсвязывающий домен, специфично связывающийся с hK2» относится к антителу или антигенсвязывающему домену, специфически связывающемуся с hK2, соответственно.

Термин «субъект» включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин «не относящееся к человеку животное» включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины «субъект» и «пациент» в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» являются взаимозаменяемыми и используются в настоящем документе как синонимы. Т-клетка включает тимоциты, наивные Т-лимфоциты, Т-клетки памяти, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетка может представлять собой клетку Т-хелпер (Th), например Т-хелпер 1 (Th1) или Т-хелпер 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4⁺ Т-клетку) CD4⁺ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8⁺ Т-клетку), инфильтрирующую опухоль цитотоксическую Т-клетку (TIL; CD8⁺ Т-клетку), CD4⁺CD8⁺ Т-клетку или любую другую подгруппу Т-клеток. Также включены «NKT-клетки», относящиеся к специализированной популяции Т-клеток, которые экспрессируют полуинвариантный $\alpha\beta$ Т-клеточный рецептор, но также экспрессируют различные молекулярные маркеры, которые, как правило, ассоциированы с NK-клетками, такими как NK1.1. NKT-клетки включают NK1.1⁺ и NK1.1⁻, а также клетки CD4⁺, CD4⁻, CD8⁺ и CD8⁻. TCR на NKT-клетках уникален тем, что он распознает гликолипидные антигены, презентированные подобной ГКГС I молекулой CD Id. NKT-клетки могут иметь как защитные, так и вредные эффекты из-за их способности продуцировать цитокины, которые способствуют воспалению или иммунной толерантности. Также включены «гамма-дельта-Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки)», которые относятся к специализированной популяции, а именно к небольшой подгруппе Т-клеток, имеющей на своей поверхности отдельный TCR, и в отличие от большинства Т-клеток, в которых TCR состоит из двух гликопротеиновых цепей, обозначенных как α - и β -цепи TCR, TCR в Т-клетках $\gamma\delta$ состоит из γ -цепи и δ -цепи. Т-клетки $\gamma\delta$ могут играть роль в иммунонадзоре и иммунорегуляции, и было обнаружено, что они являются важным источником IL-17 и индуцируют устойчивый цитотоксический CD8⁺ Т-клеточный ответ. Также включены «регуляторные Т-клетки» или «Трег», которые относятся к Т-клеткам, которые подавляют аномальный или избыточный иммунный ответ и играют роль в иммунной толерантности. Трег обычно представляют собой Foxp3-положительные CD4⁺ Т-клетки и могут также включать

Foxp3-отрицательные регуляторные Т-клетки, которые представляют собой IL-10-продуцирующие CD4⁺ Т-клетки.

5 Термины «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество», которые являются взаимозаменяемыми в настоящем документе, относятся к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для
10 достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у
15 субъекта требуемый ответ. Пример показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают в себя, например, улучшение состояния здоровья пациента, сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в
20 другие участки организма.

15 Термин «трансдукция» относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора.

Термины «лечить», «терапия» или «лечения» заболевания или расстройства, такого как рак, относятся к достижению одного или более из следующего:
20 уменьшение тяжести и/или продолжительности расстройства, ингибирование обострения симптомов, характерных для излечиваемого расстройства, ограничение или предотвращение рецидива расстройства у субъектов, которые ранее страдали расстройством, либо ограничение или предотвращение рецидива симптомов у
25 субъектов с ранее проявлявшимися симптомами расстройства.

Термин «опухолевая клетка» или «раковая клетка» относится к раковой,
25 предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, либо *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфекцией от трансформирующего вируса и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты,
30 поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты, она может также возникать спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляются в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, модулировании уровней маркера, специфичных для

опухоли, инвазивности, росте опухоли у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

5 Термины «вариант», «мутант» или «измененный» относятся к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более
заменами, вставками или делециями.

10 Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания изобретения приведена в соответствии с индексом ЕС, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

15 Мутации в константных областях Ig называются следующим образом: L351Y_F405A_Y407V относятся к мутациям L351Y, F405A и Y407V в одной константной области иммуноглобулина. L351Y_F405A_Y407V/T394W относится к мутациям L351Y, F405A и Y407V в первой константной области Ig и мутации T394W
во второй константной области Ig, которые присутствуют в одном мультимерном белке.

20 Термин «VНН» относится к однодоменному антителу или нанотелу, состоящему исключительно из антигенсвязывающего домена тяжелой цепи. Однодоменные антитела VНН не имеют легкой цепи и домена СН1 тяжелой цепи традиционной области Fab.

ХИМИЧЕСКАЯ НОМЕНКЛАТУРА

25 По существу ссылка на определенный элемент, такой как водород или Н, подразумевает включение всех изотопов этого элемента. Например, если определено, что R-группа включает водород или Н, группа также включает в себя дейтерий и тритий. Соединения, содержащие радиоизотопы, такие как тритий, C¹⁴, P³² и S³⁵, таким образом, входят в объем настоящей технологии. Процедуры введения таких меток в соединения настоящей технологии будут очевидны специалистам в данной области на основе описания в настоящем документе.

30 Термин «замещенный» означает, что по меньшей мере один атом водорода замещен неводородной группой, при условии что все нормальные валентности поддерживаются и что замещение приводит к получению стабильного соединения. Если конкретная группа является «замещенной», эта группа может иметь один или более заместителей, предпочтительно от одного до пяти заместителей, более предпочтительно от одного до трех заместителей, наиболее предпочтительно от одного

до двух заместителей, независимо выбранных из списка заместителей. Например, термин «замещенный» относится к органической группе, как определено ниже (например, алкильной группе), в которой содержащиеся одна или более связей с атомом водорода заменены на связь с атомами, не являющимися водородом или углеродом. Замещенные группы также включают в себя группы, в которых одна или более связей с атомом (атомами) углерода или водорода замещены одной или более связями, включающими в себя двойные или тройные связи, с гетероатомом. Таким образом, если не указано иное, замещенная группа замещена одним или более заместителями. В некоторых вариантах осуществления замещенная группа замещена 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями. Примеры заместителей включают в себя: галогены (т. е. F, Cl, Br и I); гидроксильные группы; алкокси, алкенокси, арилокси, аралкилокси, гетероциклил, гетероциклилалкил, гетероциклилокси и гетероциклилалкокси группы; карбонильные группы (оксогруппы); карбоксилаты; сложные эфиры; уретаны; оксимы; гидроксиламины; алкоксиамины; аралкоксиамины; тиолы; сульфиды; сульфоксиды; сульфоны; сульфонилы; пентафторсульфанил (т. е. SF₅), сульфонамиды; амины; N-оксиды; гидразины; гидразиды; гидразоны; азиды; амиды; мочевины; амидины; гуанидины; енамины; имидазы; изоцианаты; изотиоцианаты; цианаты; тиоцианаты; имины; нитрогруппы; нитрилы (т. е. CN); и т. п. Термин «независимо» при использовании в отношении заместителей означает, что, когда возможно более одного из таких заместителей, такие заместители могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

Замещенные кольцевые группы, такие как замещенные циклоалкильные, арильные, гетероциклильные и гетероарильные группы, также включают в себя кольца и кольцевые системы, в которых связь с атомом водорода заменена на связь с атомом углерода. Таким образом, замещенные циклоалкильные, арильные, гетероциклильные и гетероарильные группы также могут быть заменены замещенными или незамещенными алкильными, алкенильными и алкинильными группами, как определено ниже.

В настоящем документе C_m-C_n, например C₁-C₁₁, C₁-C₈ или C₁-C₆, при использовании перед указанием группы означают эту группу, содержащую от m до n атомов углерода.

Алкильные группы включают в себя неразветвленные и разветвленные алкильные группы, имеющие от 1 до 12 атомов углерода, и, как правило, от 1 до 10 атомов углерода или, в некоторых вариантах осуществления, от 1 до 8, от 1 до 6 или от 1 до 4 атомов углерода. Примеры неразветвленных алкильных групп включают в себя такие

группы, как метильная, этильная, н-пропильная, н-бутильная, н-пентильная, н-гексильная, н-гептильная и н-октильная группы. Примеры разветвленных алкильных групп включают в себя, без ограничений, изопропильную, изобутильную, втор-

5 бутильную, трет-бутильную, неопентильную, изопентильную и 2,2-
диметилпропильную группы. Алкильные группы могут быть замещенными или
незамещенными. Типичные замещенные алкильные группы могут быть замещены
одним или более заместителями, такими как перечисленные выше, и включают, без
ограничений, галогеналкил (например, трифторметил), гидроксилалкил, тиоалкил,
аминоалкил, алкиламиноалкил, диалкиламиноалкил, алкоксиалкил, карбоксиалкил и т.
10 п.

Циклоалкильные группы включают моно-, би- или трициклические алкильные
группы, имеющие от 3 до 12 атомов углерода в кольце (-ах) или, в некоторых вариантах
осуществления, от 3 до 10, от 3 до 8 или от 3 до 4, 5 или 6 атомов углерода. Примеры
моноциклических циклоалкильных групп включают, без ограничений,

15 циклопропильную, циклобутильную, циклопентильную, циклогексильную,
циклогептильную и циклооктильную группы. В некоторых вариантах осуществления
циклоалкильная группа имеет от 3 до 8 членов кольца, тогда как в других вариантах
осуществления число атомов углерода в кольце находится в диапазоне от 3 до 5, от 3 до
6 или от 3 до 7. Би- и трициклические кольцевые системы включают как мостиковые
20 циклоалкильные группы, так и конденсированные кольца, такие как, без ограничений,
бицикло[2.1.1] гексан, адамантил, декалин и т. п. Циклоалкильные группы могут
быть замещенными или незамещенными. Замещенные циклоалкильные группы могут
быть замещены один или более раз неводородными и неуглеродными группами, как
определено выше. Однако замещенные циклоалкильные группы также включают в себя
25 кольца, замещенные неразветвленными или разветвленными алкильными группами,
как определено выше. Характерные замещенные циклоалкильные группы могут быть
монозамещенными или могут быть замещены более одного раза, такие как, без
ограничений, 2,2-, 2,3-, 2,4- 2,5- или 2,6-дизамещенные циклогексильные группы,
которые могут быть замещены заместителями, такими как перечисленные выше.

30 Циклоалкилалкильные группы представляют собой алкильные группы, как
определено выше, в которых водород или углеродную связь алкильной группы
заменяют связью с циклоалкильной группой, как определено выше. В некоторых
вариантах осуществления циклоалкилалкильные группы имеют от 4 до 16 атомов
углерода, от 4 до 12 атомов углерода и, как правило, от 4 до 10 атомов углерода.

Циклоалкилалкильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Замещенные циклоалкилалкильные группы могут быть замещены в алкильной, циклоалкильной или как в алкильной, так и циклоалкильной частях группы.

Характерные замещенные циклоалкилалкильные группы могут быть
5 монозамещенными или могут быть замещены более одного раза, например, без ограничений, моно-, ди- или тризамещенные, такие как перечисленные выше.

Алкенильные группы включают в себя линейные и разветвленные алкильные группы, как определено выше, за исключением того, что между двумя атомами углерода присутствует по меньшей мере одна двойная связь. Алкенильные группы
10 имеют от 2 до около 12 атомов углерода, как правило от 2 до 10 атомов углерода или, в некоторых вариантах осуществления, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алкенил может иметь одну углеродную двойную связь или множество углеродных двойных связей, например 2, 3, 4 или более углеродных двойных связей. Примеры алкенильных групп включают, без ограничений, метенил, этенил, пропенил,
15 бутенил и т. д. Алкенильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Характерные замещенные алкенильные группы могут быть монозамещенными или могут содержать более одного заместителя, например, без ограничений, моно-, ди- или тризамещенные, такие как перечисленные выше.

Циклоалкенильные группы включают циклоалкильные группы, определенные
20 выше, имеющие по меньшей мере одну двойную связь между двумя атомами углерода. Циклоалкенильная группа может представлять собой моно- или полициклическую алкильную группу, имеющую от 3 до 12, более предпочтительно от 3 до 8 атомов углерода в кольце (-ах) и содержащую по меньшей мере одну двойную связь между двумя атомами углерода. Циклоалкенильные группы могут быть замещенными или незамещенными. В
25 некоторых вариантах осуществления циклоалкенильная группа может иметь одну, две или три двойные связи или множество углеродных двойных связей, например 2, 3, 4 или более углеродных двойных связей, но не включает ароматических соединений. Циклоалкенильные группы имеют от 3 до 14 атомов углерода или, в некоторых вариантах осуществления, от 5 до 14 атомов углерода, от 5 до 10 атомов углерода или даже 5, 6, 7 или 8 атомов
30 углерода. Примеры циклоалкенильных групп включают циклогексенил, циклопентенил, циклогексадиенил, циклобутадиенил и циклопентадиенил.

Циклоалкилалкильные группы представляют собой алкильные группы, как определено выше, в которых водород или углеродную связь алкильной группы заменяют связью с циклоалкенильной группой, как определено выше.

Циклоалкенилалкильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Замещенные циклоалкенилалкильные группы могут быть замещены в алкильной, циклоалкенильной или как в алкильной, так и циклоалкенильной частях группы. Характерные замещенные циклоалкенилалкильные группы могут быть замещены один или более раз заместителями, такими как перечисленные выше.

Алкинильные группы включают в себя линейные и разветвленные алкильные группы, как определено выше, за исключением того, что между двумя атомами углерода присутствует по меньшей мере одна тройная связь. Алкинильные группы имеют от 2 до 12 атомов углерода, и, как правило, от 2 до 10 атомов углерода или, в некоторых вариантах осуществления, от 2 до 8, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа содержит одну, две или три углеродные тройные связи. Примеры включают, без ограничений, помимо прочего, $-C\equiv CH$, $-C\equiv CCH_3$, $-CH_2C\equiv CCH_3$, $-C\equiv CCH_2CH(CH_2CH_3)_2$. Алкинильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Концевой алкин имеет по меньшей мере один атом водорода, связанный с атомом углерода с тройной связью. Характерные замещенные алкинильные группы могут быть монозамещенными или могут содержать более одного заместителя, например, без ограничений, моно-, ди- или тризамещенные, такие как перечисленные выше. «Циклоалкин» или «циклоалкинил» представляет собой циклоалкильное кольцо, содержащее по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода. Примеры циклоалкинов или циклоалкинильных групп включают, без ограничений, циклооктин, бициклононин (BCN), двухфтористый циклооктин (DIFO), дибензоциклооктин (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинон (BARAC), дибензоазациклооктин (DIBAC), диметоксиазациклооктин (DIMAC), дифторбензоциклооктин (DIFBO), монобензоциклооктин (MOBO) и тетраметокси-DIBO (TMDIBO).

Арильные группы представляют собой циклические ароматические углеводороды, которые не содержат гетероатомов. Арильные группы настоящего документа включают в себя моноциклические, бициклические и трициклические кольцевые системы. Таким образом, арильные группы включают в себя, без ограничений, фенильную, азуленильную, гепталенильную, бифенильную, флуоренильную, фенантренильную, антраценильную, инденильную, инданильную, пенталенильную и нафтильную группы. В некоторых вариантах осуществления арильные группы содержат 6–14 атомов углерода, а в других — от 6 до 12 или даже 6–10 атомов углерода в кольцевых участках групп. В некоторых вариантах

осуществления арильные группы представляют собой фенил или нафтил. Арильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Фраза «арильные группы» включает в себя группы, содержащие конденсированные кольца, такие как конденсированные ароматические-алифатические кольцевые системы (например, инданил, тетрагидратнафтил и т. п.). Характерные замещенные арильные группы могут быть монозамещенными или могут быть замещены более чем один раз. Например, монозамещенные арильные группы включают в себя, без ограничений, 2-, 3-, 4-, 5- или 6-замещенные фенильные или нафтильные группы, которые могут быть замещены заместителями, такими как перечисленные выше. Арильные фрагменты хорошо известны и описаны, например, в работе Lewis, R. J., ed., *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 13th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997). Арильная группа может представлять собой одну кольцевую структуру (т. е. моноциклическую) или содержать множество кольцевых структур (т. е. полициклическую), которые являются конденсированными кольцевыми структурами. Предпочтительно арильная группа представляет собой моноциклическую арильную группу.

Алкоксигруппы представляют собой гидроксильные группы ($-OH$), в которых связь с атомом водорода заменена на связь с атомом углерода замещенной или незамещенной алкильной группы, как определено выше. Примеры линейных алкоксигрупп включают в себя, без ограничений, метокси, этокси, пропокси, бутокси, пентокси, гексокси и т. п. Примеры разветвленных алкоксигрупп включают в себя, без ограничений, изопропокси, втор-бутокси, трет-бутокси, изопентокси, изогексокси и т. п. Примеры циклоалкоксигрупп включают в себя, без ограничений, циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси и т. п. Алкоксигруппы могут быть замещенными или незамещенными. Характерные замещенные алкоксигруппы могут быть замещены один или более раз заместителями, такими как перечисленные выше.

Аналогичным образом алкилтио или тиоалкокси относится к группе $-SR$, в которой R представляет собой алкил, присоединенный к первичной молекуле посредством серного мостика, например $-S$ -метил, $-S$ -этил и т. д. Типичные примеры алкилтио включают в себя, без ограничений, $-SCH_3$, $-SCH_2CH_3$ и т. д.

Используемый в настоящем документе термин «галоген» относится к брому, хлору, фтору или йоду. Соответственно, термин «галоген» означает фтор, хлор, бром или иод. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой фтор. В других вариантах осуществления галоген представляет собой хлор или бром.

Термины «гидрокси» и «гидроксил» могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к $-\text{OH}$.

Термин «карбокси» относится к $-\text{COOH}$.

Термин «циано» относится к $-\text{CN}$.

5 Термин «нитро» относится к $-\text{NO}_2$.

Термин «изотиоцианат» относится к $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$.

Термин «изоцианат» относится к $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$.

Термин «азидо» относится к $-\text{N}_3$.

10 Термин «амино» относится к $-\text{NH}_2$. Термин «алкиламино» относится к аминогруппе, в которой один или оба атома водорода, связанные с азотом, замещены алкильной группой. Алкиламиногруппа может быть представлена как $-\text{NR}_2$, в которой каждый R независимо представляет собой водород или алкильную группу. Например, алкиламин включает метиламин ($-\text{NHCH}_3$), диметиламин ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ и т. д. Предполагается, что используемый в настоящем документе термин «аминоалкил»
15 включает как разветвленные, так и линейные насыщенные алифатические углеводородные группы, замещенные одной или более аминогруппами. Типичные примеры аминоалкильных групп включают, без ограничений, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ и $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_3$.

Используемый в настоящем документе термин «амид» относится к $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$,
20 где каждый R независимо представляет собой алкильную группу или водород. Примеры амидов включают, без ограничений, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

Термины «гидроксиалкил» и «гидроксиалкил» используются взаимозаменяемо и относятся к алкильной группе, замещенной одной или более гидроксильными группами. Алкил может представлять собой разветвленный или линейный алифатический углеводород. Примеры гидроксиалкила включают в себя, без
25 ограничений, гидроксиметил ($-\text{CH}_2\text{OH}$), гидроксипропил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) и т. д.

Используемый в настоящем документе термин «гетероцикл» включает стабильные моноциклические и полициклические углеводороды, которые содержат по меньшей мере один гетероатом, являющийся членом кольца, такой как сера, кислород или азот. Используемый в настоящем документе термин «гетероарил» включает
30 стабильные моноциклические и полициклические ароматические углеводороды, которые содержат по меньшей мере один гетероатом, являющийся членом кольца, такой как сера, кислород или азот. Гетероарил может быть моноциклическим или полициклическим, например бициклическим или трициклическим. Каждое кольцо

гетероциклической или гетероарильной группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или от одного до четырех атомов азота при условии, что общее число гетероатомов в каждом кольце составляет четыре или менее, и каждое кольцо имеет по меньшей мере один атом углерода.

- 5 Гетероарильные группы, которые являются полициклическими, например бициклическими или трициклическими, должны включать по меньшей мере одно полностью ароматическое кольцо, но другое конденсированное кольцо или кольца могут быть ароматическими или неароматическими. Гетероциклическая или гетероарильная группа может быть присоединена по любому доступному атому азота или углерода любого кольца гетероциклической или гетероарильной группы.
- 10 Предпочтительно термин «гетероарил» относится к 5- или 6-членным моноциклическим группам и 9- или 10-членным бициклическим группам, имеющим по меньшей мере один гетероатом (O, S или N) в по меньшей мере одном из колец, причем кольцо, содержащее гетероатом, предпочтительно имеет 1, 2 или 3 гетероатома, более
- 15 предпочтительно 1 или 2 гетероатома, выбранных из O, S и/или N. Гетероатом (-ы) азота гетероарила может (могут) быть замещенным (-ыми) или незамещенным (-ыми). Кроме того, гетероатомы азота и серы гетероарила могут необязательно быть окисленными (т. е. $N \rightarrow O$ и $S(O)_r$, где r равен 0, 1 или 2).

Термин «эфир» относится к $-C(O)_2R$, где R представляет собой алкил.

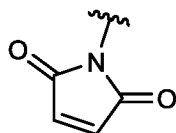
- 20 Термин «карбамат» относится к $-OC(O)NR_2$, где каждый R независимо представляет собой алкил или водород.

Термин «альдегид» обозначает группу $-C(O)H$.

Термин «карбонат» относится к $-OC(O)OR$, где R представляет собой алкил.

Термин «малеимид» относится к группе с химической формулой $H_2C_2(CO)_2NH$.

- 25 Термин «малеимино» относится к малеимидной группе, ковалентно связанной с другой группой или молекулой. Предпочтительно малеимидная группа является N-связанной, например:



- Термин «ацилгалогенид» относится к $-C(O)X$, где X представляет собой галоген (например, Br, Cl). Примеры ацилгалогенидов включают ацилхлорид ($-C(O)Cl$) и ацилбромид ($-C(O)Br$).
- 30

В соответствии с общепринятыми в данной области правилами:



используется в структурных формулах в настоящем документе для иллюстрации связи, которая является точкой присоединения фрагмента, функциональной группы или заместителя к основе, родительской или каркасной структуре, например антигенсвязывающему домену настоящего изобретения.

Когда любая переменная встречается более одного раза в любом компоненте или формуле соединения, ее определение в каждом случае не зависит от ее определения в каждом другом случае. Таким образом, например, если показано, что группа замещена 0–3 группами R, то указанная группа может быть необязательно замещена максимум тремя группами R и в каждом случае R выбран независимо из определения R.

Если показана связь с заместителем, пересекающая связь, соединяющую два атома в кольце, то такой заместитель может быть связан с любым атомом в кольце.

В контексте данного документа термин «ион радиоактивного металла», или «ион радиометалла», или «радиоактивный изотоп», или «радиометалл» относится к одному или более изотопам элементов, которые испускают частицы и/или фотоны. В изобретении может быть использован любой ион радиоактивного металла, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Не имеющие ограничительного характера примеры радиоизотопов, которые можно использовать для применения в терапевтических целях в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, бета- или альфа-излучатели, такие как, например, ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{32}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{255}Fm и ^{227}Th . Другие не имеющие ограничительного характера примеры радиоизотопов, которые можно использовать в качестве агентов для визуализации в соответствии с настоящим изобретением, включают гамма-излучающие радиоизотопы, такие как, например, ^{177}Lu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr и ^{111}In . В определенных вариантах осуществления ион радиоактивного металла представляет собой «терапевтический излучатель», означающий ион радиоактивного металла, который используют в качестве терапевтического агента, например в качестве цитотоксического агента, способного снижать или ингибировать рост или, в частности, уничтожать раковую клетку, такую как клетка рака предстательной железы. Примеры терапевтических излучателей включают, без ограничений, бета- или альфа-излучатели, такие как ^{132}La , ^{135}La , ^{134}Ce , ^{144}Nd , ^{149}Tb , ^{152}Tb ,

¹⁵⁵Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁹Gd, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁹Er, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²¹¹At, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²⁵⁵Fm и ²²⁷Th, ²²⁶Th, ²³⁰U. Предпочтительно используемый в настоящем изобретении ион радиоактивного металла представляет собой ион альфа-излучающего радиоактивного металла, такой как актиний-225 (²²⁵Ac).

5 Используемый в настоящем документе термин «комплекс радиоактивного металла» относится к комплексу, содержащему ион радиоактивного металла, связанный с хелатором, представляющим собой макроциклическое соединение. Как правило, ион радиоактивного металла связан или скоординирован с макроциклическим соединением посредством координационной связи. Гетероатомы макроциклического
10 кольца могут участвовать в координированном связывании иона радиоактивного металла с макроциклическим соединением. Макроциклическое соединение может быть замещенным одной или более замещающими группами, и одна или более замещающих групп также могут участвовать в координированном связывании иона радиоактивного металла с макроциклическим соединением в качестве дополнения или альтернативы
15 связыванию с гетероатомами макроциклического кольца.

Иммуноконъюгаты

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к композициям и способам нацеливания на hK2 радиоактивного конъюгата на основе Fab с коротким периодом полужизни для достижения эффективной гибели опухолевых клеток у
20 пациентов с раком предстательной железы; предпочтительно такие радиоактивные конъюгаты содержат Fab (вместо полноразмерного антитела) и демонстрируют улучшенный профиль безопасности (например, измеренный по токсичности для костного мозга) по сравнению с полноразмерными радиоактивными конъюгатами на основе антител. Варианты осуществления радиоактивных конъюгатов на основе Fab
25 настоящего изобретения нацеливаются на клетки рака предстательной железы, экспрессирующие hK2, и демонстрируют короткий период полужизни.

Используемый в настоящем документе термин «иммуноконъюгат» относится к антителу или его антигенсвязывающему домену, конъюгированному (например, присоединенному посредством ковалентной связи) ко второй молекуле, такой как
30 токсин, лекарственное средство, ион радиоактивного металла, хелатор, комплекс радиоактивного металла и т. д. «Радиоактивный иммуноконъюгат» (который в настоящем документе может также называться «радиоактивным конъюгатом»), в частности, представляет собой иммуноконъюгат, в котором антитело или

антигенсвязывающий домен помечен радиоактивным металлом или конъюгирован с комплексом радиоактивного металла.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения иммуноконъюгат содержит терапевтический фрагмент, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом настоящего изобретения, который обладает специфичностью связывания с hK2. При использовании в данном документе «терапевтический фрагмент», который образует часть иммуноконъюгата, можно использовать в области терапии и/или визуализации, т. е. в качестве терапевтического агента (например, цитотоксического агента) и/или агента для визуализации соответственно. Например, терапевтические фрагменты настоящего изобретения могут содержать радиоактивные металлы. Следует отметить, что определенные радиоактивные металлы можно использовать в качестве терапевтических агентов (например, ^{225}Ac) и/или в качестве агентов для визуализации (например, ^{111}In). Приемлемым терапевтическим агентом является агент, который способен снижать или ингибировать рост или, в частности, уничтожение раковой клетки, такой как клетка рака предстательной железы. В определенных вариантах осуществления радиоактивные конъюгаты, содержащие радиоизотоп, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, могут доставлять цитотоксическую полезную нагрузку, обладающую способностью испускать альфа- и/или бета-частицы вблизи опухоли путем связывания с поверхностными антигенами на раковых клетках и инициирования гибели клеток.

Согласно определенным вариантам осуществления иммуноконъюгат, содержащий агент для визуализации, такой как Cu-64 , может быть использован для обнаружения клеток рака предстательной железы у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления способ обнаружения наличия рака предстательной железы у субъекта включает введение иммуноконъюгата по настоящему изобретению субъекту, предположительно имеющему рак предстательной железы, и визуализацию биологических структур, с которыми связывается конъюгат (например, с помощью компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом наличия рака предстательной железы. Согласно другому варианту осуществления способ обнаружения прогресса в лечении рака у субъекта (например, после начала субъектом лечения рака предстательной железы) включает введение субъекту иммуноконъюгата по настоящему изобретению и визуализацию биологических структур, с которыми связан иммуноконъюгат (например, с помощью

компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом прогресса в лечении рака предстательной железы у субъекта (например, путем обнаружения, уменьшились ли клетки рака предстательной железы после лечения рака предстательной железы). Согласно варианту осуществления способ может дополнительно включать введение субъекту противоракового терапевтического средства (например, терапевтического антитела к hK2, которое нацелено на раковые клетки, экспрессирующие hK2), если у субъекта был обнаружен рак предстательной железы.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам с коротким периодом полужизни (например, радиоактивным иммуноконъюгатам с коротким периодом полужизни). Используемый в настоящем документе термин «иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни» относится к иммуноконъюгату, содержащему антигенсвязывающий домен (например, Fab), причем иммуноконъюгат имеет период полужизни *in vivo*, который короче, чем период полужизни *in vivo* у сравниваемого иммуноконъюгата, при этом сравниваемый иммуноконъюгат идентичен иммуноконъюгату с коротким периодом полужизни, за исключением того, что антигенсвязывающий домен в сравниваемом иммуноконъюгате заменен на полноразмерное антитело, содержащее антигенсвязывающий домен (например, полноразмерный IgG, содержащий Fc-область и антигенсвязывающий домен). В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни настоящего изобретения имеет период полужизни 36 часов или менее, или 24 часа или менее, или 12 часов или менее, или 6 часов или менее, или 3 часа или менее. Например, иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни настоящего изобретения может иметь период полужизни от около 1 часа до около 36 часов, или от около 1 часа до около 24 часов, или от около 1 часа до около 12 часов, или от около 1 часа до около 6 часов, или от около 1 часа до около 3 часов, или от около 2 часов до около 3 часов.

Актиний-225 (^{225}Ac) представляет собой альфа-излучающий радиоизотоп, представляющий особый интерес для использования в медицине. Другой радиоизотоп, представляющий интерес для применения в медицинских целях, представляет собой лютеций-177 (^{177}Lu), который испускает как гамма-излучение, приемлемое для визуализации, так и бета-излучение средней энергии, приемлемое для лучевой терапии. Не имеющие ограничительного характера примеры радиоизотопов, которые можно использовать для применения в терапевтических целях в соответствии с настоящим

изобретением, включают, например, бета- или альфа-излучатели, такие как, например, ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{32}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{255}Fm и ^{227}Th . Другие не имеющие ограничительного характера примеры

5 радиоизотопов, которые можно использовать в качестве агентов для визуализации в соответствии с настоящим изобретением, включают гамма-излучающие радиоизотопы, такие как, например, ^{177}Lu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr и ^{111}In .

В определенных вариантах осуществления терапевтический фрагмент представляет собой цитотоксический агент, представляющий собой производное ауристатина, такое как MMAE (монометил ауристатин E) или MMAF (монометил ауристатин F). Например, производное ауристатина может быть присоединено к антителу или антигенсвязывающему фрагменту изобретения посредством N (амино) конца или C (карбоксильного) конца функциональной группы пептидного лекарственного средства (WO02/088172) или посредством любого цистеина, искусственно внедренного в антитело или антигенсвязывающий домен.

Антитела к hK2 и антигенсвязывающие домены

Как описано в настоящем документе, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к иммуноконъюгату, содержащему терапевтический фрагмент, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2). Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, F(ab')₂, Fd, dAb или VHH. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, представляет собой Fab.

25 Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 (например, Fab), содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 (например, Fab), содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH с SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL с SEQ ID NO: 163. Например, антигенсвязывающий домен, который

связывает hK2 (например, Fab), содержит VH, которая по меньшей мере на 95% идентична VH с SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL с SEQ ID NO: 163. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 (например, Fab), содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой «Fab KL2B30», также называемый «Fab из KL2B30», который представляет собой Fab, который содержит (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или (b) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 163.

Не имеющие ограничительного характера примеры Fab KL2B30 включают KL2B997 и KL2B1251, которые описаны в приведенном ниже разделе. Последовательности тяжелой и легкой цепей KL2B997 (SEQ ID NO: 472 и SEQ ID NO: 473 соответственно) и KL2B1251 (SEQ ID NO: 474 и SEQ ID NO: 475 соответственно) представлены на ФИГ. 2. KL2B997 имеет His-метку и сортазную метку (подчеркнуты на ФИГ. 2) на тяжелой цепи, а KL2B1251 не имеет метки.

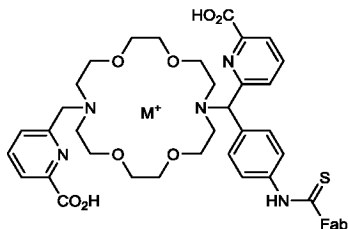
Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит тяжелую цепь, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 474, и легкую цепь, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 475. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, содержащий тяжелую цепь, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 474, и легкую цепь, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 475.

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит тяжелую цепь, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 472, и легкую цепь, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере

мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 473. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, содержащий тяжелую цепь, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 472, и легкую цепь, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 473.

В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгат настоящего изобретения содержит антигенсвязывающий домен, который содержит VL, VH или CDR, имеющие аминокислотные последовательности определенных антител, описанных ниже, выбранных из группы, состоящей из m11B6, hu11B6, HCF3-LCD6, HCG5-LCB7, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, KL2B413, KL2B30, KL2B53, KL2B242, KL2B467 и KL2B494. Вышеупомянутые антитела и антигенсвязывающие домены и способы их получения описаны в PCT/IB2020/056972, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

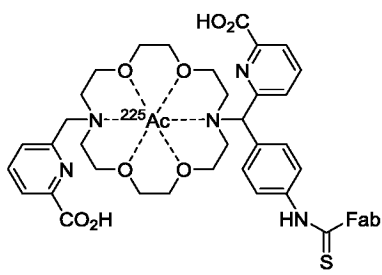
В варианте осуществления настоящего изобретения обеспечен радиоактивный иммуноконъюгат, имеющий следующую структуру (в которой не показан остаток лизина Fab, который связан с функциональной группой фенилтиомочевины):



(также называется TOPA-[C7]-фенилтиомочевина-Fab),

причем M^+ представляет собой радиоизотоп, такой как актиний-225 (^{225}Ac), и при этом Fab обладает специфичностью связывания с hK2, например Fab KL2B30 (например, KL2B997 или KL2B1251). Fab предпочтительно содержит (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или (b) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 163.

В варианте осуществления настоящего изобретения обеспечен радиоактивный иммуноконъюгат, имеющий следующую структуру (в которой не показан остаток лизина Fab, который связан с функциональной группой фенилтиомочевины):



при этом Fab обладает специфичностью связывания с hK2, например Fab KL2B30 (например, KL2B997 или KL2B1251). Fab предпочтительно содержит (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или (b) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 163.

В варианте осуществления настоящего изобретения предложен Fab, конъюгированный с NOTA или производным NOTA, таким как NODA или NODA-GA.

В варианте осуществления настоящего изобретения предложен NODA-GA-Fab, который может быть представлен структурой, изображенной на ФИГ. 4 (на которой не показано ни одной лизиновой цепи Fab, связанной с хелатором-линкером), где M^+ представляет собой радиоизотоп, такой как Cu-64 (^{64}Cu), и где Fab обладает специфичностью связывания с hK2, например Fab KL2B30 (например, KL2B997 или KL2B1251). Fab предпочтительно содержит (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или (b) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 163.

В варианте осуществления настоящего изобретения предложен NODA-GA-Fab, представленный структурой, изображенной на ФИГ. 4 (на которой не показано ни одной лизиновой цепи Fab, связанной с хелатором-линкером), где M^+ представляет собой Cu-64 (^{64}Cu), и где Fab представляет собой Fab KL2B30 (например, KL2B997 или KL2B1251), который содержит (a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или (b) VH, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 163. Способ обнаружения клеток рака предстательной железы, экспрессирующих hK2, у субъекта включает введение Fab NODA-GA-KL2B30 субъекту с подозрением на рак

предстательной железы и визуализацию биологических структур, с которыми связан Fab NODA-GA-KL2B30 (предпочтительно с помощью позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом клеток рака предстательной железы, экспрессирующих hK2.

5 Конкретные пронумерованные варианты осуществления

Пронумерованные примеры вариантов осуществления настоящего изобретения представлены ниже.

1. Иммуноконъюгат, содержащий терапевтический фрагмент, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).
2. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, в котором терапевтический фрагмент представляет собой цитотоксический агент.
3. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, в котором терапевтический фрагмент представляет собой агент для визуализации.
4. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–3, в котором терапевтический фрагмент содержит радиоактивный металл.
5. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 4, в котором радиоактивный металл выбран из группы, состоящей из ^{225}Ac , ^{177}Lu , ^{32}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{255}Fm , ^{227}Th , ^{177}Lu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr и ^{111}In .
6. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, в котором терапевтический фрагмент представляет собой цитотоксический агент, содержащий ^{225}Ac .
7. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, в котором терапевтический фрагмент представляет собой агент для визуализации, содержащий ^{111}In или ^{64}Cu .
8. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 4–7, в котором терапевтический фрагмент содержит комплекс радиоактивного металла, причем комплекс радиоактивного металла содержит радиоактивный металл, связанный с хелатором, и при этом хелатор конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).
9. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту (NOTA), 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA),

3,6,9,15-тетраазабицикло[9.3.1]-пентадека-1(15),11,13-триен-4-(S)-(4-изотиоцианатобензил)-3,6,9-триуксусную кислоту (PCTA), 5-S-(4-аминобензил)-1-окса-4,7,10-триазациклододекан-4,7,10-трис(уксусную кислоту) (DO3A) или их производное.

- 5 10. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором хелатор представляет собой DOTA, или NOTA, или их производное.
11. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором хелатор представляет собой $H_2bp18c6$ или производное $H_2bp18c6$.
- 10 12. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором комплекс радиоактивного металла представляет собой радиоактивный комплекс формулы (I-m), или формулы (II-m), или формулы (III-m), как описано в настоящем документе, где R_{11} содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), а M представляет собой радиоактивный металл.
- 15 13. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (IV-m), или формулы (V-m), или формулы (VI-m), как описано в настоящем документе, где R_4 содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), а M^+ представляет собой радиоактивный металл.
- 20 14. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, в котором терапевтический фрагмент представляет собой производное ауристатина.
15. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 14, в котором терапевтический фрагмент представляет собой MMAE (монометил ауристатин E).
- 25 16. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 14, в котором терапевтический фрагмент представляет собой MMAF (монометил ауристатин F).
17. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–16 или 51–56, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, F(ab')₂, Fd, dAb или VHH.
- 30 18. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–16 или 51–56, в котором антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, представляет собой Fab.
19. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–18 или 51–56, в котором антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,

LCDR2 и Lcdr3 с SEQ ID NO: 170 (SYYWS), SEQ ID NO: 171 (YIYYSGSTNYNPSLKS), SEQ ID NO: 172 (TTIFGVVTPNFYYGMDV), SEQ ID NO: 173 (RASQGISSYLA), SEQ ID NO: 174 (AASTLQS) и SEQ ID NO: 175 (QQLNSYPLT) соответственно.

- 5 20. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–19 или 51–56, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH с SEQ ID NO: 162
- 10 (QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYS GSTNYNPSLKS RVTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNF YYGMDVWGQGTTVTVSS), и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL с SEQ ID NO: 163
- 15 (DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLA WYQQKPGKAPKFLIYAASTL QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK).
21. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–19 или 51–56, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.
- 20 22. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–18 или 51–56, в котором антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, содержащий:
- a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, Lcdr1, Lcdr2 и Lcdr3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или
- b. VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163; и/или
- 25 c. тяжелую цепь, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 474, и легкую цепь, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 475.
23. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1–22 или 51–56, представляющий собой иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни.
- 30 24. Способ лечения рака с экспрессией hK2 у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23 или 51–56.

25. Способ уменьшения количества экспрессирующих hK2 опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23 или 51–56.
- 5 26. Способ лечения рака предстательной железы у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23 или 51–56.
27. Способ по варианту осуществления 26, в котором рак предстательной железы представляет собой рецидивирующий, рефрактерный, злокачественный или
10 устойчивый к кастрации рак предстательной железы или любую их комбинацию.
28. Способ по варианту осуществления 26, в котором рак предстательной железы представляет собой метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы.
29. Способ обнаружения наличия рака предстательной железы у субъекта,
15 включающий введение иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23 или 51–56 субъекту, предположительно имеющему рак предстательной железы, и визуализацию биологических структур, с которыми связывается конъюгат (например, с помощью компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом наличия
20 рака предстательной железы, причем иммуноконъюгат предпочтительно содержит агент для визуализации, такой как ^{111}In или ^{64}Cu .
30. Способ получения иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1–23 или 51–56, включающий: конъюгирование терапевтического фрагмента с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной
25 калликреину пептидазой 2 (hK2).
31. Способ получения радиоактивного иммуноконъюгата, включающий связывание радиоактивного металла с хелатором, который конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).
- 30 32. Способ по варианту осуществления 31, в котором хелатор представляет собой DOTA, или NOTA, или его производное.
33. Способ по варианту осуществления 31, в котором хелатор представляет собой $\text{H}_2\text{bp}18\text{сб}$ или производное $\text{H}_2\text{bp}18\text{сб}$.

34. Способ по варианту осуществления 31, в котором хелатор выбран из группы, состоящей из хелаторов формулы (I), формулы (II) и формулы (III), как описано в настоящем документе, при этом R₁₁ содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).
- 5 35. Способ по варианту осуществления 31, в котором хелатор выбран из группы, состоящей из хелаторов формулы (IV), формулы (V) и формулы (VI), как описано в настоящем документе, причем R₄ содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).
- 10 36. Способ по любому из вариантов осуществления 31–35, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, F(ab')₂, Fd, dAb или VHH.
37. Способ по любому из вариантов осуществления 31–35, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой Fab.
- 15 38. Способ по любому из вариантов осуществления 31–37, в котором антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно.
- 20 39. Способ по любому из вариантов осуществления 31–38, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH с SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL с SEQ ID NO: 163.
- 25 40. Способ по любому из вариантов осуществления 31–38, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.
41. Способ по любому из вариантов осуществления 31–37, в котором антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, содержащий:
- 30 a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или
- b. VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.
42. Радиоактивный иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни, содержащий комплекс радиоактивного металла, в котором комплекс радиоактивного металла содержит ²²⁵Ac, связанный с хелатором, и причем хелатор конъюгирован с Fab,

специфически связывающимся с hK2, при этом указанный Fab содержит: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно.

43. Радиоактивный иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни по варианту осуществления 42, в котором указанный Fab содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.

44. Радиоактивный иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни по варианту осуществления 42 или варианту осуществления 43, в котором хелатор представляет собой DOTA, или NOTA, или его производное.

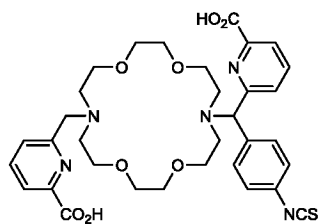
45. Радиоактивный иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни по варианту осуществления 42 или варианту осуществления 43, в котором хелатор представляет собой H₂bp18сб или производное H₂bp18сб.

46. Радиоактивный иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни по варианту осуществления 42 или варианту осуществления 43, в котором комплекс радиоактивного металла выбран из группы, состоящей из хелаторов формулы (I-m), формулы (II-m) и формулы (III-m), как описано в настоящем документе, причем R₁₁ содержит Fab, специфически связывающийся с hK2.

47. Радиоактивный иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни по варианту осуществления 42 или варианту осуществления 43, в котором комплекс радиоактивного металла выбран из группы, состоящей из хелаторов формулы (IV-m), формулы (V-m) и формулы (VI-m), как описано в настоящем документе, причем R₄ содержит Fab, специфически связывающийся с hK2.

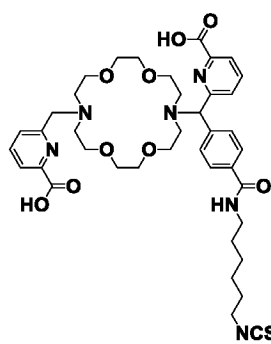
48. Способ по любому из вариантов осуществления 31–37, дополнительно включающий конъюгирование хелатора с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), перед связыванием радиоактивного металла с хелатором.

49. Способ по варианту осуществления 48, в котором хелатор имеет структуру



перед конъюгированием хелатора с антигенсвязывающим доменом.

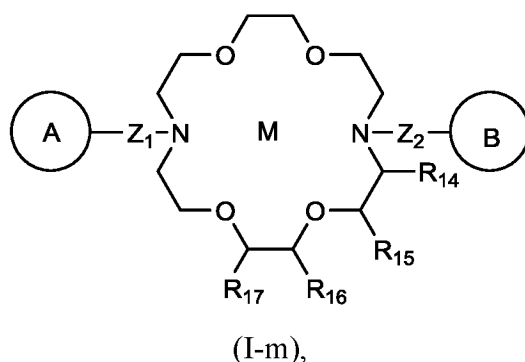
50. Способ по варианту осуществления 48, в котором хелатор имеет структуру



доменом.

51. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (I-m),

причем комплекс радиоактивного металла формулы (I-m) имеет следующую структуру:



10

где:

M представляет собой радиоактивный металл, предпочтительно ион альфа-излучающего радиоактивного металла и более предпочтительно актиний-225 (²²⁵Ac);

15

каждое из кольца A и кольца B независимо представляет собой 6–10-членный арил или 5–10-членный гетероарил, при этом каждое из кольца A и кольца B необязательно замещено одним или более заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, -OR₁₃, -SR₁₃, -(CH₂)_pCOOR₁₃, -OC(O)R₁₃, -N(R₁₃)₂, -CON(R₁₃)₂, -NO₂, -CN -OC(O)N(R₁₃)₂ и X;

20

каждый из Z₁ и Z₂ независимо представляет собой -(C(R₁₂)₂)_m- или -(CH₂)_n-C(R₁₂)(X)-(CH₂)_n-;

каждый X независимо представляет собой -L₁-R₁₁;

каждый n независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый m независимо представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый p независимо представляет собой 0 или 1;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

5 R_{11} содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2);

каждый R_{12} независимо представляет собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероцикл или гетероарил;

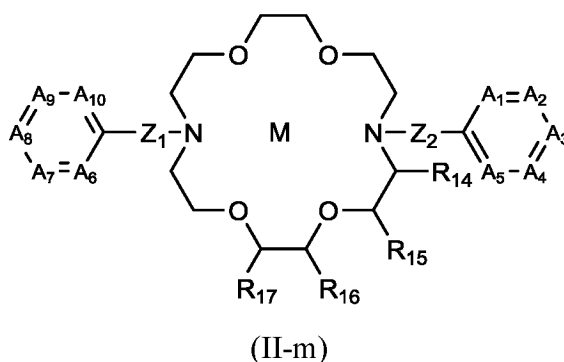
каждый R_{13} независимо представляет собой водород или алкил;

10 каждый из R_{14} , R_{15} , R_{16} и R_{17} независимо представляет собой водород, алкил или X,

или, альтернативно, R_{14} и R_{15} и/или R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо, необязательно замещаемое X; при условии, что комплекс радиоактивного металла содержит по меньшей мере один X, и если X присутствует на кольце A или кольце B, L_1 представляет собой линкер или по меньшей мере один из R_{12} и $R_{14} - R_{17}$ не является водородом.

15 52. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (II-m),

20 причем комплекс радиоактивного металла формулы (II-m) имеет следующую структуру:



25 где:

M представляет собой радиоактивный металл, предпочтительно ион альфа-излучающего радиоактивного металла и более предпочтительно актиний-225 (^{225}Ac);

A_1 представляет собой N или CR_1 или отсутствует;

A_2 представляет собой N или CR_2 ;

A_3 представляет собой N или CR_3 ;

A_4 представляет собой N или CR_4 ;

A_5 представляет собой N или CR_5 ;

5 A_6 представляет собой N или CR_6 или отсутствует;

A_7 представляет собой N или CR_7 ;

A_8 представляет собой N или CR_8 ;

A_9 представляет собой N или CR_9 ;

A_{10} представляет собой N или CR_{10} ;

10 при условии, что не более трех из A_1, A_2, A_3, A_4 и A_5 представляют собой N и не более трех из A_6, A_7, A_8, A_9 и A_{10} представляют собой N;

каждый из $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, $-OR_{13}, -SR_{13}, -(CH_2)_pCOOR_{13},$
15 $-OC(O)R_{13}, -N(R_{13})_2, -CON(R_{13})_2, -NO_2, -CN -OC(O)N(R_{13})_2$ и $-X,$

или, альтернативно, любые два непосредственно смежных $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5,$
 R_6, R_7, R_8, R_9 и R_{10} вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют пяти- или шестичленное замещенное или незамещенное карбоциклическое или азотсодержащее кольцо;

20 каждый из Z_1 и Z_2 независимо представляет собой $-(C(R_{12})_2)_m-$ или $-(CH_2)_n-$
 $C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

каждый X независимо представляет собой $-L_1-R_{11}$;

каждый n независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый m независимо представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5;

25 каждый p независимо представляет собой 0 или 1;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_{11} содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2);

30 каждый R_{12} независимо представляет собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероциклил или гетероарил;

каждый R_{13} независимо представляет собой водород или алкил;

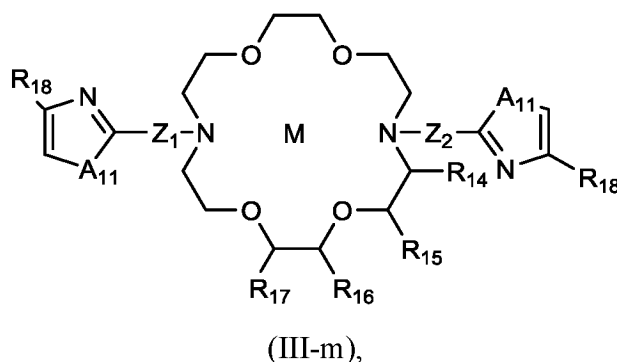
каждый из R_{14}, R_{15}, R_{16} и R_{17} независимо представляет собой водород, алкил или X,

или, альтернативно, R_{14} и R_{15} и/или R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо, необязательно замещаемое X;

5 при условии, что комплекс радиоактивного металла содержит по меньшей мере один X, и если любой из $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} представляет собой X, то L_1 представляет собой линкер или по меньшей мере один из R_{12} и R_{14} – R_{17} не является водородом.

53. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (III-m),

10 причем комплекс радиоактивного металла формулы (III-m) имеет следующую структуру:



15 где:

M представляет собой радиоактивный металл, предпочтительно ион альфа-излучающего радиоактивного металла и более предпочтительно актиний-225 (^{225}Ac);

каждый A_{11} независимо представляет собой O, S, NMe или NH;

20 каждый из Z_1 и Z_2 независимо представляет собой $-(C(R_{12})_2)_m-$ или $-(CH_2)_n-$ $C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

каждый X независимо представляет собой $-L_1-R_{11}$;

каждый n независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый m независимо представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5;

25 каждый p независимо представляет собой 0 или 1;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_{11} содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2);

каждый R_{12} независимо представляет собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероциклил или гетероарил;

каждый R_{13} независимо представляет собой водород или алкил;

каждый из R_{14} , R_{15} , R_{16} и R_{17} независимо представляет собой водород, алкил или X,

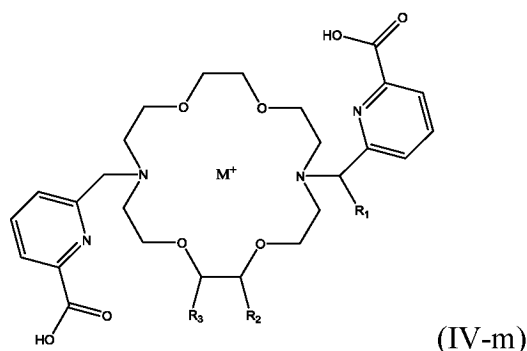
или, альтернативно, R_{14} и R_{15} и/или R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо, необязательно замещаемое X; и

каждый R_{18} независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, $-CN$, $-OC(O)N(R_{13})_2$ и $-X$,

при условии, что комплекс радиоактивного металла содержит по меньшей мере один X, и если R_{18} представляет собой X, то L_1 представляет собой линкер или по меньшей мере один из R_{12} и $R_{14}-R_{17}$ не является водородом.

54. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, причем комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (IV-m),

при этом комплекс радиоактивного металла формулы (IV-m) имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

M^+ представляет собой радиоактивный металл, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), висмута-213 (^{213}Bi), свинца-212 ($^{212}Pb(II)$ и/или $^{212}Pb(IV)$), тербия-149 (^{149}Tb), тербия-152 (^{152}Tb), тербия-155 (^{155}Tb), фермия-255 (^{255}Fm), тория-227 (^{227}Th), тория-226 ($^{226}Th^{4+}$), астата-211 (^{211}At), церия-134 (^{134}Ce), неодима-144 (^{144}Nd), лантана-132 (^{132}La), лантана-135 (^{135}La) и урана-230 (^{230}U);

R_1 представляет собой водород, а R_2 представляет собой $-L_1-R_4$;
альтернативно R_1 представляет собой $-L_1-R_4$, а R_2 представляет собой водород;

R_3 представляет собой водород;

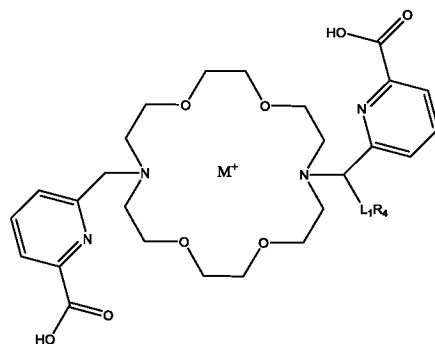
5 альтернативно R_2 и R_3 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членный циклоалкил, при этом 5- или 6-членный циклоалкил необязательно замещен $-L_1-R_4$;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

10 R_4 содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

55. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (V-m),

15 причем комплекс радиоактивного металла формулы (V-m) имеет следующую структуру:



(V-m)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

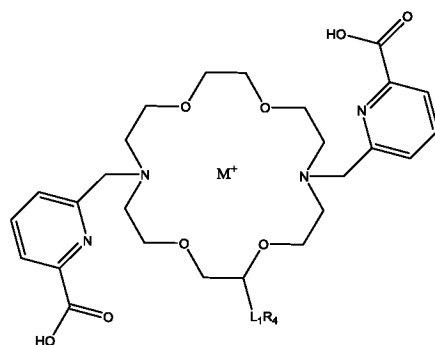
20 M^+ представляет собой радиоактивный металл, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), висмута-213 (^{213}Bi), свинца-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербия-149 (^{149}Tb), тербия-152 (^{152}Tb), тербия-155 (^{155}Tb), фермия-255 (^{255}Fm), тория-227 (^{227}Th), тория-226 ($^{226}\text{Th}^{4+}$), астата-211 (^{211}At), церия-134 (^{134}Ce), неодима-144 (^{144}Nd), лантана-132 (^{132}La), лантана-135 (^{135}La) и урана-230 (^{230}U);

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_4 содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

56. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 8, в котором комплекс радиоактивного металла представляет собой комплекс радиоактивного металла формулы (VI-m),

5 причём комплекс радиоактивного металла формулы (VI-m) имеет следующую структуру:



(VI-m)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

10 M^+ представляет собой радиоактивный металл, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), висмута-213 (^{213}Bi), свинца-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербия-149 (^{149}Tb), тербия-152 (^{152}Tb), тербия-155 (^{155}Tb), фермия-255 (^{255}Fm), тория-227 (^{227}Th), тория-226 ($^{226}\text{Th}^{4+}$), астата-211 (^{211}At), церия-134 (^{134}Ce), неодима-144 (^{144}Nd), лантана-132 (^{132}La), лантана-135 (^{135}La) и урана-230 (^{230}U);

15 L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и

R_4 содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

20 57. Иммуноконъюгат, содержащий: комплекс радиоактивного металла, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причём комплекс радиоактивного металла содержит ^{64}Cu , связанный с хелатором, и при этом хелатор конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

25 58. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 57, в котором хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту (NOTA), 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA), 3,6,9,15-тетраазабицикло[9.3.1]-пентадека-1(15),11,13-триен-4-(S)-(4-изотиоцианатобензил)-

3,6,9-триуксусную кислоту (PCTA), 5-S-(4-аминобензил)-1-окса-4,7,10-триазациклододекан-4,7,10-трис(уксусную кислоту) (DO3A) или их производное.

59. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 57, в котором хелатор представляет собой NOTA или его производное, такое как NODA-GA, NODA-GA(tButyl)₃, ди-трет-бутил-NOTA, NOTA-тиосемикарбазид, NODA-MPAА или NODA-MPAEM, предпочтительно NODA-GA.
60. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 57–59, в котором антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, представляет собой Fab.
- 10 61. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 57–60, в котором антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170 (SYYWS), SEQ ID NO: 171 (YIYYSGSTNYPNPSLKS), SEQ ID NO: 172 (TTIFGVVTPNFYYGMDV), SEQ ID NO: 173 (RASQGISSYLA), SEQ ID NO: 174 (AASTLQS) и SEQ ID NO: 175 (QQLNSYPLT) соответственно.
- 15 62. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 57–61, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH с SEQ ID NO: 162
- 20 (QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKS RVTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS), и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL с SEQ ID NO: 163
- 25 (DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLA WYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK).
63. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 57–62, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.
- 30 64. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 57–60, в котором антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, содержащий:
- HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или
 - VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.

65. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 57–64, который представляет собой иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни.

66. Иммуноконъюгат, содержащий комплекс радиоактивного металла, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем:

комплекс радиоактивного металла содержит ^{64}Cu , связанную с хелатором, который представляет собой NOTA или его производное, такое как NODA-GA, NODA-GA(tButyl)₃, ди-трет-бутил-NOTA, NOTA-тиосемикарбазид, NODA-МРАА или NODA-МРАЕМ, предпочтительно NODA-GA,

при этом хелатор конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), и

при этом антигенсвязывающий домен содержит:

(a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170 (SYYWS), SEQ ID NO: 171 (YIYYSGSTNYPNPSLKS), SEQ ID NO: 172 (TTIFGVVTPNFYYGMDV), SEQ ID NO: 173 (RASQGISSYLA), SEQ ID NO: 174 (AASTLQS) и SEQ ID NO: 175 (QQLNSYPLT) соответственно; и/или

(b) VH, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH с SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL с SEQ ID NO: 163.

67. Способ обнаружения наличия рака предстательной железы у субъекта, включающий введение иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 57–66 субъекту, предположительно имеющему рак предстательной железы, и визуализацию биологических структур, с которыми связывается конъюгат (например, с помощью компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом наличия рака предстательной железы.

68. Способ обнаружения прогресса лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 57–66 и визуализацию биологических структур, с которыми связывается иммуноконъюгат (например, с помощью компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом прогресса лечения рака предстательной железы у субъекта.

69. Способ по варианту осуществления 67 или варианту осуществления 68, включающий использование позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для визуализации биологических структур, с которыми связывается конъюгат.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 67–69, дополнительно включающий введение субъекту противоракового терапевтического средства (например, терапевтического антитела к hK2), если у субъекта был обнаружен рак предстательной железы.
- 5 71. Применение иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 57–66 для диагностики рака предстательной железы у субъекта.
72. Применение иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 57–66 для визуализации рака предстательной железы у пациента.
73. Применение иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 57–66 для
10 определения стадии рака предстательной железы у субъекта.

Хелаторы

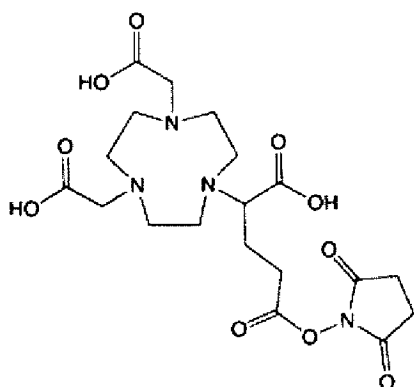
В соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к иммуноконъюгатам, таким как радиоактивные
15 иммуноконъюгаты, содержащие хелатор, предпочтительно хелатор, с которым можно хелатировать радиоактивные металлы посредством координационной связи. В соответствии с конкретными вариантами осуществления хелаторами изобретения называются хелаторы, с которыми можно связать металл, предпочтительно радиоактивный металл, с образованием комплекса радиоактивного металла.

20 Предпочтительно хелатор представляет собой макроциклическое соединение. В определенных вариантах осуществления хелатор содержит макроцикл или макроциклическое кольцо, содержащее один или более гетероатомов, например кислород и/или азот в качестве атомов в кольце.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления хелатор содержит
25 макроциклический хелатирующий фрагмент. Примеры макроциклических хелатирующих фрагментов включают, без ограничений, 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), S-2-(4-изотиоцианатбензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту (NOTA), 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA), 3,6,9,15-тетраазабицикло[9.3.1]-пентадека-
30 1(15),11,13-триен-4-(S)-(4-изотиоцианатбензил)-3,6,9-триуксусную кислоту (PCTA), 5-S-(4-аминобензил)-1-окса-4,7,10-триазациклододекан-4,7,10-трис(уксусную кислоту) (DO3A) или их производное. В некоторых аспектах хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA). В других аспектах хелатор представляет собой S-2-(4-изотиоцианатбензил)-1,4,7-

триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту (NOTA). В дополнительных аспектах хелатор представляет собой 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA). В прочих аспектах хелатор представляет собой 3,6,9,15-тетраазабицикло[9.3.1]-пентадека-1(15),11,13-триен-4-(S)-(4-изотиоцианатбензил)-3,6,9-триуксусную кислоту (PCTA). В других дополнительных аспектах хелатор представляет собой 5-S-(4-аминобензил)-1-окса-4,7,10-триазациклододекан-4,7,10-трис(уксусную кислоту) (DO3A). В других аспектах хелатор представляет собой DOTA, DFO, DTPA, NOTA или TETA.

В определенных вариантах осуществления хелатор содержит NOTA или его производное. Неограничивающие примеры производных NOTA включают NODA, NODA-GA, NODA-GA(tButyl)₃, ди-трет-бутил-NOTA, NOTA-тиосемикарбазид, NODA-MPAA и NODA-MPAEM. В одном варианте осуществления конъюгируемый вариант хелатор-линкер может называться NODA-GA-NHS или 2,2',2''-(1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триил)диуксусная кислота-глутаминовая кислота, как проиллюстрировано ниже:

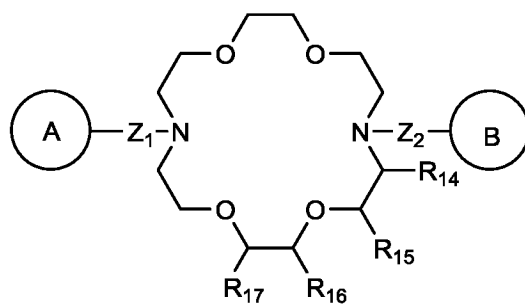


В определенных вариантах осуществления хелатор содержит макроцикл, являющийся производным 4,13-диаза-18-крауна-6. 4,13-Диаза-18-краун-6 можно получать различными способами (см., например, Gatto et al., *Org. Synth.* 1990, 68, 227; DOI: 10.15227/orgsyn.068.0227). В соответствии с дополнительными вариантами осуществления настоящего изобретения хелатор представляет собой H₂bp18сб или производное H₂bp18сб, например описанные в WO2020/229974. H₂bp18сб означает N,N'-бис[(6-карбоксо-2-пиридил)метил]-4,13-диаза-18-краун-6, как описано в данном документе. H₂bp18сб или производное H₂bp18сб также описаны, например, в Thiele et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2017) 56, 14712–14717, и Roca-Sabio et al. “Macrocyclic Receptor Exhibiting Unprecedented Selectivity for Light Lanthanides” *J. Am. Chem. Soc.* (2009) 131,

3331–3341, включенные в настоящий документ путем ссылки. Дополнительные хелаторы, приемлемые для применения в соответствии с настоящим изобретением, описаны в WO2018/183906 и WO2020/106886, которые включены в настоящий документ путем ссылки. Используемый в настоящем документе термин ТОРА
 5 относится к макроциклу, известному в данной области как H2bp18сб, и может альтернативно называться N,N'-бис[(6-карбокси-2-пиридил)метил]-4,13-диаза-18-краун-6 (см., например, Roca-Sabio et al.).

ХЕЛАТОРЫ ФОРМУЛ (I), (II) и (III)

10 Дополнительные хелаторы, приемлемые для применения в соответствии с настоящим изобретением, описаны в WO2020/229974, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно конкретным вариантам осуществления, например, как описано в WO2020/229974, хелатор имеет структуру формулы (I):



(I)

15 где:

каждое из кольца А и кольца В независимо представляет собой 6–10-членный арил или 5–10-членный гетероарил, при этом каждое из кольца А и кольца В необязательно замещено одним или более заместителями, независимо
 20 выбранными из группы, состоящей из галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, –OR13, –SR13, –(CH2)_pCOOR13, –OC(O)R13, –N(R13)₂, –CON(R13)₂, –NO₂, –CN –OC(O)N(R13)₂ и X;

каждый из Z₁ и Z₂ независимо представляет собой –(C(R₁₂)₂)_m– или –(CH₂)_n–
 25 C(R₁₂)(X)–(CH₂)_n–;

каждый X независимо представляет собой –L₁–R₁₁;

каждый n независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый m независимо представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5;

каждый p независимо представляет собой 0 или 1;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_{11} представляет собой нуклеофильный фрагмент или электрофильный фрагмент или R_{11} содержит антигенсвязывающий домен;

каждый R_{12} независимо представляет собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероцикл или гетероарил;

каждый R_{13} независимо представляет собой водород или алкил;

каждый из R_{14} , R_{15} , R_{16} и R_{17} независимо представляет собой водород, алкил или X,

или, альтернативно, R_{14} и R_{15} и/или R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо, необязательно замещаемое X;

при условии, что хелатор содержит по меньшей мере один X, и если X присутствует на кольце А или кольце В, L_1 представляет собой линкер или по меньшей мере один из R_{12} , а R_{14} – R_{17} не является водородом.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения хелатор содержит по меньшей мере одну группу X, причем X представляет собой $-L_1-R_{11}$, где L_1 отсутствует или представляет собой линкер, а R_{11} представляет собой электрофильный фрагмент или нуклеофильный фрагмент, или R_{11} содержит антигенсвязывающий домен. Когда R_{11} представляет собой нуклеофильный или электрофильный фрагмент, такой фрагмент можно использовать для присоединения хелатора к антигенсвязывающему домену, непосредственно или опосредованно при помощи линкера. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления R_{11} содержит антитело или антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, например Fab из KL2B30.

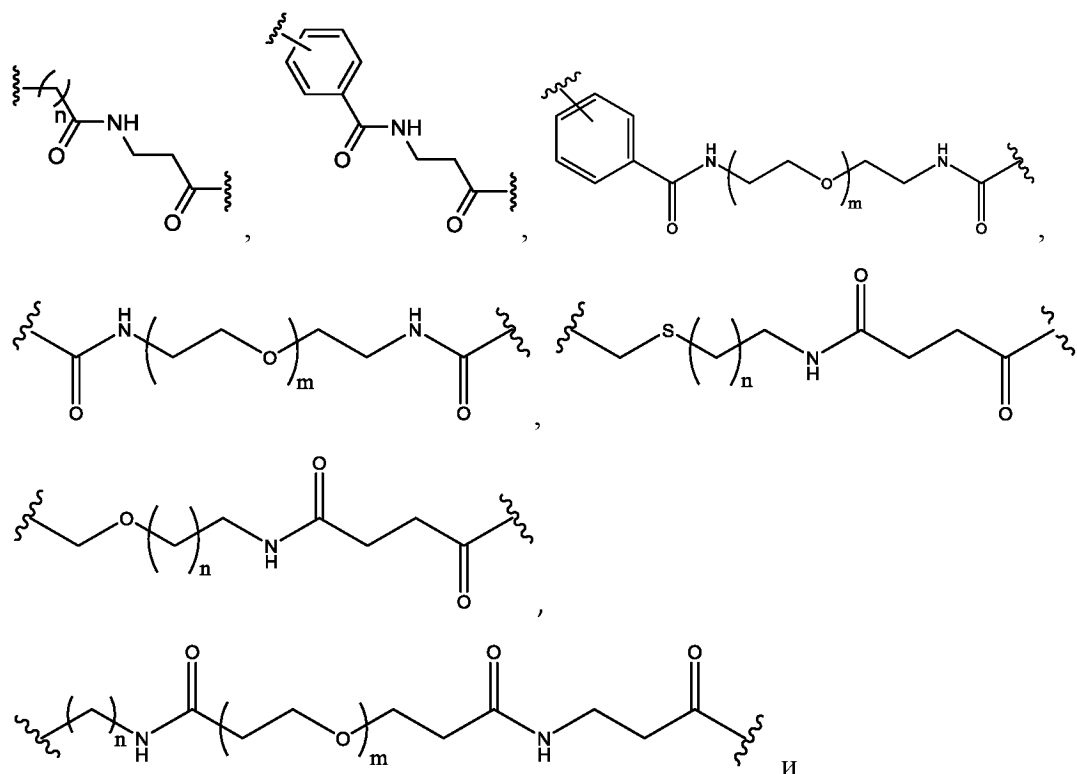
В определенных вариантах осуществления хелатор содержит одну группу X, и предпочтительно L_1 из группы X представляет собой линкер.

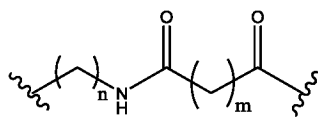
Хелатор изобретения может быть замещен X на любом из атомов углерода макроциклического кольца, в положении Z_1 или Z_2 , или на кольце А или кольце В, при условии, что когда кольцо или кольцо В содержат группу X, L_1 представляет собой линкер или по меньшей мере один из R_{12} , а R_{14} – R_{17} не является водородом (т. е., по меньшей мере один из атомов углерода Z_1 , Z_2 , и/или атомы углерода макроциклического кольца замещены, например, алкильной группой, такой как метил или этил). Предпочтительно замена в таких положениях не влияет на эффективность хелатирования для ионов радиоактивных металлов, в частности

²²⁵As, а в некоторых вариантах осуществления замены могут повышать эффективность хелатирования.

В некоторых вариантах осуществления L_1 отсутствует. Если L_1 отсутствует, R_{11} непосредственно связан (например, посредством ковалентной связи) с хелатором.

В некоторых вариантах осуществления L_1 представляет собой линкер. Используемый в настоящем документе термин «линкер» относится к химическому фрагменту, который соединяет хелатор с нуклеофильным фрагментом, электрофильным фрагментом или антигенсвязывающим доменом. В изобретении может быть использован любой приемлемый линкер, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Линкеры могут содержать, например, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкильный фрагмент, замещенный или незамещенный арил или гетероарил, полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер, пептидный линкер, линкер на основе сахара или расщепляемый линкер, такой как дисульфидная связь или сайт расщепления протеазой, такой как валин-цитруллин-р-аминобензил (РАВ). Примеры линкерных структур, приемлемых для применения в изобретении, включают, без ограничений:





, где n представляет собой целое число от 0 до 10, предпочтительно целое число от 1 до 4; и m представляет собой целое число от 0 до 12, предпочтительно целое число от 0 до 6.

В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой нуклеофильный фрагмент или электрофильный фрагмент. Термин «нуклеофильный фрагмент» или «нуклеофильная группа» относится к функциональной группе, которая предоставляет пару электронов для образования ковалентной связи в химической реакции.

«Электрофильный фрагмент» или «электрофильная группа» относится к функциональной группе, которая принимает пару электронов для образования ковалентной связи в химической реакции. Нуклеофильные группы вступают в реакцию с электрофильными группами и, *наоборот*, в химические реакции с образованием новых ковалентных связей. Реакция нуклеофильной группы или электрофильной группы хелатора изобретения с антигенсвязывающим фрагментом или другим химическим фрагментом (например, линкером), содержащими соответствующий партнер по реакции, обеспечивает ковалентную связь антигенсвязывающего фрагмента или химического фрагмента с хелатором изобретения.

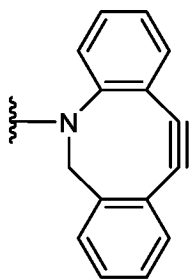
Примеры нуклеофильных групп включают, без ограничений, азиды, амины и тиолы. Примеры электрофильных групп включают, без ограничений, реакционноспособные с амином группы, способные к реакции с тиолом группы, алкинилы и циклоалкинилы. Реакционноспособная с амином группа предпочтительно реагирует с первичными аминами, включая первичные амины, которые существуют на N-конце каждой полипептидной цепи и в боковой цепи остатков лизина. Примеры реакционноспособных с амином групп, приемлемых для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, N-гидроксисукцинимид (NHS), замещенный NHS (такой как сульфо-NHS), изотиоцианат ($-NCS$), изоцианат ($-NCO$), эфиры, карбоксильную кислоту, ацилгалогениды, амиды, алкиламиды и тетра- и перфторфениловый эфир. Способная к реакции с тиолом группа реагирует с тиолами или сульфгидрилами, предпочтительно тиолами, присутствующими в боковой цепи цистеиновых остатков полипептидов. Примеры способных к реакции с тиолом групп, приемлемых для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, акцепторы Мишеля (например, малеимид), галоацетил, ацилгалогениды, активированные дисульфиды и фенилоксадиазолсульфон.

В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой $-NH_2$, $-NCS$ (изотиоцианат), $-NCO$ (изоцианат), $-N_3$ (азидо), алкинил, циклоалкинил, карбоновую кислоту, эфир, амидо, алкиламид, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, более конкретно, $-NCS$, $-NCO$, $-N_3$, алкинил, циклоалкинил, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеимида, ацилгалогенид (например, $-C(O)Cl$, $-C(O)Br$), тетразин или транс-циклооктен, причем каждый R_{13} независимо представляет собой водород или алкил.

В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой алкинильную, циклоалкинильную или азидную группу, благодаря чему возможно присоединить хелатор к антигенсвязывающему домену или другому химическому фрагменту (например, линкеру) с помощью клик-реакции. В таких вариантах осуществления клик-реакция, которая может быть проведена, представляет собой циклоприсоединение по Хьюсгену или 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом ($-N_3$) и алкинильной или циклоалкинильной группой с образованием 1,2,4-триазольного линкера или фрагмента. В одном варианте осуществления хелатор содержит алкинильную или циклоалкинильную группу, а антигенсвязывающий домен или другой химический фрагмент содержит азидную группу. В другом варианте осуществления хелатор содержит азидную группу, а антигенсвязывающий домен или другой химический фрагмент содержит алкинильную или циклоалкинильную группу.

В определенных вариантах осуществления R_{11} представляет собой алкинильную группу, более предпочтительно концевую алкинильную группу или циклоалкинильную группу, которая взаимодействует с азидной группой, в частности посредством промотируемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC). Примеры циклоалкинильных групп, которые могут реагировать с азидными группами посредством SPAAC, включают в себя, без ограничений, циклооктинил или бициклононинил (BCN), двухфтористый циклооктинил (DIFO), дибензоциклооктинил (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинонил (BARAC), дибензоазациклооктинил (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктинил (DIMAC), дифторбензоциклооктинил (DIFBO), монобензоциклооктинил (MOBO) и тетраметокси-дибензоциклооктинил (TMDIBO).

В конкретном варианте осуществления R_{11} представляет собой дибензоазациклооктинил (DIBAC, DBCO, ADIBO), который имеет следующую структуру:



. В таких вариантах осуществления, в которых R_{11} представляет собой DBCO, DBCO может быть ковалентно связан с хелатором непосредственно или опосредованно посредством линкера и предпочтительно присоединен к хелатору опосредованно посредством линкера.

5 В некоторых вариантах осуществления R_{11} содержит антигенсвязывающий домен. Антигенсвязывающий домен может быть связан с хелатором напрямую посредством ковалентной связи или опосредованно посредством линкера. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В соответствии с предпочтительными
10 вариантами осуществления R_{11} содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, например Fab из KL2B30.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения каждое из кольца А и кольца В независимо представляет собой 6–10-членный арил или 5–10-членный гетероарил. В альтернативных вариантах осуществления предполагается, что каждое из
15 кольца А и кольца В представляют собой необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, такое как оксазолин. Каждое из кольца А и кольца В может быть необязательно и независимо замещено одной или более группами заместителей, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$,
20 $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, $-CN$ $-OC(O)N(R_{13})_2$ и X. Примеры 6–10-членных арильных групп, приемлемых для этой цели, включают в себя, без ограничений, фенил и нафтил. Примеры 5–10-членных гетероарильных групп, приемлемых для этой цели, включают в себя, без ограничений, пиридинил, тиазолил, изотиазолил, оксазолил, изоксазолил и имидазолил. Примеры приемлемых
25 заместителей 5–10-членной гетероарильной и 6–10-членной арильной групп включают, без ограничений, $-COOH$, тетразолил и $-CH_2COOH$. В предпочтительных вариантах осуществления группа заместителя представляет собой $-COOH$ или тетразолил, который представляет собой изостерин $-COOH$.

В определенных вариантах осуществления каждое из кольца А и кольца В независимо и необязательно замещены одной или более карбоксильными группами, включая, без ограничений, $-\text{COOH}$ и $-\text{CH}_2\text{COOH}$.

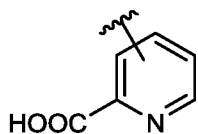
5 В определенных вариантах осуществления каждое из кольца А и кольца В независимо и необязательно замещены тетразолилом.

В одном варианте осуществления кольцо А и кольцо В одинаковы, например, кольцо А и кольцо В представляют собой пиридинил. В другом варианте осуществления кольцо А и кольцо В отличаются друг от друга, например, кольцо А или

10 кольцо В представляет собой пиридинил, а другое кольцо представляет собой фенил.

В конкретном варианте осуществления оба из кольца А и кольца В представляют собой пиридинил, замещенный $-\text{COOH}$.

15 В другом конкретном варианте осуществления оба из кольца А и кольца В представляют собой группы пиколиновой кислоты, имеющие следующую структуру:



20 В соответствии с вариантами осуществления изобретения каждый из Z_1 и Z_2 независимо представляет собой $-(\text{C}(\text{R}_{12})_2)_m-$ или $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{R}_{12})(\text{X})-(\text{CH}_2)_n-$; каждый X независимо представляет собой $-\text{L}_1-\text{R}_{11}$; каждый R_{12} независимо представляет собой водород, алкил, циклоалкил, арил, гетероциклил или гетероарил; каждый n независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5; каждый m равен 1, 2, 3, 4 или 5;

В некоторых вариантах осуществления каждый R_{12} независимо представляет собой водород или алкил, более предпочтительно водород, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_3$.

В некоторых вариантах осуществления R_{12} представляет собой водород.

25 В некоторых вариантах осуществления как Z_1 , так и Z_2 представляют собой $-(\text{CH}_2)_m-$, где каждый m предпочтительно равен 1. В таких вариантах осуществления атом углерода макроциклического кольца, кольца А или кольца В замещен группой X.

В некоторых вариантах осуществления один из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{R}_{12})(\text{X})-(\text{CH}_2)_n-$, а другой представляет собой $-(\text{CH}_2)_m-$.

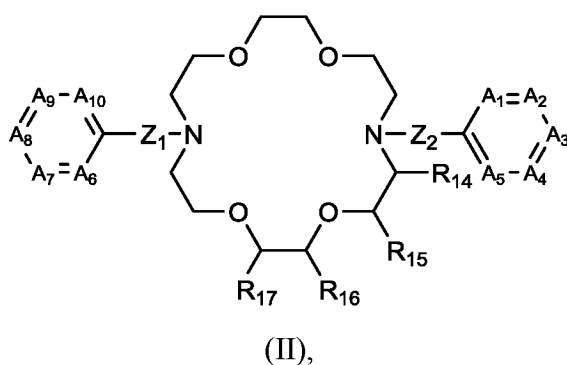
30 В некоторых вариантах осуществления один из Z_1 и Z_2 $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{R}_{12})(\text{X})-(\text{CH}_2)_n-$, а другой представляет собой $-(\text{CH}_2)_m-$; каждый n равен 0; m равен 1; X представляет собой $-\text{L}_1-\text{R}_{11}$; а L_1 представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления как Z_1 , так и Z_2 представляют собой $-(CH_2)_m-$; каждый m независимо составляет 0, 1, 2, 3, 4 или 5, предпочтительно каждый m составляет 1; и один из R_{14} , R_{15} , R_{16} и R_{17} представляет собой X, а каждый из остальных R_{14} , R_{15} , R_{16} и R_{17} представляет собой водород.

5 В некоторых вариантах осуществления R_{14} и R_{15} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо (т. е., циклопентил или циклогексил). Такое 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо может быть замещено группой X.

10 В некоторых вариантах осуществления R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо (т. е., циклопентил или циклогексил). Такое 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо может быть замещено группой X.

В определенных вариантах осуществления хелатор имеет структуру формулы (II):



где:

A_1 представляет собой N или CR_1 или отсутствует;

A_2 представляет собой N или CR_2 ;

20 A_3 представляет собой N или CR_3 ;

A_4 представляет собой N или CR_4 ;

A_5 представляет собой N или CR_5 ;

A_6 представляет собой N или CR_6 или отсутствует;

A_7 представляет собой N или CR_7 ;

25 A_8 представляет собой N или CR_8 ;

A_9 представляет собой N или CR_9 ;

A_{10} представляет собой N или CR_{10} ;

при условии, что не более трех из A_1 , A_2 , A_3 , A_4 и A_5 представляют собой N и не более трех из A_6 , A_7 , A_8 , A_9 и A_{10} представляют собой N;

каждый из $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, $-OR_{13}, -SR_{13}, -(CH_2)_pCOOR_{13}, -OC(O)R_{13}, -N(R_{13})_2, -CON(R_{13})_2, -NO_2, -CN, -OC(O)N(R_{13})_2$ и $-X$,

5 или, альтернативно, любые два непосредственно смежных $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют пяти- или шестичленное замещенное или незамещенное карбоциклическое или азотсодержащее кольцо;

10 а $Z_1, Z_2, X, N, M, P, L_1$ и $R_{11}-R_{17}$ соответствуют описанному выше для формулы (I),

при условии, что хелатор содержит по меньшей мере один X , и если любой из $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} представляет собой X , то L_1 представляет собой линкер или по меньшей мере один из R_{12} и $R_{14}-R_{17}$ не является водородом.

15 В некоторых вариантах осуществления любые два непосредственно смежных $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют пяти- или шестичленное замещенное или незамещенное карбоциклическое или азотсодержащее кольцо. Примеры таких карбоциклических колец, которые могут быть образованы, включают, без ограничений, нафтил. Примеры таких азотсодержащих колец, которые могут быть образованы, включают, без ограничений, хинолинил. Карбоциклические или азотсодержащие кольца могут быть 20 незамещенными или замещенными одним или более приемлемыми заместителями, например, $-COOH, -CH_2COOH$, тетразолилом и т. д.

В некоторых вариантах осуществления L_1 отсутствует. Если L_1 отсутствует, R_{11} непосредственно связан (например, посредством ковалентной связи) с хелатором.

25 В некоторых вариантах осуществления L_1 представляет собой линкер. В изобретении может быть использован любой приемлемый линкер, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как описано выше.

30 В некоторых вариантах осуществления один из A_1, A_2, A_3, A_4 и A_5 представляет собой азот, один из A_1, A_2, A_3, A_4 и A_5 представляет собой углерод, замещенный $-COOH$, а остальные представляют собой CH , т. е. образуют пиридицильное кольцо, замещенное карбоновой кислотой.

В некоторых вариантах осуществления один из A_6, A_7, A_8, A_9 и A_{10} представляет собой азот, один из A_6, A_7, A_8, A_9 и A_{10} представляет собой углерод, замещенный

-COOH, а остальные представляют собой СН, т. е. образуют пиридиноподобное кольцо, замещенное карбоновой кислотой.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R₁, R₂, R₃, R₄ и R₅ представляет собой -COOH. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R₆, R₇, R₈, R₉ и R₁₀ представляет собой -COOH. В другом варианте осуществления по меньшей мере один из R₁, R₂, R₃, R₄ и R₅ представляет собой -COOH; и по меньшей мере один из R₆, R₇, R₈, R₉ и R₁₀ представляет собой -COOH.

В некоторых вариантах осуществления каждый из A₁ и A₁₀ представляет собой азот; A₂ представляет собой CR₂, а R₂ представляет собой -COOH;

A₉ представляет собой CR₉, а R₉ представляет собой -COOH; каждый из A₃-A₈ представляет собой CR₂, CR₃, CR₄, CR₅, CR₆, CR₇ и CR₈, соответственно; а каждый из R₃-R₈ представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления один из A₁, A₂, A₃, A₄ и A₅ представляет собой азот, один из A₁, A₂, A₃, A₄ и A₅ представляет собой углерод, замещенный тетразолилом, а остальные представляют собой СН.

В некоторых вариантах осуществления один из A₆, A₇, A₈, A₉ и A₁₀ представляет собой азот, один из A₆, A₇, A₈, A₉ и A₁₀ представляет собой углерод, замещенный тетразолилом, а остальные представляют собой СН.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R₁, R₂, R₃, R₄ и R₅ представляет собой тетразолил. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R₆, R₇, R₈, R₉ и R₁₀ представляет собой тетразолил. В другом варианте осуществления по меньшей мере один из R₁, R₂, R₃, R₄ и R₅ представляет собой тетразолил; и по меньшей мере один из R₆, R₇, R₈, R₉ и R₁₀ представляет собой тетразолил.

В некоторых вариантах осуществления R₁₂ представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления R₁₁ представляет собой алкильную группу или циклоалкильную группу, предпочтительно циклооктинил или циклооктильное производное, например, DBCO.

В некоторых вариантах осуществления хелатора формулы (II):

каждый из A₁ и A₁₀ представляет собой азот;

A₂ представляет собой CR₂, а R₂ представляет собой -COOH;

A₉ представляет собой CR₉, а R₉ представляет собой -COOH;

каждый из A₃-A₈ представляет собой CR₂, CR₃, CR₄, CR₅, CR₆, CR₇ и CR₈, соответственно;

каждый из R_3 – R_8 представляет собой водород;

один из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(CH_2)_m-$, а другой из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

R_{12} представляет собой водород;

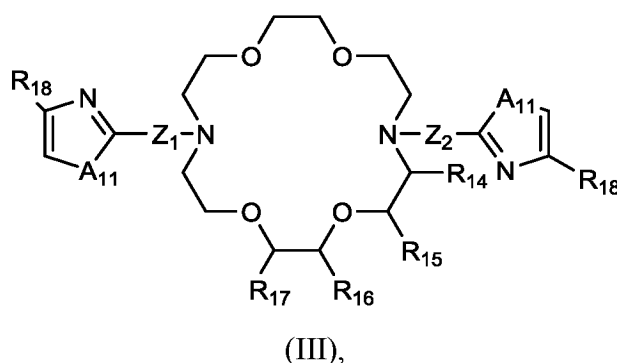
5 m равен 1;

каждый n равен 0;

X представляет собой $-L_1-R_{11}$, в котором L_1 представляет собой линкер, а $-R_{11}$ представляет собой электрофильную группу, например, циклооктинил или циклооктильное производное, такое как DBCO; и

10 каждый из R_{14} – R_{17} представляет собой водород, или в альтернативном варианте осуществления R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо.

В определенных вариантах осуществления хелатор имеет структуру формулы (III):



15

где:

каждый A_{11} независимо представляет собой O, S, NMe или NH;

20

каждый R_{18} независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-COOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, $-CN$, $-OC(O)N(R_{13})_2$ и $-X$,

и Z_1 , Z_2 , X , N , M , L_1 , R_{11} – R_{17} соответствуют описанию, приведенному выше для формулы (I),

25

при условии, что хелатор содержит по меньшей мере один X , и если R_{18} представляет собой X , то L_1 представляет собой линкер или по меньшей мере один из R_{12} , а R_{14} – R_{17} не являются водородом.

В некоторых вариантах осуществления каждый A_{11} представляет собой одно и то же, а каждый A_{11} представляет собой O, S, NMe или NH. Например, каждый A_{11} может

представлять собой S. В других вариантах осуществления каждый A_{11} отличается и каждый независимо выбран из O, S, NMe и NH.

В некоторых вариантах осуществления каждый R_{18} независимо представляет собой $-(CH_2)_p-COOR_{13}$ или тетразолил, причем R_{13} представляет собой водород, а
5 каждый p независимо равен 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления, каждый R_{18} представляет собой $-COOH$;

В некоторых вариантах осуществления каждый R_{18} представляет собой $-CH_2COOH$.

В некоторых вариантах осуществления R_{18} представляет собой тетразолил.

10 В некоторых вариантах осуществления хелатора формулы (III):

каждый R_{18} представляет собой $COOH$;

один из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(CH_2)_m-$, а другой из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

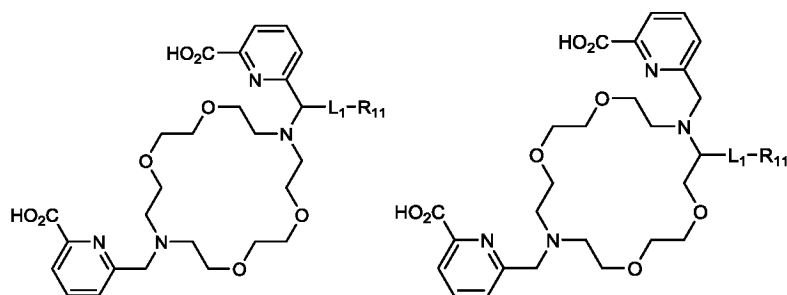
R_{12} представляет собой водород;

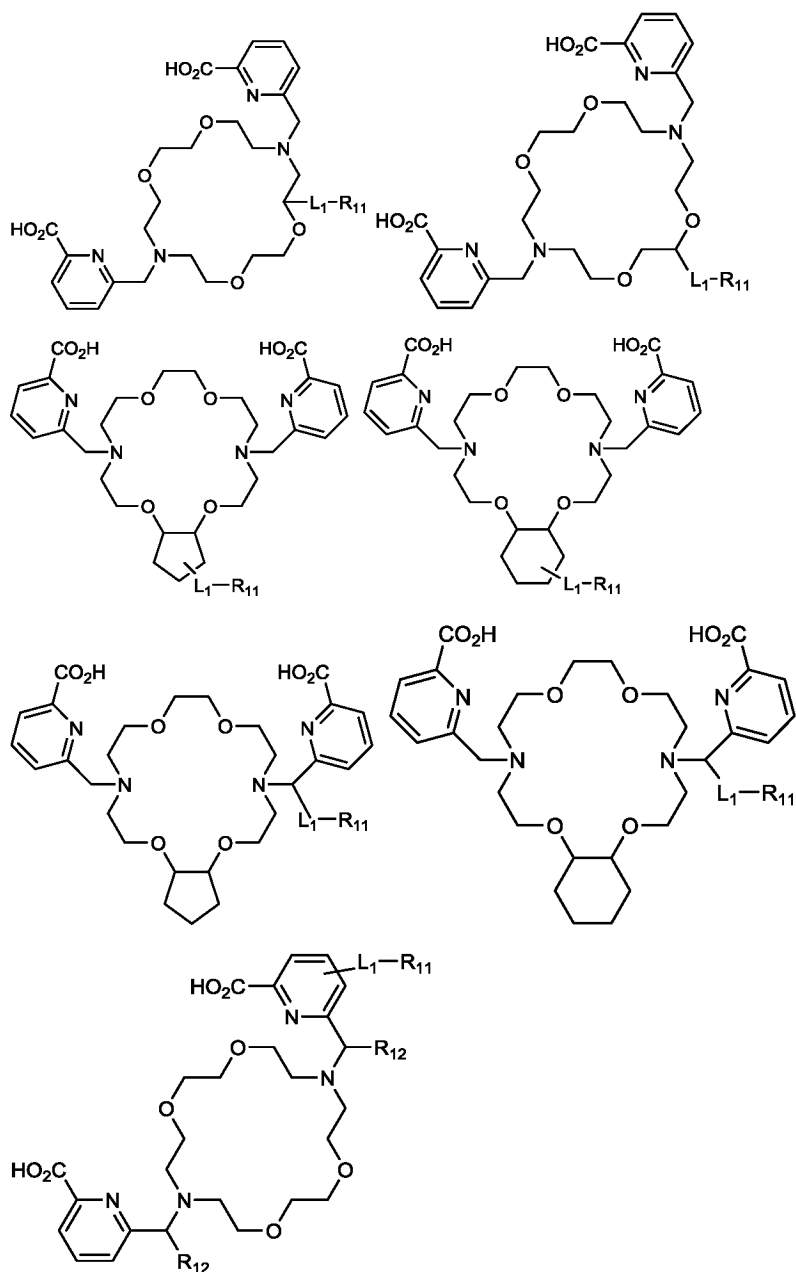
15 m равен 1; каждый n равен 0;

X представляет собой $-L_1-R_{11}$, в котором L_1 представляет собой линкер, а $-R_{11}$ представляет собой электрофильную группу, например, циклооктинил или циклооктильное производное, такое как DBCO, DBCO или BCN; и

каждый из $R_{14}-R_{17}$ представляет собой водород, или в альтернативном
20 варианте осуществления R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо.

В конкретных вариантах осуществления изобретения хелатор выбран из группы, состоящей из:





5

где:

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_{11} представляет собой нуклеофильный фрагмент или электрофильный фрагмент, или R_{11} содержит антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30);

и

10

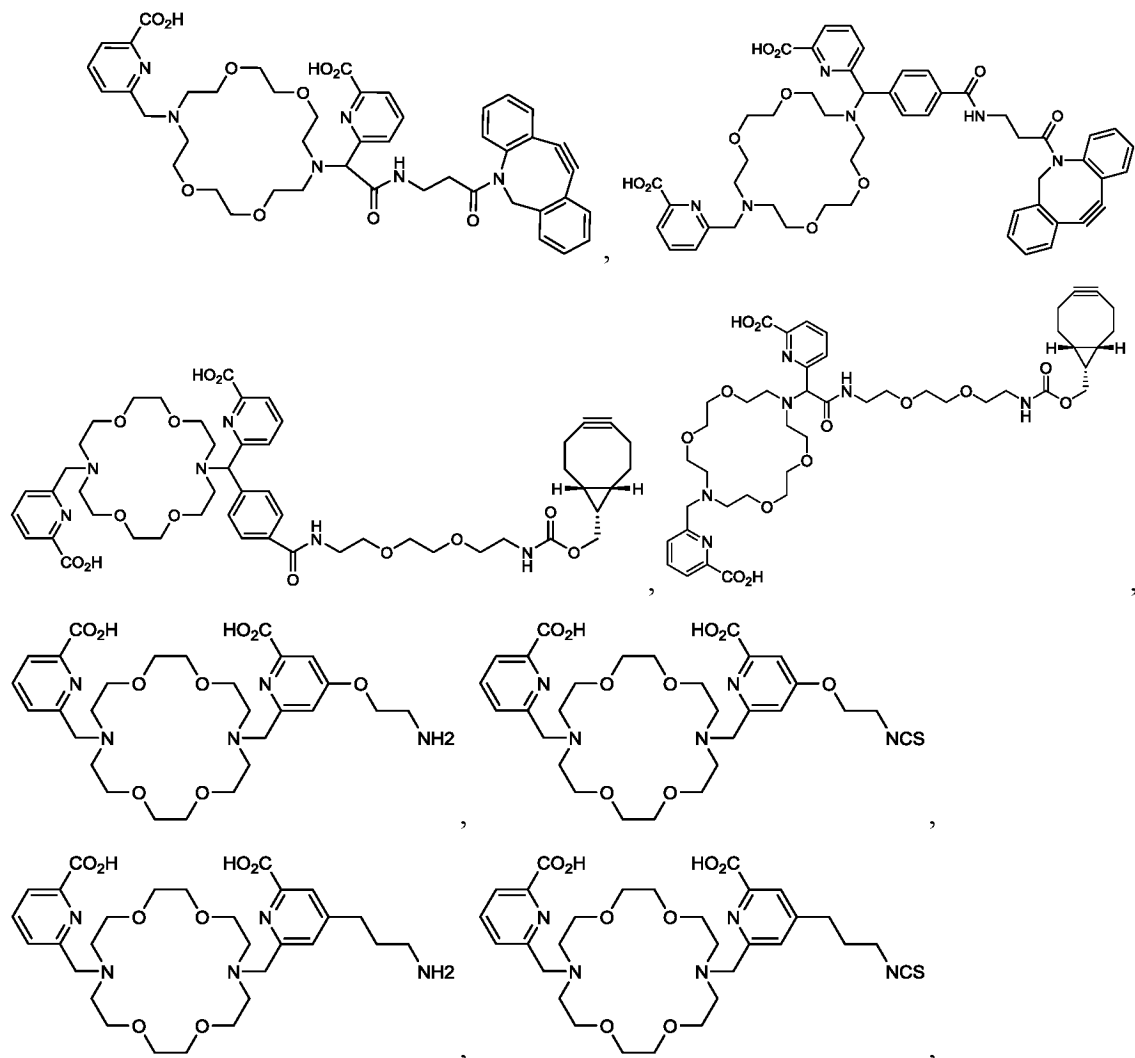
каждый R_{12} независимо представляет собой водород, $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$ при условии, что по меньшей мере один R_{12} представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$.

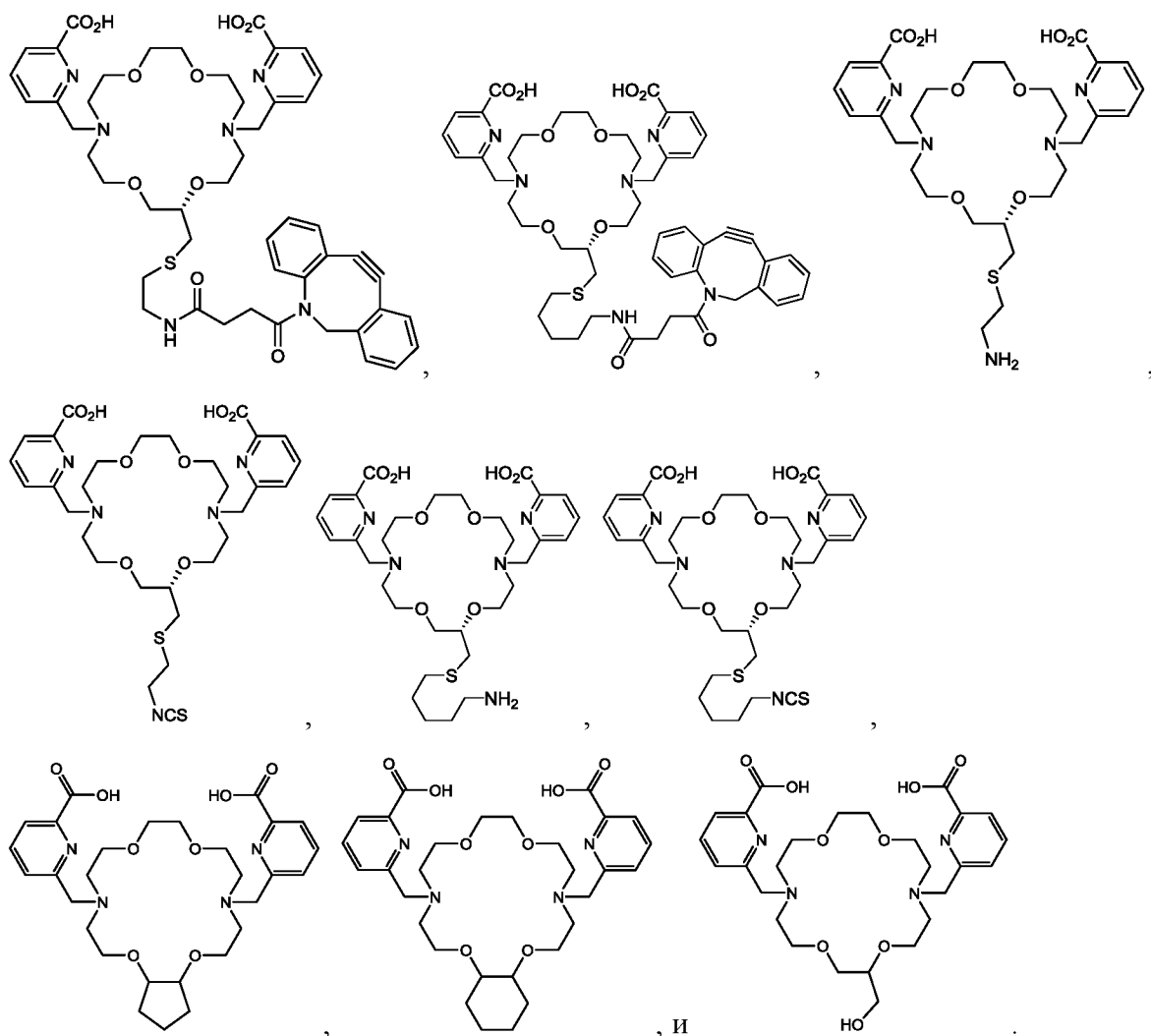
В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой $-NH_2$, $-NCS$, $-NCO$, $-N_3$, алкинил, циклоалкинил, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеимидо, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен.

В определенных вариантах осуществления R_{11} представляет собой циклооктинил или производное циклооктинила, выбранное из группы, состоящей из бициклононила (BCN), дифтористого циклооктинила (DIFO), дибензоциклооктинила (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинонила (BARAC), дибензоазациклооктинила (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктинила (DIMAC), дифторбензоциклооктинила (DIFBO), монобензоциклооктинила (MOBO) и тетраметоксидибензоциклооктинила (TMDIBO).

Предпочтительно R_{11} представляет собой алкинильную группу или циклоалкинильную группу, более предпочтительно циклоалкинильную группу, например, DBCO или BCN.

Примеры хелаторов изобретения включают, без ограничений:



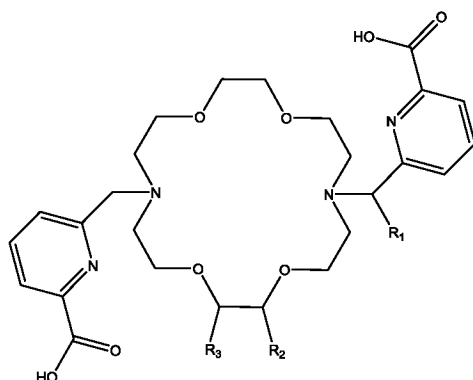


Такие хелаторы могут быть ковалентно связаны с антигенсвязывающим доменом с образованием иммуноконъюгатов или радиоактивных иммуноконъюгатов посредством взаимодействия хелатора с меченым азидом антигенсвязывающим доменом с образованием 1,2,3-триазольного линкера посредством клик-реакции, как описано в WO2020/229974.

Хелаторы изобретения можно получать любым известным в данной области способом в контексте настоящего описания. Например, ароматические/гетероароматические группы боковых цепей могут быть присоединены к макроциклической кольцевой части способами, известными в данной области, такими как проиллюстрированы в примерах и описаны в WO2020/229974.

ХЕЛАТОРЫ ФОРМУЛ (IV), (V) и (VI)

В варианте осуществления термин «хелатор» относится к соединению формулы (IV)



(IV)

5

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R_1 представляет собой водород, а R_2 представляет собой $-L_1-R_4$;

альтернативно R_1 представляет собой $-L_1-R_4$, а R_2 представляет собой водород;

10

R_3 представляет собой водород;

альтернативно R_2 и R_3 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членный циклоалкил, при этом 5- или 6-членный циклоалкил необязательно замещен $-L_1-R_4$;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и

15

R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30).

В некоторых вариантах осуществления L_1 отсутствует. Если L_1 отсутствует, R_4 напрямую связан (например, посредством ковалентной связи) с соединением.

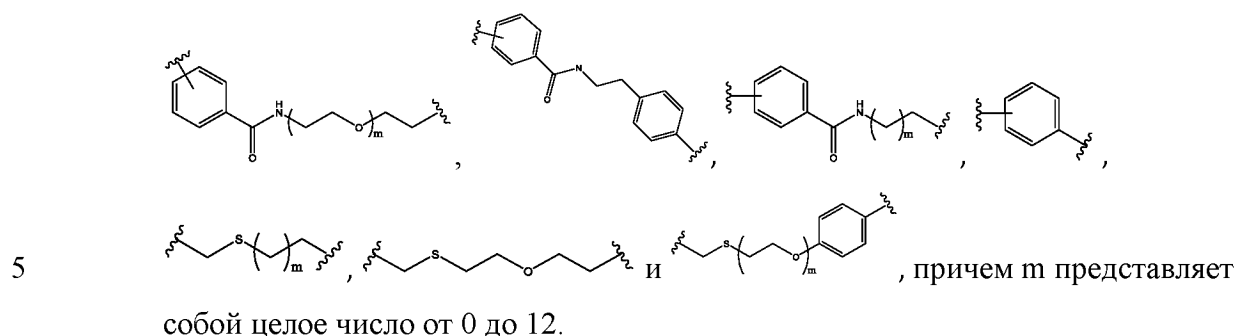
В некоторых вариантах осуществления L_1 представляет собой линкер.

20

Используемый в настоящем документе термин «линкер» относится к химическому фрагменту, который соединяет соединение изобретения с нуклеофильным фрагментом, электрофильным фрагментом или антигенсвязывающим доменом. В изобретении может быть использован любой приемлемый линкер, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Линкеры могут иметь, например, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкильный фрагмент, замещенный или незамещенный арил или гетероарил, полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер, пептидный линкер, линкер на основе сахара или

25

расщепляемый линкер, например, дисульфидная связь или сайт расщепления протеазой, такой как валин-цитруллин-р-аминобензил (PAB). Примеры линкерных структур, приемлемых для применения в изобретении, включают, без ограничений:



В некоторых вариантах осуществления R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент или электрофильный фрагмент. Термин «нуклеофильный фрагмент» или «нуклеофильная группа» относится к функциональной группе, которая предоставляет

10 пару электронов для образования ковалентной связи в химической реакции.

«Электрофильный фрагмент» или «электрофильная группа» относится к функциональной группе, которая принимает пару электронов для образования ковалентной связи в химической реакции. Нуклеофильные группы вступают в реакцию

15 с электрофильными группами и, *наоборот*, в химические реакции с образованием новых ковалентных связей. Реакция нуклеофильной группы или электрофильной группы соединения изобретения с антигенсвязывающим фрагментом или другим химическим фрагментом (например, линкером), содержащими соответствующий партнер по реакции, обеспечивает ковалентную связь антигенсвязывающего фрагмента

или химического фрагмента с соединением изобретения.

20 Примеры нуклеофильных групп включают, без ограничений, азиды, амины и тиолы. Примеры электрофильных групп включают, без ограничений, реакционноспособные с амином группы, способные к реакции с тиолом группы, алкинилы и циклоалкинилы. Реакционноспособная с амином группа предпочтительно реагирует с первичными аминами, включая первичные амины, которые существуют на

25 N-конце каждой полипептидной цепи и в боковой цепи остатков лизина. Примеры реакционноспособных с амином групп, приемлемых для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, N-гидроксисукцинимид (NHS), замещенный NHS (такой как сульфо-NHS), изотиоцианат ($-NCS$), изоцианат ($-NCO$), эфиры, карбоксильную кислоту, ацилгалогениды, амиды, алкиламиды и тетра- и пер-

30 фторфениловый эфир. Способная к реакции с тиолом группа реагирует с тиолами или

сульфгидрилами, предпочтительно тиолами, присутствующими в боковой цепи цистеиновых остатков полипептидов. Примеры способных к реакции с тиолом групп, приемлемых для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, акцепторы Мишеля (например, малеимид), галоацетил, ацилгалогениды, активированные дисульфиды и фенилоксадиазолсульфон.

В определенных вариантах осуществления R_4 представляет собой $-NH_2$, $-NCS$ (изотиоцианат), $-NCO$ (изоцианат), $-N_3$ (азидо), алкинил, циклоалкинил, карбоновую кислоту, эфир, амидо, алкиламид, малеимидо, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, более конкретно $-NCS$, $-NCO$, $-N_3$, алкинил, циклоалкинил, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеимидо, ацилгалогенид (например, $-C(O)Cl$, $-C(O)Br$), тетразин или транс-циклооктен, причем каждый R_{13} независимо представляет собой водород или алкил.

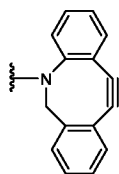
В некоторых вариантах осуществления R_4 представляет собой алкинильную, циклоалкинильную или азидную группу, благодаря чему возможно присоединить соединение изобретения к антигенсвязывающему домену или другому химическому фрагменту (например, линкеру) с помощью клик-реакции. В таких вариантах осуществления клик-реакция, которая может быть проведена, представляет собой циклоприсоединение по Хьюсгену или 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом ($-N_3$) и алкинильной или циклоалкинильной группой с образованием 1,2,4-триазольного линкера или фрагмента. В одном варианте осуществления соединение изобретения содержит алкинильную или циклоалкинильную группу, а антигенсвязывающий домен или другой химический фрагмент содержит азидную группу. В другом варианте осуществления соединение изобретения содержит азидную группу, а антигенсвязывающий домен или другой химический фрагмент содержит алкинильную или циклоалкинильную группу.

В определенных вариантах осуществления R_4 представляет собой алкинильную группу, более предпочтительно концевую алкинильную группу или циклоалкинильную группу, которая взаимодействует с азидной группой, в частности посредством промотируемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC). Примеры циклоалкинильных групп, которые могут реагировать с азидными группами посредством SPAAC, включают в себя, без ограничений, циклооктинил или бициклононинил (BCN), двухфтористый циклооктинил (DIFO), дибензоциклооктинил (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинонил (BARAC), дибензоазациклооктинил (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктинил (DIMAC),

дифторбензоциклооктинил (DIFBO), монобензоциклооктинил (MOBO) и тетраметоксидибензоциклооктинил (TMDIBO).

В определенных вариантах осуществления R_4 представляет собой дибензоазациклооктинил (DIBAC, DBCO, ADIBO), который имеет следующую

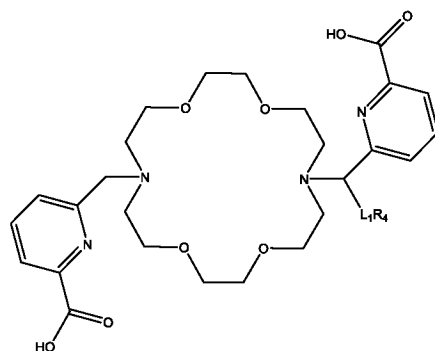
5 структуру:



. В вариантах осуществления, в которых R_4 представляет собой DBCO, DBCO может быть ковалентно связан с соединением напрямую или опосредованно посредством линкера и предпочтительно присоединен к соединению опосредованно посредством линкера.

10 В определенных вариантах осуществления R_4 содержит антигенсвязывающий домен. Антигенсвязывающий домен может быть связан с соединением напрямую посредством ковалентной связи или опосредованно посредством линкера. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен обладает специфическим связыванием с hK2, например Fab из KL2B30.

15 В другом варианте осуществления термин «хелатор» относится к соединению формулы (V):



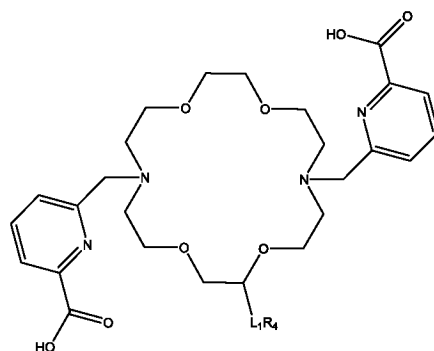
(V)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

20 L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и

R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, или электрофильный фрагмент, или антигенсвязывающий домен.

В другом варианте осуществления хелатор представляет собой соединение формулы (VI):



(VI)

5

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и

R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30).

10

В другом варианте осуществления изобретение относится к соединению, в котором: R_1 представляет собой $-L_1-R_4$; R_2 и R_3 , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членный циклоалкил; L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен; или его фармацевтически приемлемую соль.

15

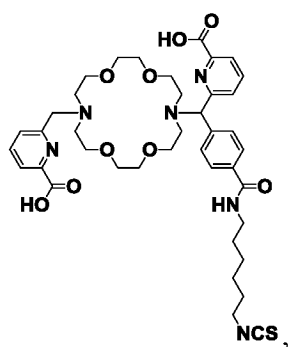
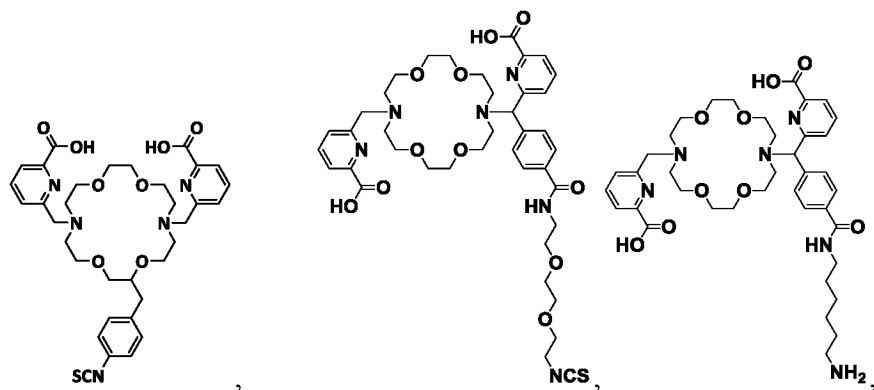
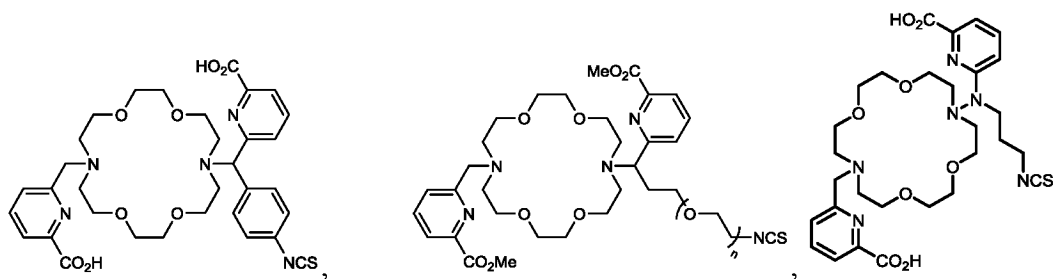
В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к соединению, в котором R_1 представляет собой H; R_2 и R_3 , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членный циклоалкил, замещенный $-L_1-R_4$; L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен; или его фармацевтически приемлемая соль.

20

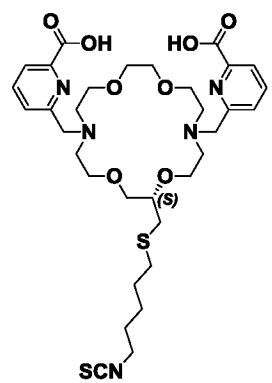
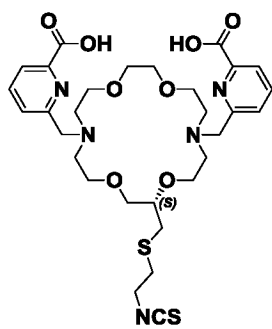
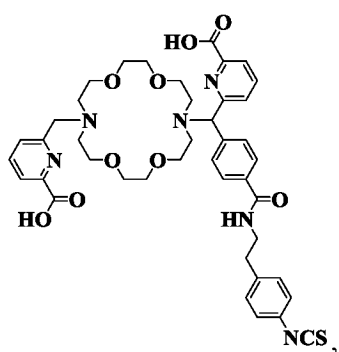
К дополнительным вариантам осуществления относятся такие, в которых R_4 представляет собой антигенсвязывающий домен. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления R_4 содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, например Fab из KL2B30.

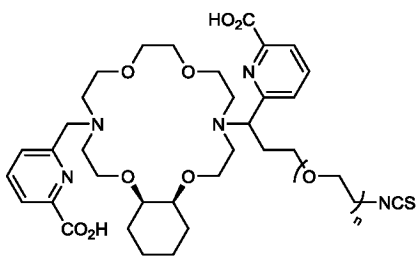
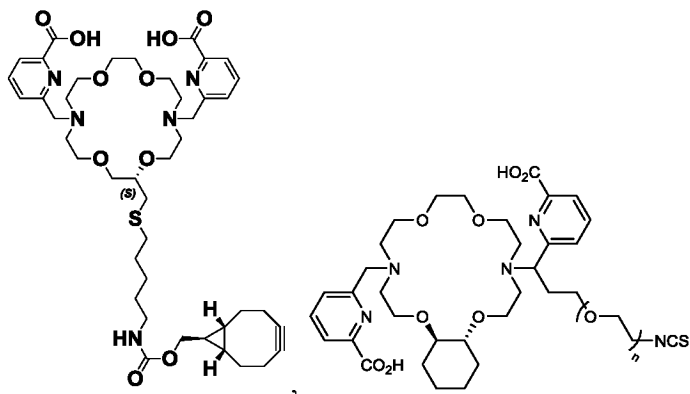
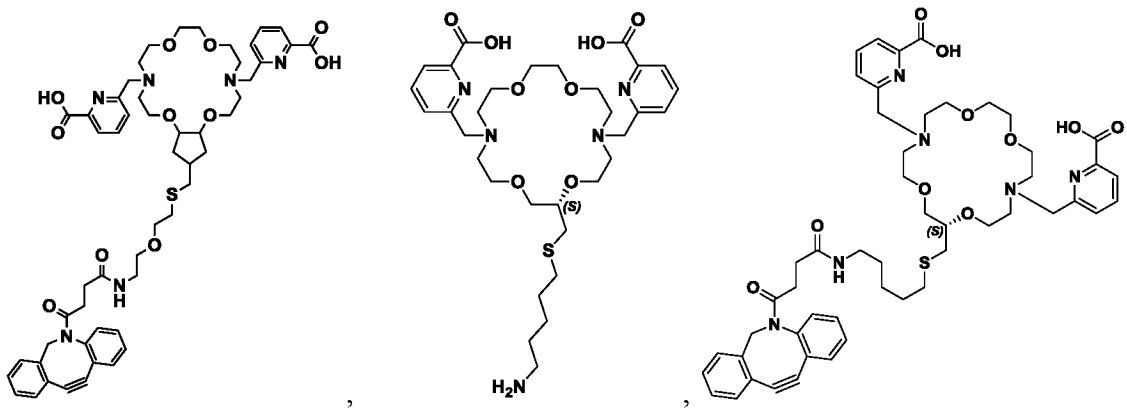
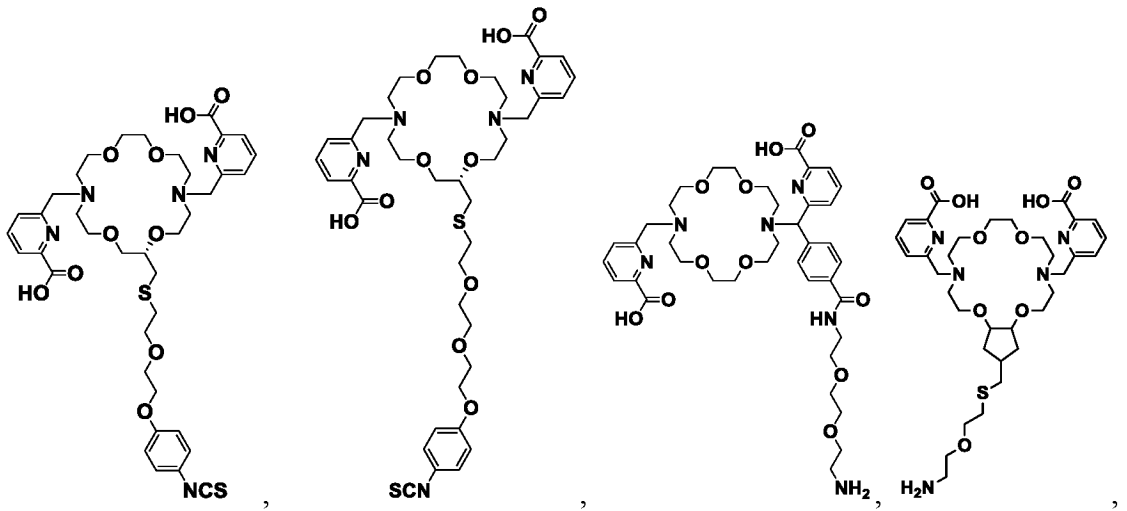
25

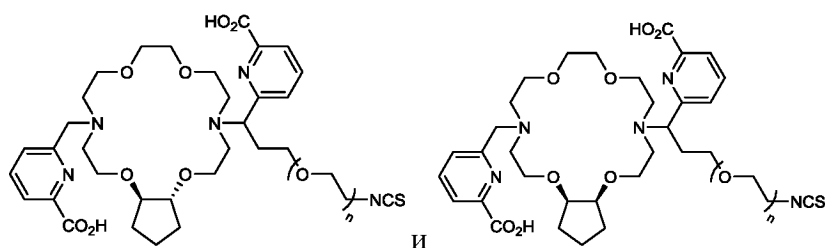
В варианте осуществления хелаторы представляют собой любой один или более независимо выбранных из группы, состоящей из:



5







, причем n равно 1–10.

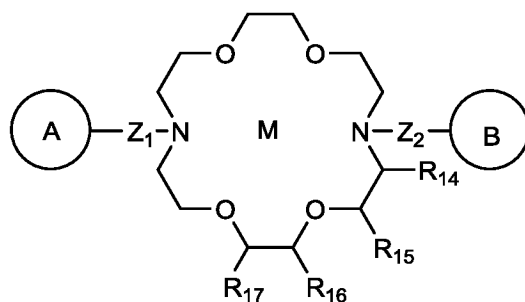
Указанные хелаторы могут быть ковалентно связаны с антигенсвязывающим доменом (например, Fab из KL2B30) с образованием иммуноконъюгатов или радиоактивных иммуноконъюгатов посредством взаимодействия соединения с меченым азидом антигенсвязывающим доменом с образованием 1,2,3-триазольного линкера, например посредством клик-реакции, как описано в WO2020/229974.

Хелаторы, комплексы радиоактивных металлов и радиоактивные иммуноконъюгаты настоящего изобретения можно получать любым известным в данной области способом в контексте настоящего описания; например, ароматические/гетероароматические группы боковых цепей могут быть присоединены к макроциклической кольцевой части способами, известными в данной области, такими как проиллюстрированы в примерах и описаны в WO2020/229974.

Комплексы радиоактивных металлов

В другом общем аспекте изобретение относится к комплексу радиоактивного металла, содержащему ион радиоактивного металла, координированный с хелатором изобретения посредством координационной связи. Любой из хелаторов изобретения, описанных в настоящем документе, может содержать ион радиоактивного металла. Предпочтительно ион радиоактивного металла представляет собой ион альфа-излучающего радиоактивного металла, более предпочтительно ^{225}Ac . Хелаторы изобретения могут устойчиво хелатировать ионы радиоактивных металлов, в частности ^{225}Ac , при любой специфической активности независимо от примесей металлов, таким образом формируя комплекс радиоактивного металла, имеющий высокую стабильность хелатирования *in vivo* и *in vitro* и стабильный к провокационным агентам, например, диэтилентриаминпентауксусной кислоте (ДТРА).

В соответствии с вариантами осуществления изобретения комплекс радиоактивного металла имеет структуру формулы (I-m):



где переменные группы соответствуют определениям, приведенным выше в хелаторах изобретения, например хелатору формулы (I); и М представляет собой ион радиоактивного металла. Ион радиоактивного металла М связан с хелатором посредством координационной связи с образованием комплекса радиоактивного металла. Гетероатомы макроциклического кольца хелатора, а также любые функциональные группы боковых цепей (т. е., $-Z_1$ -кольцо А и/или $-Z_2$ -кольцо В) могут участвовать в координированной связи иона радиоактивного металла.

Любой из хелаторов формулы (I), описанных выше, может быть использован для образования комплексов радиоактивных металлов формулы (I-m).

В определенных вариантах осуществления ион радиоактивного металла М представляет собой ион альфа-излучающего радиоактивного металла. Предпочтительно ион альфа-излучающего радиоактивного металла представляет собой ^{225}Ac .

В соответствии с вариантами осуществления изобретения комплекс радиоактивного металла содержит по меньшей мере одну группу X, в которой X представляет собой $-L_1-R_{11}$, где L_1 отсутствует или представляет собой линкер, а R_{11} представляет собой электрофильный фрагмент или нуклеофильный фрагмент, или R_{11} содержит антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30). Когда R_{11} представляет собой нуклеофильный или электрофильный фрагмент, такой фрагмент можно использовать для присоединения комплекса радиоактивного металла к антигенсвязывающему домену непосредственно или опосредованно посредством линкера.

В определенных вариантах осуществления радиоактивный металл содержит одну группу X, и предпочтительно L_1 из группы X представляет собой линкер.

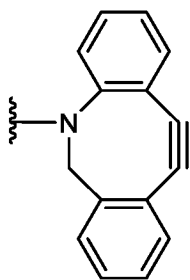
В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой $-\text{NH}_2$, $-\text{NHS}$ (изоотиоцианат), $-\text{NCO}$ (изоцианат), $-\text{N}_3$ (азидо), алкинил, циклоалкинил, карбоновую кислоту, эфир, амидо, алкиламид, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-

циклооктен, более конкретно $-\text{NH}-\text{CO}$, $-\text{NH}-_3$, алкинил, циклоалкинил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}_{13}$, $-\text{COOR}_{13}$, $-\text{CON}(\text{R}_{13})_2$, малеимида или ацилгалогенид (например, $-\text{C}(\text{O})\text{Cl}$, $-\text{C}(\text{O})\text{Br}$), причем каждый R_{13} независимо представляет собой водород или алкил.

В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой алкинильную, циклоалкинильную или азидную группу, благодаря чему возможно присоединить хелатор к антигенсвязывающему домену или другому химическому фрагменту (например, линкеру) с помощью клик-реакции.

В определенных вариантах осуществления R_{11} представляет собой алкинильную группу, более предпочтительно концевую алкинильную группу или циклоалкинильную группу, которая реагирует с азидной группой, в частности посредством промотируемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC). Примеры циклоалкинильных групп, которые могут реагировать с азидными группами посредством SPAAC, включают в себя, без ограничений, циклооктинил или циклооктильное производное, такое как бициклононин (BCN), двухфтористый циклооктин (DIFO), дибензоциклооктин (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинон (BARAC), дибензоазациклооктин (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктин (DIMAC), дифторбензоциклооктин (DIFBO), монобензоциклооктин (MOBO) и тетраметокси-дибензоциклооктин (DBCO), (TMDIBO).

В конкретном варианте осуществления R_{11} представляет собой дибензоазациклооктинил (DIBAC, DBCO, ADIBO), который имеет следующую структуру:



В таких вариантах осуществления, в которых R_{11} представляет собой DBCO, DBCO может быть ковалентно связан с комплексом радиоактивного металла непосредственно или опосредованно посредством линкера и предпочтительно присоединен к комплексу радиоактивного металла опосредованно посредством линкера.

В другом конкретном варианте осуществления R_{11} представляет собой бициклононил (BCN).

В соответствии с вариантами осуществления изобретения каждое из кольца А и кольца В независимо представляет собой 6–10-членный арил или 5–10-членный гетероарил. В альтернативных вариантах осуществления предполагается, что каждое из кольца А и кольца В представляют собой необязательно замещенное

5 гетероциклическое кольцо, такое как оксазолин. Каждое из кольца А и кольца В может быть необязательно и независимо замещено одной или более группами заместителей, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, алкила, алкенила, циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероциклила, гетероарила, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, $-CN$, $-OC(O)N(R_{13})_2$ и X.

10 Примеры 6–10-членных арильных групп, приемлемых для этой цели, включают в себя, без ограничений, фенил и нафтил. Примеры 5–10-членных гетероарильных групп, приемлемых для этой цели, включают в себя, без ограничений, пиридинил, изотиазолил, изоксазолил и имидазолил. Примеры приемлемых заместителей 5–10-членной гетероарильной и 6–10-членной арильной групп включают, без ограничений, $-COOH$,

15 тетразолил и $-CH_2COOH$.

В определенных вариантах осуществления каждое из кольца А и кольца В независимо и необязательно замещены одной или более карбоксильными группами, включая, без ограничений, $-COOH$ и $-CH_2COOH$.

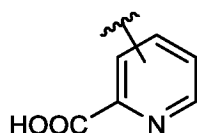
В одном варианте осуществления кольцо А и кольцо В одинаковы, например,

20 кольцо А и кольцо В представляют собой пиридинил. В другом варианте осуществления кольцо А и кольцо В отличаются друг от друга, например, кольцо А или кольцо В представляет собой пиридинил, а другое кольцо представляет собой фенил.

В конкретном варианте осуществления оба из кольца А и кольца В представляют собой пиридинил, замещенный $-COOH$.

25 В конкретном варианте осуществления оба из кольца А и кольца В представляют собой пиридинил, замещенный тетразолилом.

В другом конкретном варианте осуществления оба из кольца А и кольца В представляют собой группы пиколиновой кислоты, имеющие следующую структуру:



30 В соответствии с вариантами осуществления изобретения каждый из Z_1 и Z_2 независимо представляет собой $-(C(R_{12})_2)_m-$ или $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$; каждый X

независимо представляет собой $-L_1-R_{11}$; каждый n независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5; каждый m равен 1, 2, 3, 4 или 5;

В некоторых вариантах осуществления как Z_1 , так и Z_2 представляют собой $-(CH_2)_m-$, где каждый m предпочтительно равен 1. В таких вариантах осуществления атом углерода макроциклического кольца, кольца А или кольца В замещен группой X.

В некоторых вариантах осуществления один из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$, а другой представляет собой $-(CH_2)_m-$.

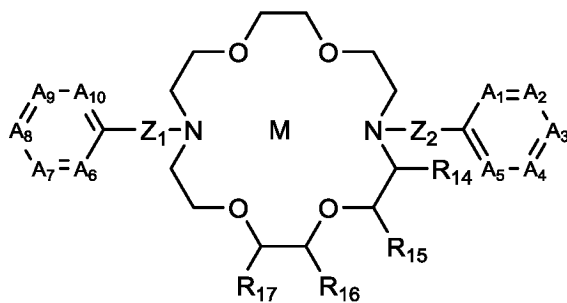
В некоторых вариантах осуществления один из Z_1 и Z_2 $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$, а другой представляет собой $-(CH_2)_m-$; каждый n равен 0; m равен 1; X представляет собой $-L_1-R_{11}$; а L_1 представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления как Z_1 , так и Z_2 представляют собой $-(CH_2)_m-$; каждый m независимо составляет 0, 1, 2, 3, 4 или 5, предпочтительно каждый m составляет 1; и один из R_{14} , R_{15} , R_{16} и R_{17} представляет собой X, а каждый из остальных R_{14} , R_{15} , R_{16} и R_{17} представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления R_{14} и R_{15} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо (например, циклопентил или циклогексил). Такое 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо может быть замещено группой X.

В некоторых вариантах осуществления R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо (например, циклопентил или циклогексил). Такое 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо может быть замещено группой X.

В определенных вариантах осуществления комплекс радиоактивного металла имеет структуру формулы (II-m):



(II-m)

где переменные группы соответствуют определениям, приведенным выше в хелаторах изобретения, например хелатору формулы (II); и M представляет собой ион

радиоактивного металла, предпочтительно ион альфа-излучающего радиоактивного металла, более предпочтительно ^{225}Ac .

Любой из хелаторов формулы (II), описанных выше, может быть использован для образования комплексов радиоактивных металлов формулы (III-m).

5 В некоторых вариантах осуществления один из A_1 , A_2 , A_3 , A_4 и A_5 представляет собой азот, один из A_1 , A_2 , A_3 , A_4 и A_5 представляет собой углерод, замещенный -COOH, а остальные представляют собой CH, т. е. образуют пиридиноподобное кольцо, замещенное карбоновой кислотой.

10 В некоторых вариантах осуществления один из A_6 , A_7 , A_8 , A_9 и A_{10} представляет собой азот, один из A_6 , A_7 , A_8 , A_9 и A_{10} представляет собой углерод, замещенный -COOH, а остальные представляют собой CH, т. е. образуют пиридиноподобное кольцо, замещенное карбоновой кислотой.

15 В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 представляет собой -COOH. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} представляет собой -COOH. В другом варианте осуществления по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 представляет собой -COOH; и по меньшей мере один из R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} представляет собой -COOH.

В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_{10} представляет собой азот; A_2 представляет собой CR_2 , а R_2 представляет собой -COOH;

20 A_9 представляет собой CR_9 , а R_9 представляет собой -COOH; каждый из A_3 - A_8 представляет собой CR_2 , CR_3 , CR_4 , CR_5 , CR_6 , CR_7 и CR_8 , соответственно; а каждый из R_3 - R_8 представляет собой водород.

25 В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 представляет собой тетразолил. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} представляет собой тетразолил. В другом варианте осуществления по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 представляет собой тетразолил; и по меньшей мере один из R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} представляет собой тетразолил.

В некоторых вариантах осуществления R_{12} представляет собой водород.

30 В некоторых вариантах осуществления R_{11} представляет собой алкильную группу или циклоалкильную группу, предпочтительно циклооктил или циклооктильное производное, например, DBCO.

В конкретных вариантах осуществления комплекса радиоактивного металла с формулой (II-m):

M представляет собой ^{225}Ac ;

каждый из A_1 и A_{10} представляет собой азот;

5 A_2 представляет собой CR_2 , а R_2 представляет собой $-\text{COOH}$;

A_9 представляет собой CR_9 , а R_9 представляет собой $-\text{COOH}$;

каждый из A_3 – A_8 представляет собой CR_2 , CR_3 , CR_4 , CR_5 , CR_6 , CR_7 и CR_8 , соответственно;

каждый из R_3 – R_8 представляет собой водород;

10 один из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(\text{CH}_2)_m-$, а другой из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{R}_{12})(\text{X})-(\text{CH}_2)_n-$;

R_{12} представляет собой водород;

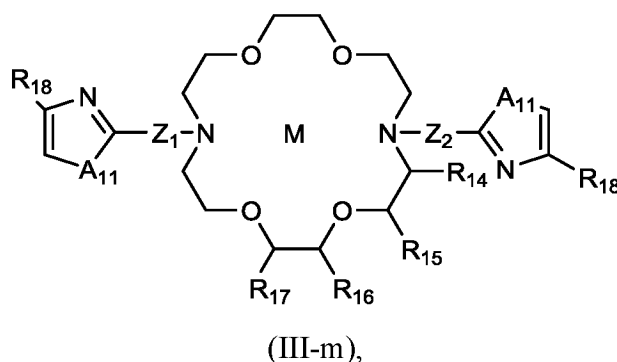
m равен 1;

каждый n равен 0;

15 X представляет собой $-\text{L}_1-\text{R}_{11}$, в котором L_1 представляет собой линкер, а $-\text{R}_{11}$ представляет собой электрофильную группу, например, циклооктинил или циклооктильное производное, такое как DBCO; и

каждый из R_{14} – R_{17} представляет собой водород, или в альтернативном варианте осуществления R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо.

20 В определенных вариантах осуществления комплекс радиоактивного металла имеет структуру формулы (III-m):



25 где переменные группы соответствуют определениям, приведенным выше в хелаторах изобретения, например хелатору формулы (III); и M представляет собой ион радиоактивного металла, предпочтительно ион альфа-излучающего радиоактивного металла, более предпочтительно ^{225}Ac .

Любой из хелаторов формулы (III), описанных выше, может быть использован для образования комплексов радиоактивных металлов формулы (III-m).

В некоторых вариантах осуществления каждый A_{11} представляет собой одно и то же, а каждый A_{11} представляет собой O, S, NMe или NH. Например, каждый A_{11} может представлять собой S. В других вариантах осуществления каждый A_{11} отличается и каждый независимо выбран из O, S, NMe и NH.

В некоторых вариантах осуществления каждый R_{18} независимо представляет собой $-(CH_2)_p-COOR_{13}$, причем R_{13} представляет собой водород, а каждый p независимо равен 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления, каждый R_{18} представляет собой $-COOH$;
 В некоторых вариантах осуществления каждый R_{18} представляет собой $-CH_2COOH$.

В некоторых вариантах осуществления R_{18} представляет собой тетразолил.

В конкретных вариантах осуществления комплекса радиоактивного металла с формулой (III-m):

каждый R_{18} представляет собой $COOH$;

один из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(CH_2)_m-$, а другой из Z_1 и Z_2 представляет собой $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

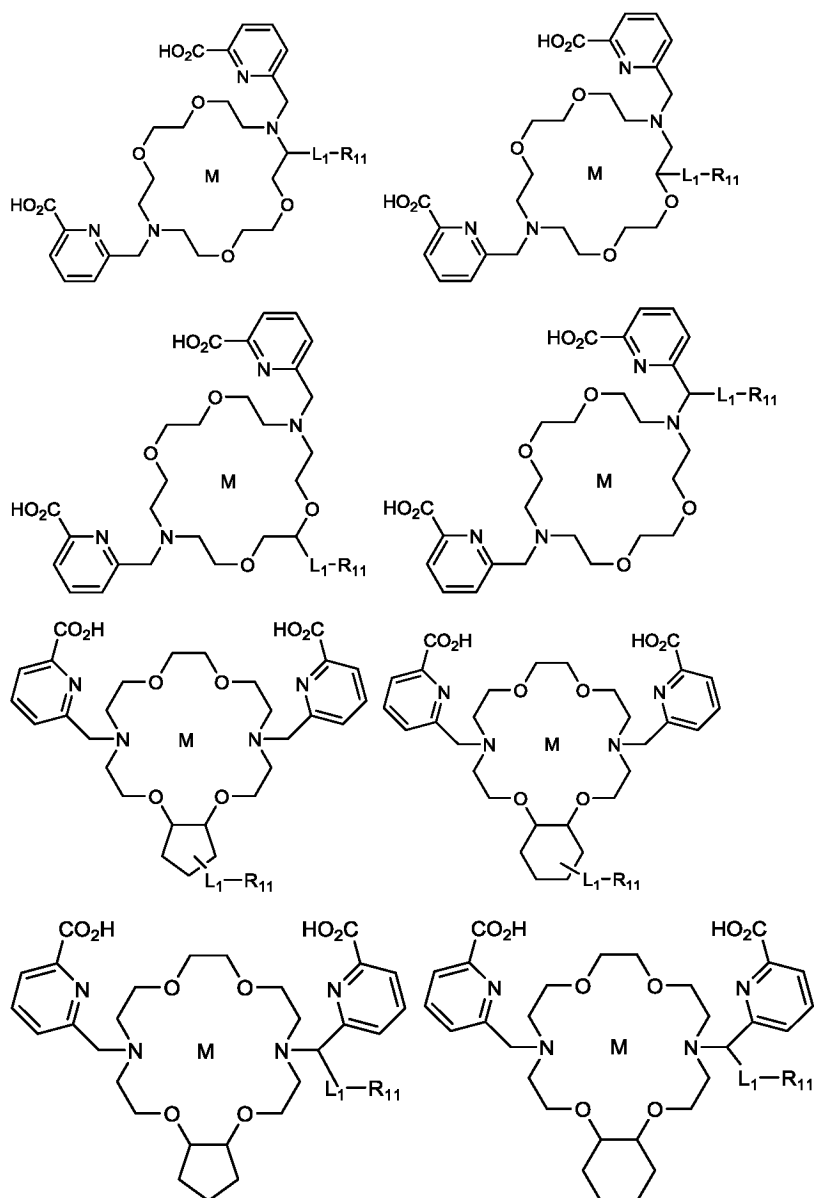
R_{12} представляет собой водород;

m равен 1; каждый n равен 0;

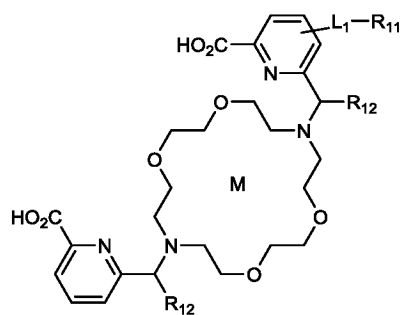
X представляет собой $-L_1-R_{11}$, в котором L_1 представляет собой линкер, а $-R_{11}$ представляет собой электрофильную группу, например, циклооктинил или циклооктильное производное, такое как DBCO; и

каждый из $R_{14}-R_{17}$ представляет собой водород, или в альтернативном варианте осуществления R_{16} и R_{17} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо.

В некоторых вариантах осуществления изобретения комплекс радиоактивного металла имеет одну из следующих структур:



5



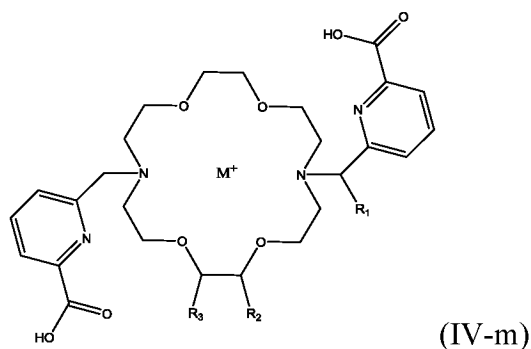
где:

M представляет собой актиний-225 (^{225}Ac), L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_{11} представляет собой нуклеофильный фрагмент или электрофильный фрагмент, или R_{11} содержит антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30); и

каждый R_{12} независимо представляет собой водород, $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$ при условии, что по меньшей мере один R_{12} представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к структуре комплекса радиоактивного металла формулы (IV-m):



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

M^+ представляет собой ион радиоактивного металла, причем M^+ выбран из группы, состоящей из следующих: актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{223}Ra), висмут-213 (^{213}Bi), свинец-212 ($^{212}Pb(II)$ и/или $^{212}Pb(IV)$), тербий-149 (^{149}Tb), тербий-152 (^{152}Tb), тербий-155 (^{155}Tb), фермий-255 (^{255}Fm), торий-227 (^{227}Th), торий-226 ($^{226}Th^{4+}$), аstat-211 (^{211}At), церий-134 (^{134}Ce), неодим-144 (^{144}Nd), лантан-132 (^{132}La), лантан-135 (^{135}La) и уран-230 (^{230}U);

R_1 представляет собой водород, а R_2 представляет собой $-L_1-R_4$;

альтернативно R_1 представляет собой $-L_1-R_4$, а R_2 представляет собой водород;

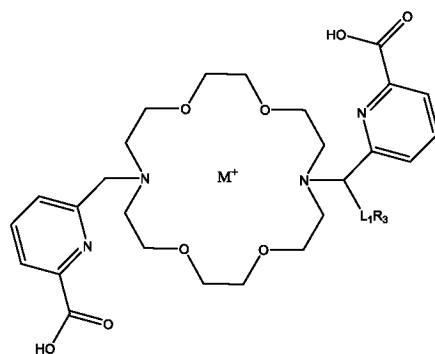
R_3 представляет собой водород;

альтернативно R_2 и R_3 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членный циклоалкил, при этом 5- или 6-членный циклоалкил необязательно замещен $-L_1-R_4$;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30).

В другом варианте осуществления изобретение относится к комплексу радиоактивного металла формулы (V-m):



(V-m)

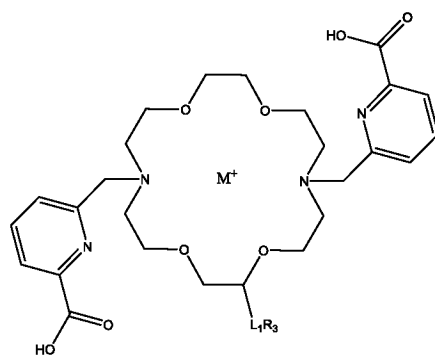
или его фармацевтически приемлемая соль, где:

M^+ представляет собой ион радиоактивного металла, причем M^+ выбран из группы, состоящей из следующих: актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{223}Ra), висмут-213 (^{213}Bi), свинец-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербий-149 (^{149}Tb), тербий-152 (^{152}Tb), тербий-155 (^{155}Tb), фермий-255 (^{255}Fm), торий-227 (^{227}Th), торий-226 ($^{226}\text{Th}^{4+}$), астат-211 (^{211}At), церий-134 (^{134}Ce), неодим-144 (^{144}Nd), лантан-132 (^{132}La), лантан-135 (^{135}La) и уран-230 (^{230}U);

L_1 отсутствует или представляет собой линкер;

R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30).

В другом варианте осуществления изобретение относится к соединениям формулы (VI-m):



(VI-m)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

M^+ представляет собой ион радиоактивного металла, причем M^+ выбран из группы, состоящей из следующих: актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{223}Ra), висмут-213 (^{213}Bi), свинец-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербий-149 (^{149}Tb), тербий-152 (^{152}Tb), тербий-155 (^{155}Tb), фермий-255 (^{255}Fm), торий-227 (^{227}Th), торий-226 ($^{226}\text{Th}^{4+}$), астат-211 (^{211}At), церий-134 (^{134}Ce), неодим-144 (^{144}Nd), лантан-132

(^{132}La), лантан-135 (^{135}La) и уран-230 (^{230}U); L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и

R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30).

5 В другом варианте осуществления изобретение относится к комплексу радиоактивного металла, в котором:

M^+ представляет собой ион радиоактивного металла, причем M^+ выбран из группы, состоящей из следующих: актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{233}Ra), висмут-213 (^{213}Bi), свинец-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербий-149 (^{149}Tb), тербий-152 (^{152}Tb), тербий-155 (^{155}Tb), фермий-255 (^{255}Fm), торий-227 (^{227}Th), торий-226 ($^{226}\text{Th}^{4+}$), астат-211 (^{211}At), церий-134 (^{134}Ce), неодим-144 (^{144}Nd), лантан-132 (^{132}La), лантан-135 (^{135}La) и уран-230 (^{230}U); R_1 представляет собой $-L_1-R_4$;

R_2 и R_3 , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членный циклоалкил;

15 L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и

R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30);
или его фармацевтически приемлемую соль.

20 В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к комплексу радиоактивного металла, в котором:

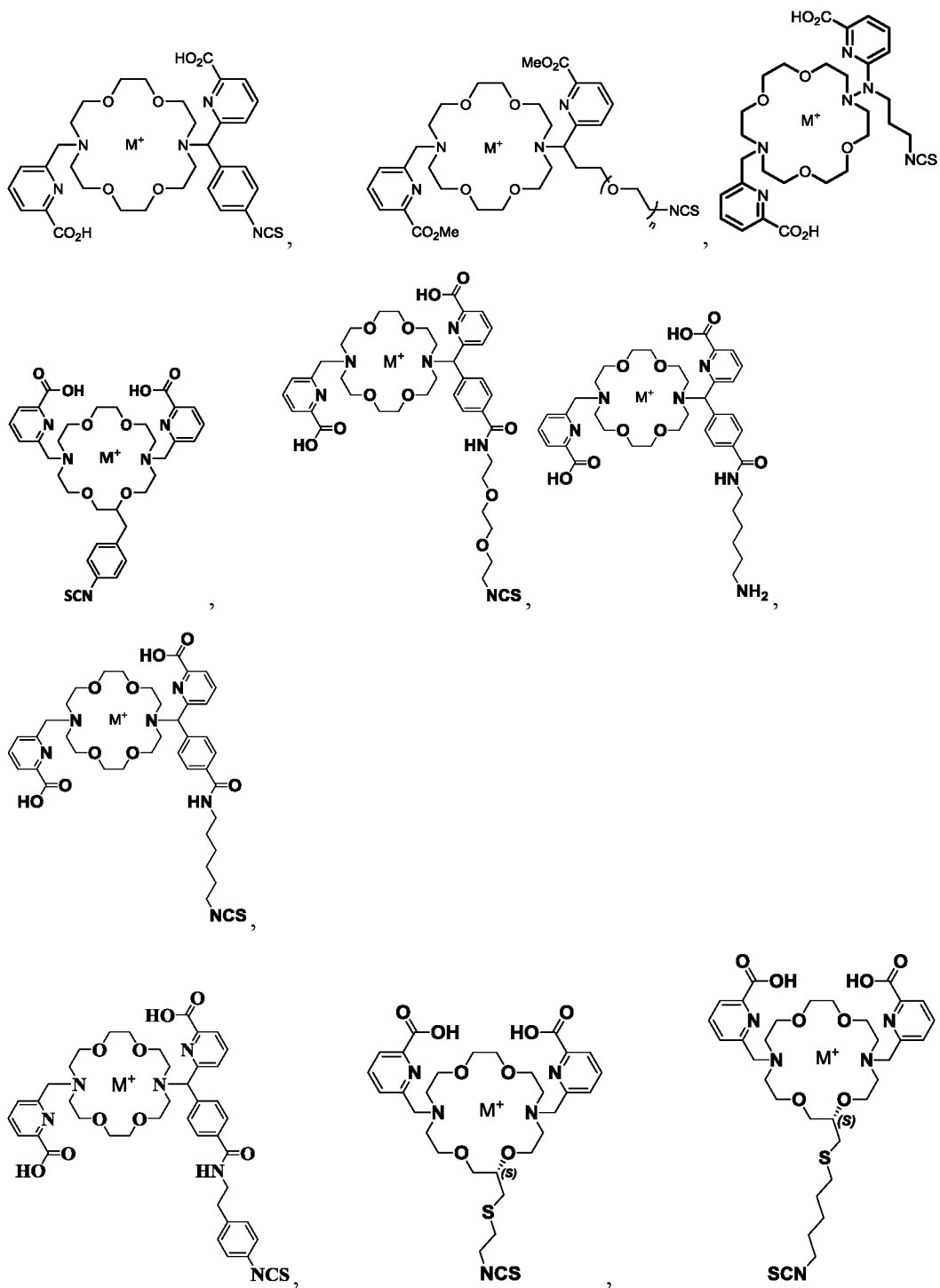
M^+ представляет собой ион радиоактивного металла, причем M^+ выбран из группы, состоящей из следующих: актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{233}Ra), висмут-213 (^{213}Bi), свинец-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербий-149 (^{149}Tb), тербий-152 (^{152}Tb), тербий-155 (^{155}Tb), фермий-255 (^{255}Fm), торий-227 (^{227}Th), торий-226 ($^{226}\text{Th}^{4+}$), астат-211 (^{211}At), церий-134 (^{134}Ce), неодим-144 (^{144}Nd), лантан-132 (^{132}La), лантан-135 (^{135}La) и уран-230 (^{230}U); R_1 представляет собой H;

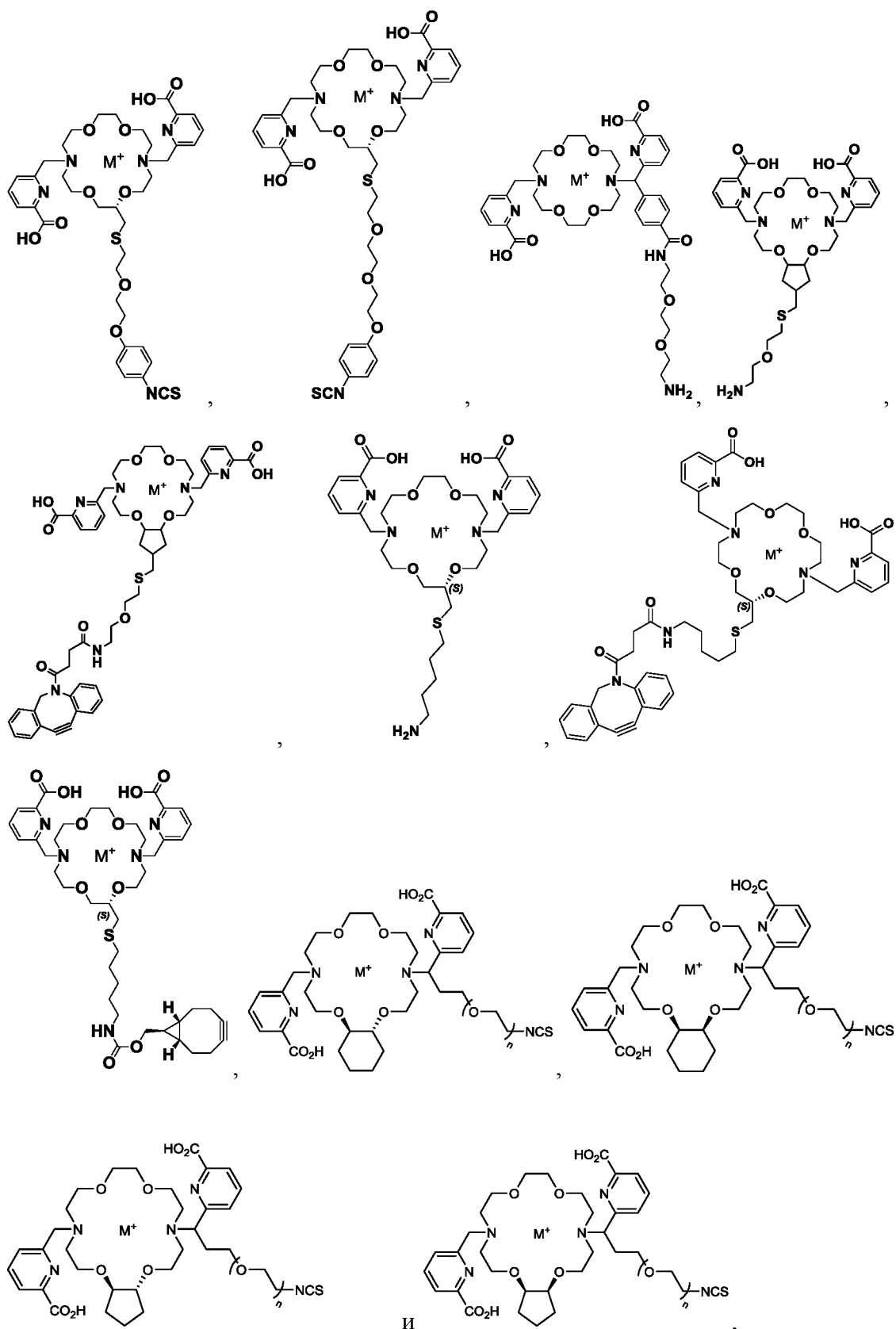
R_2 и R_3 , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членный циклоалкил, замещенный $-L_1-R_4$;

L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и

30 R_4 представляет собой нуклеофильный фрагмент, электрофильный фрагмент или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30);
или его фармацевтически приемлемую соль.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к одному или более комплексам радиоактивных металлов, выбранным из группы, состоящей из:





причем n представляет собой 1–10, а M^+ представляет собой ион радиоактивного металла, причем M^+ выбран из группы, состоящей из следующих: актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{223}Ra), висмут-213 (^{213}Bi), свинец-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербий-149

(¹⁴⁹Tb), тербий-152 (¹⁵²Tb), тербий-155 (¹⁵⁵Tb), фермий-255 (²⁵⁵Fm), торий-227 (²²⁷Th), торий-226 (²²⁶Th⁴⁺), астат-211 (²¹¹At), церий-134 (¹³⁴Ce), неодим-144 (¹⁴⁴Nd), лантан-132 (¹³²La), лантан-135 (¹³⁵La) и уран-230 (²³⁰U).

Комплексы радиоактивных металлов можно получать любым известным в данной области способом в контексте настоящего описания. Например, хелатор изобретения можно смешивать с ионом радиоактивного металла и инкубировать смесь, чтобы обеспечить образование комплекса радиоактивного металла. В одном примере осуществления хелатор смешивают с раствором ²²⁵Ac(NO₃)₃ с образованием радиоактивного комплекса, содержащего ²²⁵Ac, связанный с хелатором посредством координационной связи. Как описано выше, хелаторы изобретения эффективно хелатируют радиоактивные металлы, в частности ²²⁵Ac. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления хелатор по изобретению смешивают с раствором иона ²²⁵Ac в соотношении хелатора и иона ²²⁵Ac, составляющем 1 : 1000, 1 : 500, 1 : 400, 1 : 300, 1 : 200, 1 : 100, 1 : 50, 1 : 10 или 1 : 5, предпочтительно от 1 : 5 до 1 : 200, более предпочтительно от 1 : 5 до 1 : 100. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления отношение хелатора изобретения к ²²⁵Ac, который можно использовать для образования комплекса радиоактивного металла, намного ниже отношения, которое может быть достигнуто с другими известными хелаторами ²²⁵Ac, например с DOTA. Радиоактивный комплекс можно охарактеризовать мгновенной тонкослойной хроматографией (например, БТСХ-СГ), ВЭЖХ, ЖХ-МС и т. д. Примеры способов описаны, например, в WO2020/229974.

Дополнительные варианты осуществления иммуноконъюгатов и радиоактивных иммуноконъюгатов

Как описано в настоящем документе, хелаторы и комплексы радиоактивных металлов изобретения могут быть конъюгированы (т. е., ковалентно связаны) с антигенсвязывающими доменами, такими как антитело, с получением иммуноконъюгатов и/или радиоактивных иммуноконъюгатов, приемлемых, например, для применения в медицинских целях на субъектах, например на людях, таких как нацеленная лучевая терапия. При использовании хелаторов и комплексов радиоактивных металлов изобретения антигенсвязывающие домены, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут специфически связываться с интересующими мишенями (такими как раковые клетки), можно сайт-специфически метить ионами радиоактивных металлов с получением радиоактивных

иммуноконъюгатов. В частности, при использовании хелаторов и/или комплексов радиоактивных металлов изобретения можно получать радиоактивные иммуноконъюгаты, имеющие высокий уровень хелатирования ионов радиоактивных металлов, в частности ^{225}Ac , и требуемое соотношение хелатор-антитело (CAR). В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы настоящего изобретения обеспечивают среднее CAR менее 10, менее 8, менее 6 или менее 4; или CAR от около 2 до около 8, или от около 2 до около 6, или от около 2 до около 4, или от около 2 до около 3; или CAR, составляющий около 2, или около 3, или около 4, или около 5, или около 6, или около 7, или около 8.

10 В соответствии с вариантами осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит хелатор изобретения, например хелатор формулы (I), формулы (II) или формулы (III), как описано в настоящем документе, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, Fab из KL2B30), предпочтительно посредством линкера. В зависимости от реакционно-способных функциональных групп (т. е., нуклеофилов и электрофилов) хелатора и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента возможно множество способов присоединения с различными связями между хелатором и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

20 В соответствии с вариантами осуществления изобретения радиоактивный иммуноконъюгат содержит комплекс радиоактивного металла изобретения, например комплекс радиоактивного металла формулы (I-m), формулы (II-m) или формулы (III-m), как описано в настоящем документе, ковалентно связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, Fab из KL2B30), предпочтительно посредством линкера.

25 Любой из хелаторов или комплексов радиоактивных металлов изобретения, такой как описанные в настоящем документе, можно использовать для получения иммуноконъюгатов или радиоактивных иммуноконъюгатов изобретения.

30 В некоторых вариантах осуществления комплекс радиоактивного металла радиоактивного иммуноконъюгата изобретения содержит ион альфа-излучающего радиоактивного металла, координированный с хелатирующим фрагментом радиоактивного комплекса. Предпочтительно ион альфа-излучающего радиоактивного металла представляет собой ^{225}Ac .

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с радиоактивным комплексом посредством триазольного фрагмента с образованием радиоактивного иммуноконъюгата изобретения.

5 В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент в иммуноконъюгате или радиоактивном иммуноконъюгате настоящей заявки могут специфически связываться с опухолевым антигеном. Предпочтительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с hK2.

10 Иммуноконъюгаты и радиоактивные иммуноконъюгаты изобретения могут быть получены любым способом, известным в данной области в контексте настоящего описания, для конъюгации лигандов, например антител, с хелаторами, включая химические и/или ферментативные способы. Например, иммуноконъюгаты и радиоактивные иммуноконъюгаты могут быть получены с помощью реакции сочетания, включая, без ограничений, образование эфиров, тиоэфиров или амидов из активированных кислот или ацилгалогенидов; реакции нуклеофильного замещения
15 (например, такие как нуклеофильное замещение галогенидного кольца или раскрытие кольца системы с напряженными кольцами); азид-алкиновое циклоприсоединение по Хьюсгену (например, 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом и алкином с образованием 1,2,3-триазольного линкера); тиол-еновое присоединение; образование имина; реакции Дильса-Альдера между тетразинами и транс-циклооктеном (ТСО); и
20 присоединение по Михаэлю (например, присоединение малеимида). В зависимости от используемой реакционно-способной функциональной группы возможно множество других способов присоединения с различными связями. Присоединение лиганда может быть выполнено на хелаторе, который координирован с ионом радиоактивного металла, или на хелаторе, который не координирован с ионом радиоактивного металла.

25 Согласно варианту осуществления радиоактивный иммуноконъюгат может быть получен путем ковалентного связывания комплекса радиоактивного металла изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например посредством клик-реакции. В альтернативном варианте осуществления радиоактивный иммуноконъюгат может быть получен сначала путем получения иммуноконъюгата
30 изобретения путем ковалентного связывания хелатора изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, посредством клик-реакции; иммуноконъюгат можно впоследствии метить ионом радиоактивного металла с получением радиоактивного иммуноконъюгата (это называется «одностадийное прямое радиоактивное мечение»). Как специфичный для остатка, так и сайт-специфичный

способ конъюгации можно использовать для получения иммуноконъюгата и радиоактивных иммуноконъюгатов изобретения. Такие способы описаны, например, в WO2020/229974.

5 В соответствии с вариантами осуществления изобретения способ получения радиоактивного иммуноконъюгата включает реакцию хелатора или радиоактивного комплекса изобретения, причем R_{11} представляет собой нуклеофильный или электрофильный фрагмент, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, Fab из KL2B30) или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим нуклеофильный или электрофильный
10 фрагмент.

В одном варианте осуществления способ включает приведение хелатора изобретения в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим нуклеофильную или электрофильную функциональную группу, с
15 образованием иммуноконъюгата, имеющего ковалентную связь между хелатором и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а взаимодействие иммуноконъюгата с ионом радиоактивного металла происходит таким образом, чтобы ион радиоактивного металла связывался с хелатором иммуноконъюгата посредством
20 координационного связывания, формируя таким образом радиоактивный иммуноконъюгат. Этот вариант осуществления может называться способом «одностадийного прямого радиоактивного мечения», поскольку существует только одна стадия химической реакции с участием радиоактивного металла.

В другом варианте осуществления способ включает приведение в контакт
25 радиоактивного комплекса изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим нуклеофильную или электрофильную функциональную группу, с формированием таким образом радиоактивного иммуноконъюгата. Этот вариант осуществления может называться способом «радиоактивного мечения с помощью клик-реакции». Модифицированное антитело или его антигенсвязывающий
30 фрагмент можно получить любым способом, известным в данной области техники с учетом настоящего описания, например, путем мечения антитела по конкретному остатку би-ортогональной реакционноспособной функциональной группой с использованием одного или более из описанных выше способов, или путем сайт-

специфического включения ненатуральной аминокислоты (например, азидо- или алкинил-аминокислоты) в антитело с использованием одного или более из описанных выше способов. Степень мечения (DOL), иногда называемая степенью замещения (DOS), является особенно полезным параметром для описания и

5 оптимизации биоконъюгатов, таких как антитело, модифицированное ненатуральной аминокислотой. Она выражается в виде среднего количества ненатуральной аминокислоты, связанной с молекулой белка (например, антителом), или в виде молярного соотношения в форме метки/белка. DOL может быть определена из спектра поглощения меченого антитела любым способом, известных в данной области.

10 В определенных вариантах осуществления, как описано в настоящем документе, иммуноконъюгаты и радиоактивные иммуноконъюгаты изобретения получают с использованием клик-реакции. Например, радиоактивные иммуноконъюгаты изобретения могут быть получены с использованием клик-реакции, называемой «радиоактивное мечение с помощью клик-реакции». При радиоактивном мечении с

15 помощью клик-реакции используют партнеров по клик-реакции, предпочтительно азид и алкин (например, циклооктин или производное циклооктина) с образованием ковалентной триазольной связи между радиоактивным комплексом (ионом радиоактивного металла, связанным с хелатором) и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Способы радиоактивного мечения антител с

20 помощью клик-реакции описаны, например, в международной заявке на патент № PCT/US18/65913, озаглавленной Radiolabeling of Polypeptides, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В других вариантах осуществления, называемых «одностадийным прямым радиоактивным мечением», иммуноконъюгат получают с использованием клик-реакции между антителом или его

25 антигенсвязывающим фрагментом и хелатором; иммуноконъюгат впоследствии приводят в контакт с ионом радиоактивного металла с образованием радиоактивного иммуноконъюгата.

В соответствии с вариантом осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата включает связывание иона радиоактивного металла с хелатором

30 изобретения (например, посредством координационной связи).

Вариант осуществления способа «одностадийного прямого радиоактивного мечения» можно описать как способ получения радиоактивного иммуноконъюгата, включающий приведение иммуноконъюгата (т. е., комплекса полипептида с хелатором) в контакт с ионом радиоактивного металла с образованием таким образом

радиоактивного иммуноконъюгата, причем иммуноконъюгат содержит хелатор настоящего изобретения. В соответствии с конкретными вариантами осуществления иммуноконъюгат был образован посредством клик-реакции между хелатором настоящего изобретения и полипептидом. В соответствии с конкретными вариантами осуществления радиоактивный иммуноконъюгат получали без условий отсутствия металлов (например, без какой-либо (-их) стадии(стадий) удаления или активного исключения из реакционной смеси обычных примесей металлов). Это противоречит определенным традиционным способам, в которых необходимо радиоактивно метить антитело в строгих условиях отсутствия металлов во избежание конкурентного (непродуктивного) хелатирования распространенных металлов, таких как железо, цинк и медь, что создает значительные трудности в процессе производства.

В конкретном варианте осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата изобретения включает способ «одностадийного прямого радиоактивного мечения», включающий:

- (i) обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции (например, азидной группой);
- (ii) обеспечение хелатирующего комплекса, содержащего хелатор настоящего изобретения, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции (например, алкинильной или циклоалкинильной группой);
- (iii) приведение модифицированного полипептида в контакт с хелатирующим комплексом в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции (например, азидной группе) реагировать со вторым партнером по клик-реакции (например, алкинильной или циклоалкинильной группой) с образованием таким образом полипептид-хелатного комплекса (т. е., иммуноконъюгата); и
- (iv) приведение полипептид-хелатного комплекса в контакт с ионом радиоактивного металла с получением таким образом радиоактивного иммуноконъюгата (причем радиоактивный иммуноконъюгат содержит полипептид, меченный ионом радиоактивного металла, например, модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, меченные ионом альфа-излучающего радиоактивного металла, связанным с хелатором посредством координационной связи).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления стадию (iv) проводят в условиях отсутствия металлов.

В альтернативном варианте осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата включает способ «радиоактивного мечения с помощью клик-реакции», включающий:

- (i) обеспечение модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной группой;
- (ii) обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион альфа-излучающего радиоактивного металла, связанного с хелатором посредством координационной связи, причем хелатор ковалентно связан с алкинильной или циклоалкинильной группой; и
- (iii) приведение в контакт модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих азидной группе реагировать с алкинильной или циклоалкинильной группой с получением таким образом радиоактивного иммуноконъюгата.

В данной области техники известны условия проведения клик-реакций, а в изобретении могут быть использованы любые условия для проведения клик-реакций, известные специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Примеры условий включают, без ограничений, инкубацию модифицированного полипептида и радиоактивного комплекса в соотношении от 1 : 1 до 1000 : 1 при pH от 4 до 10 и температуре от 20 °C до 70 °C.

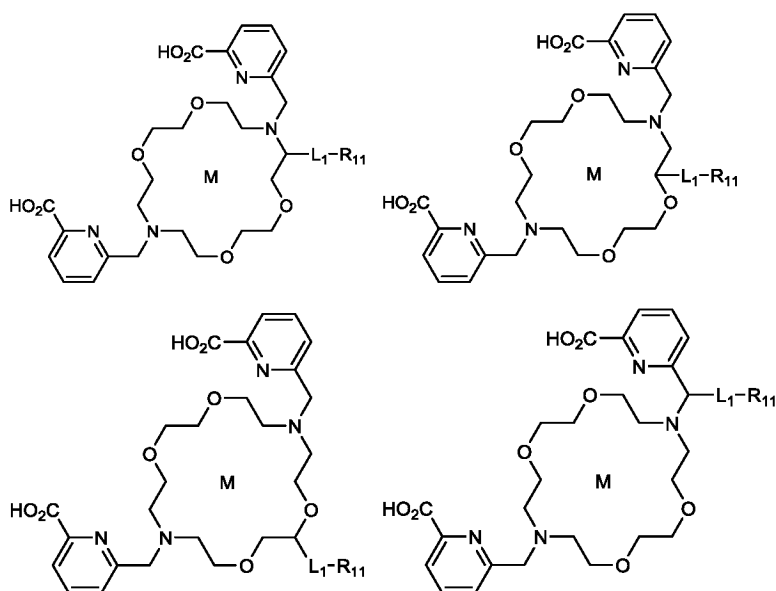
Способы радиоактивного мечения, описанные выше, позволяют хелатировать ион радиоактивного металла в условиях низкого или высокого pH и/или высокой температуры для достижения максимальной эффективности, что может быть достигнуто без риска инактивации алкинового партнера по реакции. Эффективное хелатирование и эффективная реакция SPAAC между меченым азидом антителом или его антигенсвязывающим фрагментом позволяет получать радиоактивные иммуноконъюгаты с высоким радиохимическим выходом даже при низких соотношениях азид : антитело. Единственной стадией, в которой следовые металлы должны быть исключены, является хелатирование ионов радиоактивного металла в хелатирующий фрагмент; стадии производства, очистки и конъюгации антител не должны проводиться в условиях отсутствия металлов.

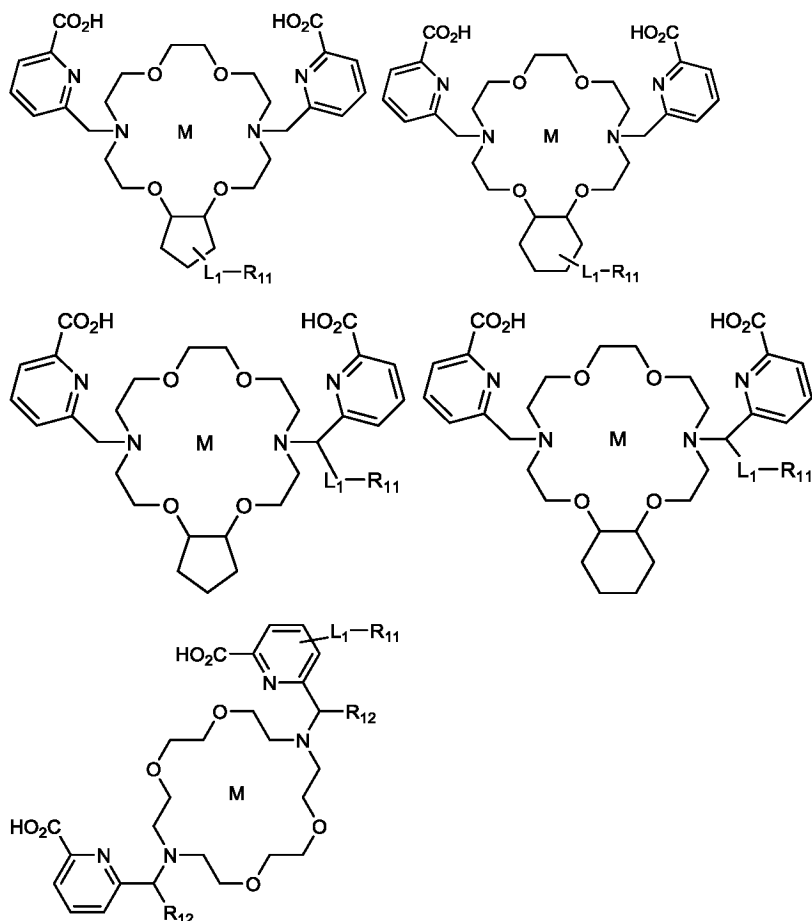
Хелаторы и комплексы радиоактивных металлов изобретения также можно использовать при получении сайт-специфических радиоактивно меченных полипептидов, например, антител. Способы радиоактивного мечения, описанные в настоящем документе, облегчают сайт-специфическое получение радиоактивных иммуноконъюгатов, используя преимущества известных способов для сайт-специфического введения азидных групп в антитела (Li, X., et al. Preparation of well-defined antibody-drug conjugates through glycan remodeling and strain-promoted azide-alkyne cycloadditions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014. 53(28): p. 7179-82; Xiao, H., et al., Genetic incorporation of multiple unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013. 52(52): p. 14080-3). Способы присоединения молекул к белкам или антителам сайт-специфическим образом известны в данной области, и любой способ сайт-специфического мечения антител, известный специалистам в данной области, может быть использован в изобретении с учетом данного описания. Примеры способов сайт-специфической модификации антител, приемлемых для использования в изобретении, включают, без ограничений, включение сконструированных остатков цистеина (например, THIOMAB™), применение неприродных аминокислот или гликанов (например, селеноцистеина, p-AcPhe, формилглицин-образующего фермента (FGE, SMARTag™) и т. д.) и ферментативные способы (например, применение гликотрансферазы, эндогликозидазы, транслугтаминазы микроорганизмов или бактерий (MTG или BTG), сортазы А и т. д.).

В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в получении иммуноконъюгата или радиоактивного иммуноконъюгата изобретения получают путем подгонки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с помощью бактериальной эндогликозидазы, специфической для β -1,4-связи между остатками основного GlcNAc в сайте гликозилирования Fc антитела, например GlycINATOR (Genovis), которая оставляет внутреннюю часть GlcNAc интактной на Fc, что обеспечивает сайт-специфическое включение азидосахаров в этот сайт. Подогнанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут впоследствии реагировать с меченым азидом сахаром, таким как UDP-N-азидоацетилгалактозамин (UDP-GalNAz) или UDP-6-азидо-6-дезоксигалактозамин (UDP-6-deoxy-GalNAc), в присутствии гликозилтрансферазы, такой как галактозилтрансфераза GalT или GalNAc-трансфераза, чтобы таким образом получить модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В других вариантах осуществления модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в получении иммуноконъюгата или радиоактивного иммуноконъюгата изобретения получают путем дегликозилирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента амидазой. Полученное в результате дегликозилированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может впоследствии реагировать с азидамином, предпочтительно 3-азидопропиламином, 6-азидогексиламином или любым азидо-линкер-амином или любым азидо-алкилом/гетероалкилом, таким как азидо-полиэтиленгликоль (ПЭГ)-амин, например, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)тетраэтиленгликоль, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)пентаэтиленгликоль, O-(2-аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоль и т. д., или в присутствии микробной трансглутаминазы, чтобы таким образом получить модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Для получения радиоактивного иммуноконъюгата изобретения можно использовать любой описанный в настоящем документе комплекс радиоактивного металла. В конкретных вариантах осуществления комплекс радиоактивного металла имеет структуру формулы (I-m), формулы (II-m) или формулы (III-m). В конкретных вариантах осуществления комплекс радиоактивного металла имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:

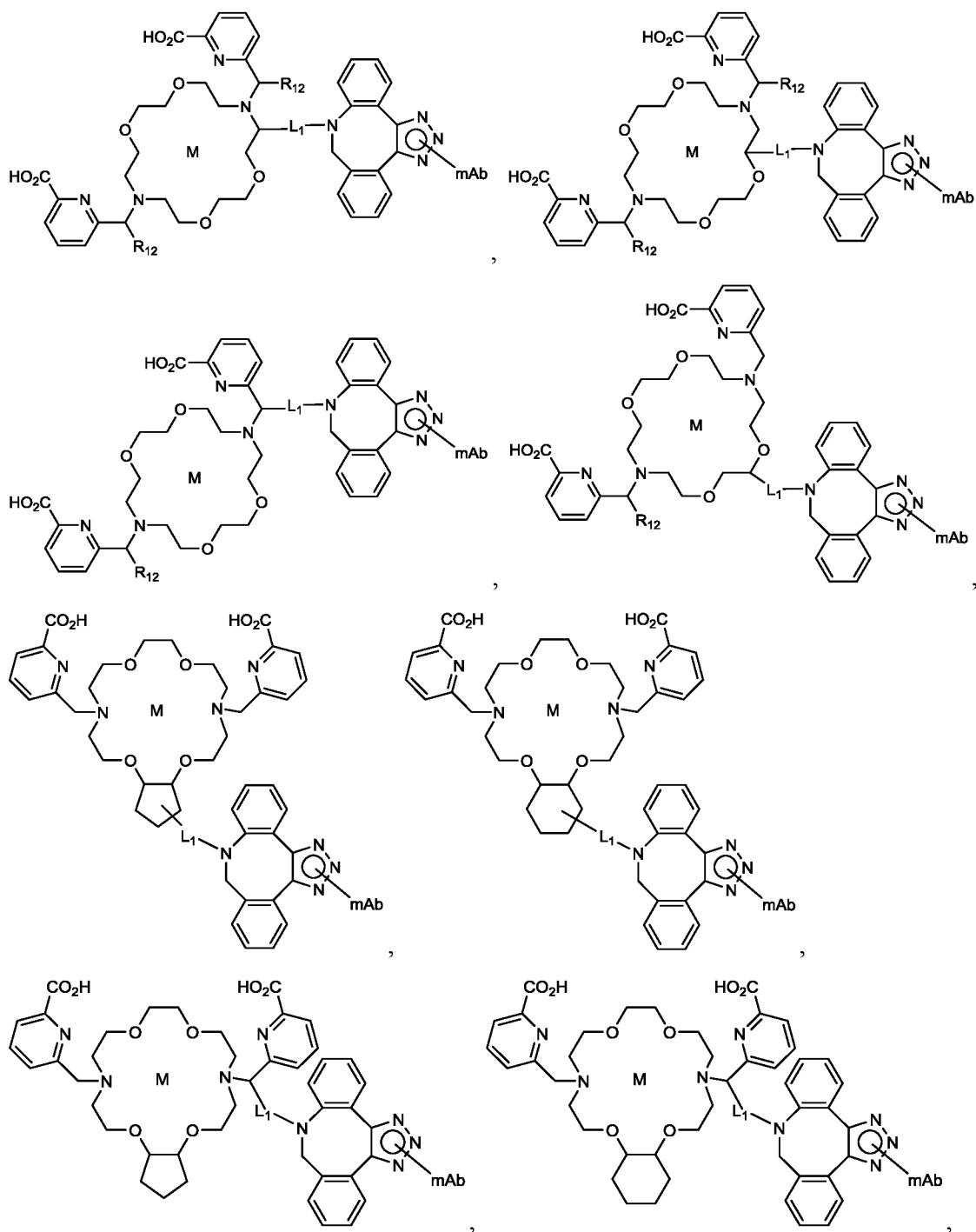


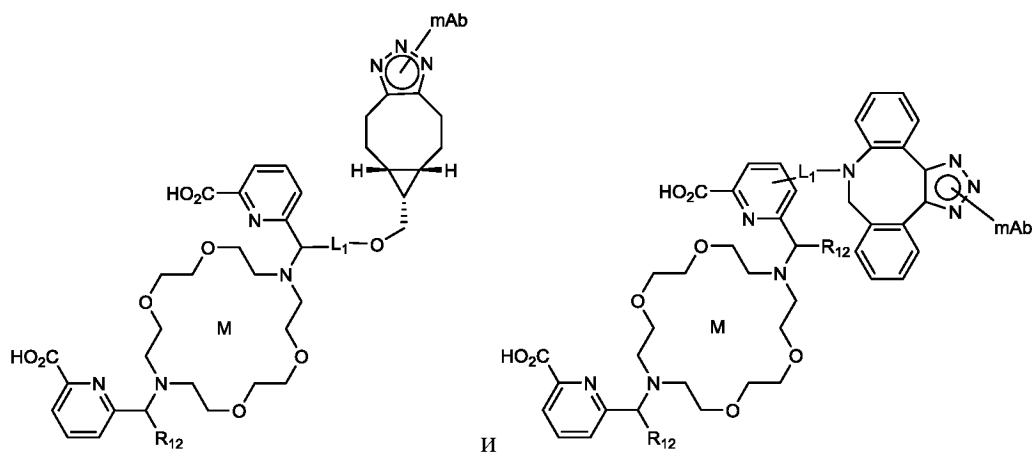


где M представляет собой ион радиоактивного металла, предпочтительно ион
 5 альфа-излучающего радиоактивного металла, более предпочтительно актиний-225
 (^{225}Ac), R_{11} представляет собой циклооктинил или производное циклооктинила, такое
 как бициклононин (BCN), двухфтористый циклооктин (DIFO), дибензоциклооктин
 (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинон (BARAC), дибензоазациклооктин (DIBAC,
 DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктин (DIMAC), дифторбензоциклооктин (DIFBO),
 10 монобензоциклооктин (MOBO) и тетраметокси-дибензоциклооктин (TMDIBO).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий
 фрагмент ковалентно связаны с азидной группой с помощью любого способа
 химической или ферментативной модификации антител и полипептидов, известного
 специалистам в данной области техники с учетом настоящего описания. Меченное
 15 азидом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействует с хелатором
 или комплексом радиоактивного металла изобретения, содержащим алкинильную или
 циклоалкинильную группу, предпочтительно циклооктильную группу и более
 предпочтительно DBCO, в условиях, достаточных для азидо- и алкинильной или
 циклоалкинильной группы для проведения клик-реакции с образованием 1,2,3-
 20 триазольного фрагмента.

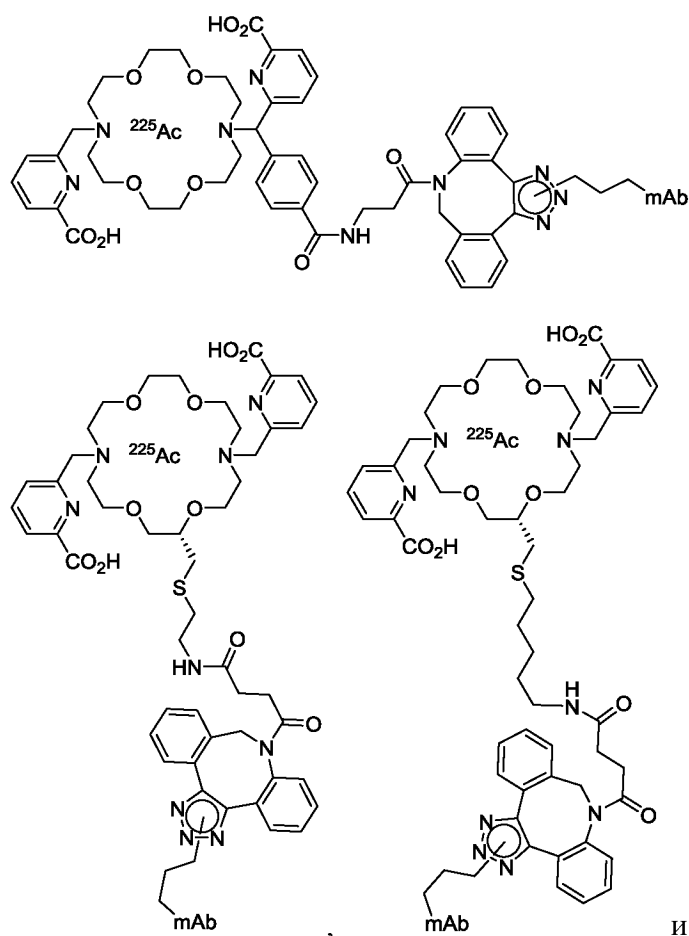
В конкретных вариантах осуществления радиоактивные иммуноконъюгаты заявки включают, без ограничений:

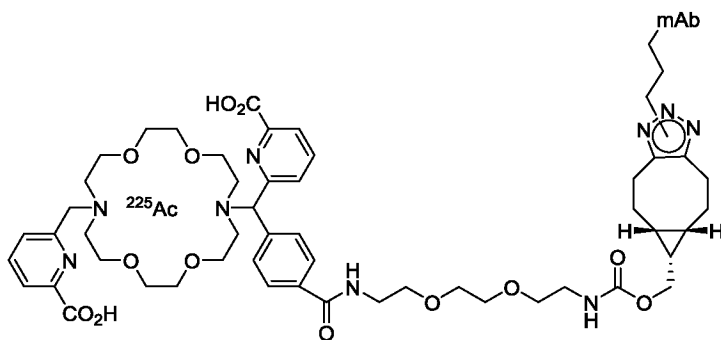




где «mAb» представляет собой антитело или антигенсвязывающий домен (например, Fab из KL2B30); L₁ отсутствует или представляет собой линкер, предпочтительно представляет собой линкер; каждый R₁₂ независимо представляет собой водород, -CH₃ или -CH₂CH₃ при условии, что по меньшей мере один R₁₂ представляет собой -CH₃ или -CH₂CH₃; и M представляет собой альфа-излучающий радионуклид, предпочтительно ²²⁵Ac.

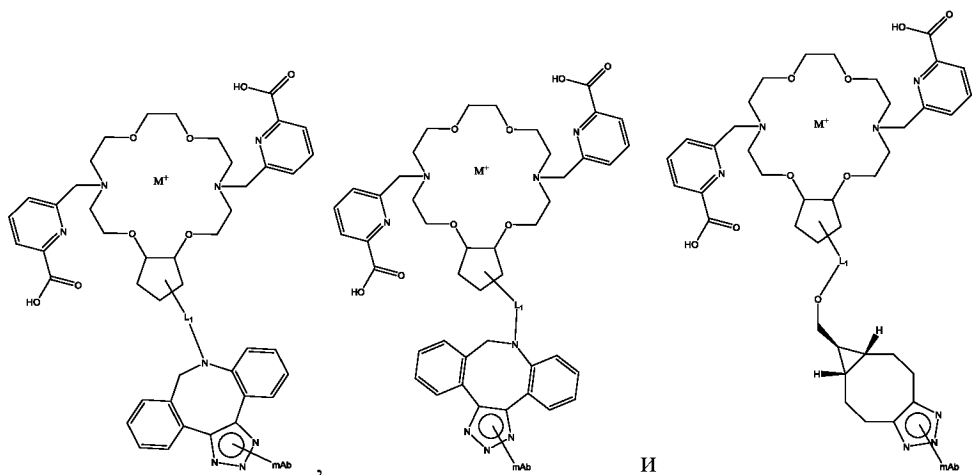
Примеры радиоактивных иммуноконъюгатов заявки включают без ограничений:





причем термин «мАт» предпочтительно относится к антителу или антигенсвязывающему домену, который обладает специфичностью связывания с hK2, например Fab из KL2B30, или иным образом описан в данном документе.

5 В определенных вариантах осуществления радиоактивный иммуноконъюгат представляет собой одну или более структур, независимо выбранных из группы, состоящей из:



И

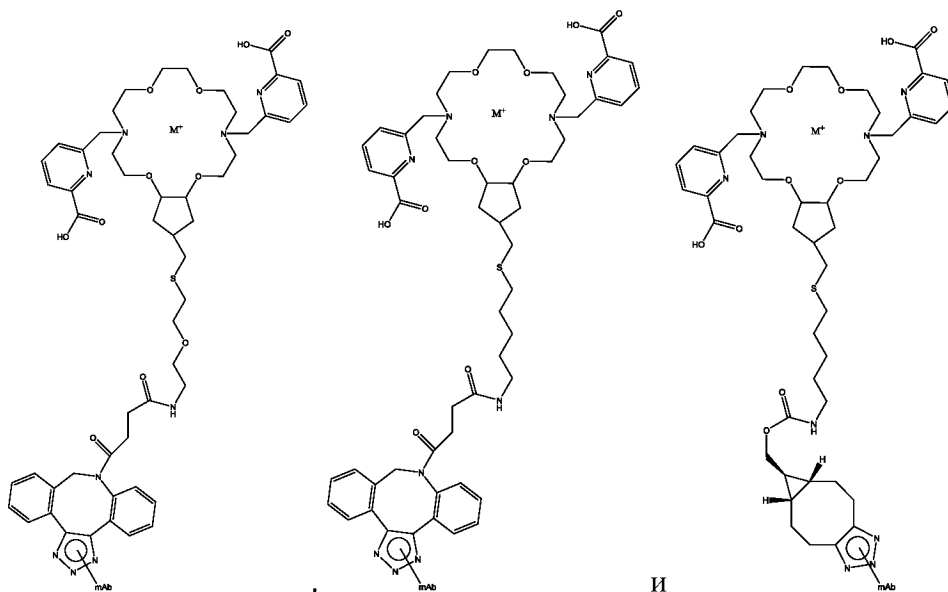
10 где:

M^+ представляет собой ион радиоактивного металла, причем M^+ выбран из группы, состоящей из следующих: актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{223}Ra), висмут-213 (^{213}Bi), свинец-212 ($^{212}\text{Pb(II)}$ и/или $^{212}\text{Pb(IV)}$), тербий-149 (^{149}Tb), тербий-152 (^{152}Tb), тербий-155 (^{155}Tb), фермий-255 (^{255}Fm), торий-227 (^{227}Th), торий-226 ($^{226}\text{Th}^{4+}$), астат-211 (^{211}At), церий-134 (^{134}Ce), неодим-144 (^{144}Nd), лантан-132 (^{132}La), лантан-135 (^{135}La) и уран-230 (^{230}U);

L_1 отсутствует или представляет собой линкер; и
 причем термин «мАт» предпочтительно относится к антителу или антигенсвязывающему домену, который обладает специфичностью связывания с hK2, например Fab из KL2B30, или иным образом описан в данном документе.

20

В другом варианте осуществления радиоактивный иммуноконъюгат представляет собой одну или более структур, независимо выбранных из группы, состоящей из:



и , причем

термин «mAb» предпочтительно относится к антителу или антигенсвязывающему домену, который обладает специфичностью связывания с hK2, например Fab из KL2B30, или иным образом описан в данном документе.

Радиоактивные иммуноконъюгаты, полученные способами, описанными в настоящем документе, могут быть проанализированы с использованием способов, известных специалистам в данной области техники с учетом настоящего описания. Например, анализ методом ЖХ/МС может быть использован для определения соотношения хелатора и меченого полипептида, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; аналитическую эксклюзионную хроматографию можно использовать для определения олигомерного состояния полипептидов и конъюгатов полипептида, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; радиохимический выход можно определить с помощью мгновенной тонкослойной хроматографии (например, БТСХ-СГ), а радиохимическую чистоту можно определить с помощью эксклюзионной ВЭЖХ.

Фармацевтические композиции и способы применения

В еще одном общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей хелатор, комплекс радиоактивного металла, иммуноконъюгат, или радиоактивный иммуноконъюгат изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может содержать один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит комплекс радиоактивного металла изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

5 В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит радиоактивный иммуноконъюгат изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

10 В настоящем документе термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, 15 который не оказывают негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с конкретными вариантами осуществления с учетом данного описания в изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в 20 фармацевтической композиции на основе антитела или на основе радиоактивного комплекса.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в настоящем документе, могут иметь состав, благодаря которому они приемлемы для предполагаемого способа введения субъекту. Например, композиции, 25 описанные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы они были приемлемыми для парентерального введения, например внутривенного, подкожного, внутримышечного или внутриопухолевого введения.

В других общих аспектах изобретение относится к способам селективного воздействия на неопластические клетки для лучевой терапии и лечения 30 неопластических заболеваний или расстройств. В способах изобретения можно использовать любой из радиоактивных комплексов или радиоактивных иммуноконъюгатов и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе.

«Новообразование» представляет собой аномальную массу ткани, которая приводит к чрезмерному делению клеток или отсутствию их естественного отмирания. Новообразования могут быть доброкачественными (не являются раком) или злокачественными (являются раком). Новообразование также называют опухолью.

5 Неопластическое заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, связанное с новообразованием, такое как рак. Примеры неопластического заболевания или расстройства включают, без ограничений, диссеминированные злокачественные новообразования и солидные злокачественные опухоли.

10 Согласно варианту осуществления способ лечения рака предстательной железы (например, метастатического рака предстательной железы или метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы) у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту терапевтически эффективного количества радиоактивного иммуноконъюгата, описанного в настоящем документе, причем
15 радиоактивный иммуноконъюгат содержит комплекс радиоактивного металла, как описано в настоящем документе, конъюгированный с антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с hK2, например Fab из KL2B30.

В варианте осуществления изобретения способ селективного воздействия на неопластические клетки для лучевой терапии включает введение субъекту,
20 нуждающемуся в этом, радиоактивного иммуноконъюгата или фармацевтической композиции изобретения.

В варианте осуществления изобретения способ лечения неопластического заболевания или расстройства включает в себя введение субъекту радиоактивного иммуноконъюгата или фармацевтической композиции изобретения.

25 В варианте осуществления изобретения способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту радиоактивного иммуноконъюгата или фармацевтической композиции изобретения.

Радиоактивные иммуноконъюгаты переносят излучение непосредственно в, например, клетки и т. д., подлежащие воздействию антигенсвязывающего домена.

30 Предпочтительно радиоактивные иммуноконъюгаты несут ионы альфа-излучающих радиоактивных металлов, такие как ^{225}Ac . При нацеливании альфа-частицы ионов альфа-излучающих радиоактивных металлов, например ^{225}Ac и его дочерних частей, доставляются к целевым клеткам и вызывают цитотоксический эффект; таким образом,

они селективно воздействуют на неопластические клетки для лучевой терапии и/или лечения неопластического заболевания или расстройства.

В настоящем изобретении также предусмотрены подходы предварительного воздействия для селективного воздействия на неопластические клетки для лучевой
5 терапии и/или лечения неопластического заболевания или расстройства. В соответствии с подходом предварительного нацеливания меченное азидом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дозируют, они связываются с клетками, несущими целевой антиген антитела, и могут быть удалены из кровотока со временем или с помощью очищающего агента. Затем вводят радиоактивный комплекс
10 изобретения, предпочтительно радиоактивный комплекс, содержащий циклооктин или производное циклооктина, например, DBCO, и подвергают реакции SPAAC с меченым азидом антителом, связанным в целевом участке, тогда как оставшийся несвязанный радиоактивный комплекс быстро удаляется из кровотока. Эта методика предварительного нацеливания обеспечивает способ усиления локализации ионов
15 радиоактивного металла в целевом участке у субъекта.

В других вариантах осуществления модифицированный полипептид, например, меченное азидом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и радиоактивный комплекс изобретения вводят субъекту, нуждающемуся в нацеленной лучевой терапии или лечении неопластического заболевания или расстройства, в той же композиции или
20 в разных композициях.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество радиоактивного иммуноконъюгата или фармацевтической композиции изобретения вводят субъекту для лечения неопластического заболевания или расстройства, например рака.

В других вариантах осуществления изобретения радиоактивные
25 иммуноконъюгаты и фармацевтические композиции изобретения можно применять в комбинации с другими агентами, которые эффективны для лечения неопластических заболеваний или расстройств.

Кроме того, для применения в селективном воздействии на неопластические клетки для лучевой терапии и/или лечения неопластического заболевания или
30 расстройства, и/или для диагностики неопластического заболевания или расстройства обеспечены радиоактивные иммуноконъюгаты и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе; и применению радиоактивного иммуноконъюгата или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, в производстве лекарственного средства для селективного воздействия на

неопластические клетки для лучевой терапии и/или лечения неопластического заболевания или расстройства.

ПРИМЕРЫ

Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают изобретение и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Синтез хелаторов и иммуноконъюгатов (примеры 1–21)

Способы синтеза для вариантов осуществления хелаторов, описанных в настоящем документе, представлены, например, в WO2020/229974, которая включена в настоящий документ путем ссылки. Дополнительные способы синтеза представлены в PCT/IB2021/060350, которая включена в настоящий документ путем ссылки, и ниже в примерах 1–21.

В примерах 1–21 некоторые продукты синтеза перечислены как выделенные в виде остатка. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «остаток» не ограничивает физическое состояние, в котором выделен продукт, и может включать, например, твердое вещество, масло, пену, смолу, сироп и т. п.

В описании, в частности на схемах и в примерах, используют следующие сокращения, перечисленные в таблице А.

Таблица А. Сокращения

АДФ	=	Аденозиндифосфат
Метка Alexa633	=	Гидразидная метка Alexa Fluor® 633 (ThermoFisher)
BSA	=	Бычий сывороточный альбумин
ACN или MeCN	=	Ацетонитрил
АТФ	=	Аденозинтрифосфат
BINAP	=	(2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил)
Brij™-35	=	Полиэтиленгликоля гексадециловый эфир
DVCO	=	Дибензоциклооктил
DCM	=	Дихлорметан
DIPEA или DIEA	=	Диизопропилэтиламин
DMF	=	N,N-диметилформамид
DMSO	=	Диметилсульфоксид
DPPF или dppf	=	1,1'-Бис(дифенилфосфино)ферроцен

DTPA	=	Диэтилентриаминпентауксусная кислота
DTT	=	Дитиотриэтол
EDTA	=	Этилендиаминтетрауксусная кислота
eGFR	=	Оценочная скорость гломерулярной фильтрации
EtOH	=	Этанол
среда F12	=	Питательная среда Gibco® F12 (ThermoFisher)
FBS	=	Эмбриональная бычья сыворотка
G418	=	Сульфат Geneticin® (G418)
GFR	=	Скорость гломерулярной фильтрации
GLP-1	=	Глюкагоноподобный пептид 1
GRK2	=	Сопряженная с G-белком рецепторная киназа 2
HATU	=	1-[Бис(диметиламино)метил-1Н-1,2,3-триазоло[4,5- <i>b</i>]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат
HBSS	=	Сбалансированный солевой раствор Хэнкса GIBCO®
HEPES	=	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперизинэтансульфоная кислота
ВЭЖХ	=	Высокоэффективная жидкостная хроматография
HTRF	=	Гомогенная флуоресценция с временным разрешением
IFG	=	Нарушение уровня глюкозы натощак
IGT	=	Нарушенная переносимость глюкозы
ЖХМС или ЖХ/МС	=	Жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
LDA	=	Диизопропиламид лития
LiHMDS	=	Бис(триметилсилил)амид лития
MeOH	=	Метанол
мезил или Ms	=	Метилсульфонил (т. е. $-\text{SO}_2-\text{CH}_3$)
мезилат или OMs	=	Метансульфонат (т. е. $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{CH}_3$)
MOM	=	Метоксиметил
Ms или мезил	=	$-\text{SO}_2-\text{CH}_3$
MsCl	=	Мезилхлорид (т. е. $\text{CH}_3-\text{SO}_2-\text{Cl}$)
NaBH(OAc) ₃	=	Триацетоксиборгидрид натрия
NAFLD	=	Неалкогольная жировая дистрофия печени

Na ₂ SO ₄	=	Сульфат натрия
NASH	=	Неалкогольный стеатогепатит
NBS	=	N-бромсукцинимид
NH(PMB) ₃	=	трис(4-метоксибензил)-λ ⁴ -азан
NMO	=	4-метилморфолин N-оксид
NMP	=	N-метил-2-пирролидон
ЯМР	=	Ядерный магнитный резонанс
OMs или мезилат	=	Метансульфонат (т. е. -O-SO ₂ -CH ₃)
OTf или трифлат	=	Трифторметансульфонат
OTs или тозилат	=	п-Толуолсульфонат
Pd/C	=	Палладий на углеродном носителе
Pd(dba) ₂	=	Трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0)
Pd(dppf)Cl ₂	=	[1,1'-Бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорид палладий(II)
Pd(dppf)Cl ₂ •CHCl ₃	=	[1,1'-Бис(дифенилфосфино)ферроцен]хлорпалладий в комплексе с хлороформом
(1-nap) ₃ P или P(1-nap) ₃	=	Три(1-нафтил)фосфин
Pd(OAc) ₂	=	Ацетат палладия (II)
Pd(OH) ₂	=	Гидроксид палладия
Pd(OH) ₂ /C	=	Гидроксид палладия на угле (катализатор Перлмана)
Pd(PPh ₃) ₄	=	Тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0)
ПЭГ	=	Полиэтиленгликоль
PMB	=	4-Метоксибензиловый простой эфир
PPh ₃	=	Трифенилфосфин
SNS	=	Симпатическая нервная система
TBAB	=	Тетра-н-бутиламмония бромид
TBAF	=	Тетра-н-бутиламмония фторид
TBAI	=	Тетра-н-бутиламмония иодид
TBSOTf	=	<i>Трет</i> -бутилдиметилсилилтрифторметансульфонат
TEA	=	Триэтиламин
Tf или трифил	=	Трифторметилсульфонил (т. е. -SO ₂ -CF ₃)
TFA	=	Трифторуксусная кислота
ТГФ	=	Тетрагидрофуран

THP	=	2-Тетрагидропиранил
ТСХ	=	Тонкослойная хроматография
TMS	=	Триметилсилил
TMSN ₃	=	Триметилсилилазид
Тозилат или OTs	=	<i>p</i> -Толуолсульфонат
ТОРА	=	6,6'-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота = H2bp18c6
Ts или тозил	=	<i>n</i> -Толуолсульфонилхлорид
<i>n</i> -TsCl	=	<i>n</i> -Толуолсульфонилхлорид
Tween-20®	=	Неионный детергент (Sigma Aldrich)

В контексте настоящего документа, если не указано иное, термин «выделенная форма» означает, что соединение присутствует в форме, которая отделена от любой смеси твердых веществ с иным (-ыми) соединением (-ями), системы растворителей или биологической среды. В варианте осуществления настоящего изобретения любое из соединений, описанных в настоящем документе, присутствует в выделенной форме.

В контексте настоящего документа, если не указано иное, термин «по существу чистая форма» означает, что мольный процент примесей в выделенном соединении составляет менее около 5 мольных процентов, предпочтительно менее около 2 мольных процентов, более предпочтительно менее около 0,5 мольного процента, наиболее предпочтительно менее около 0,1 мольного процента. В варианте осуществления настоящего изобретения соединение формулы (I) присутствует по существу в чистой форме.

В контексте настоящего документа, если не указано иное, термин «по существу не-их) солевой (-ых) формы (форм) в выделенном основании формулы (I) составляет менее около 5 мольных процентов, предпочтительно менее около 2 мольных процентов, более предпочтительно менее около 0,5 мольного процента, наиболее предпочтительно менее около 0,1 мольного процента. В варианте осуществления настоящего изобретения соединение формулы (I) присутствует в форме, по существу не содержащей соответствующую (-ие) солевую (-ые) форму (-ы).

Пример 1

4-((6-(Метоксикарбонил) пиридин-2-ил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизаациклооктадекан-7-ил)метил)бензойная кислота
(ТОРА-[С-7]-аенилкарбоновая кислота)

5

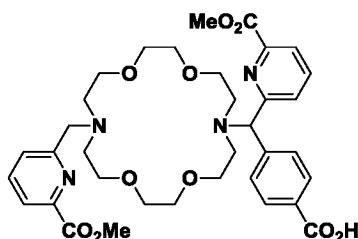
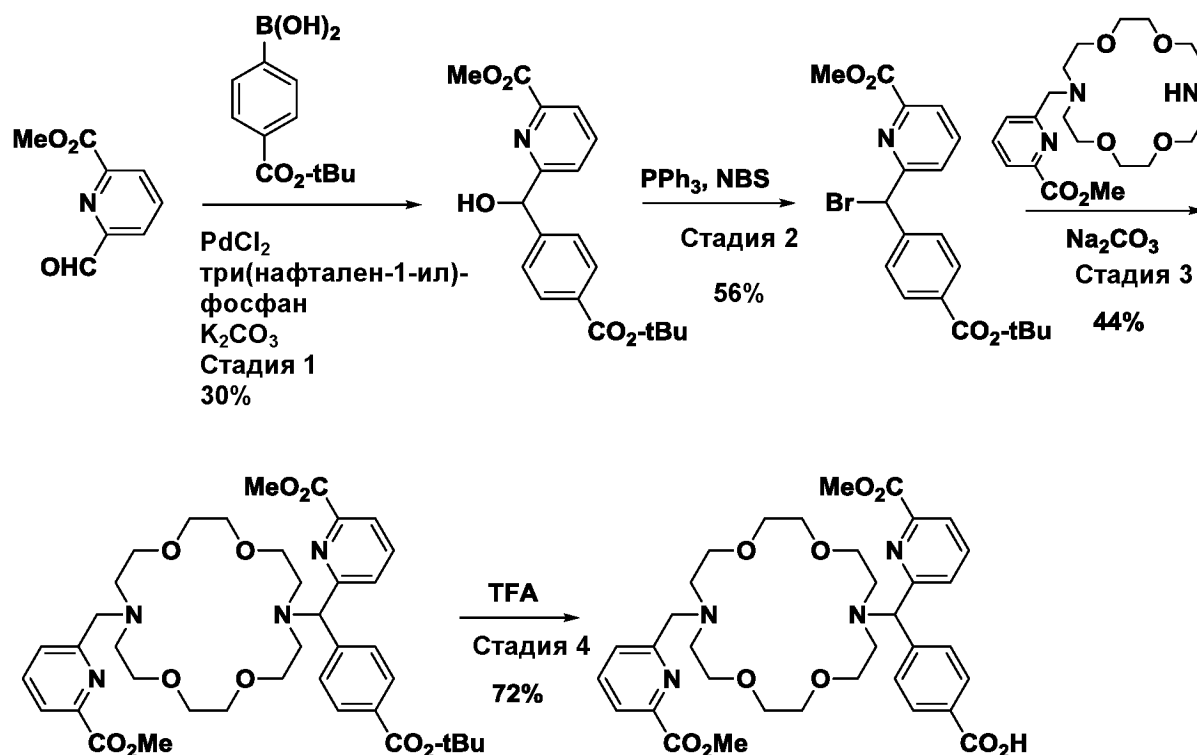


Схема 1



- 10 **Стадия 1.** К смеси метил-6-формилпиколината (4,00 г, 24,2 ммоль), (4-(*трет*-
бутоксикарбонил)фенил)бороновой кислоты (10,7 г, 48,5 ммоль), PdCl₂ (0,21 г, 1,2
ммоль), три(нафтаден-1-ил)фосфина (0,50 г, 1,2 ммоль) и карбоната калия (10,0 г, 72,7
ммоль) в атмосфере азота при -78 °С в трехгорлую круглодонную колбу объемом 500
мл добавляли тетрагидрофуран (100 мл) одной порцией. Смесь продували азотом и
15 перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, впоследствии нагревали
при 65 °С в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры,
фильтровали через слой целита и фильтрат концентрировали досуха. Неочищенный

продукт очищали хроматографией на силикагеле (0–50% EtOAc/петролейный эфир) с получением метил-6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)(гидрокси)метил)пиколината в виде желтого масла (2,5 г, выход 30%).

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)(гидрокси)метил)пиколинат (2,50 г, 7,30 ммоль), pPh_3 (3,43 г, 13,1 ммоль), N-бромсукцинимид (2,13 г, 12,0 ммоль) и дихлорметан (30 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота при комнатной температуре и перемешивали в течение 1 ч. Реакционный раствор загружали на колонку с силикагелем и путем хроматографии (0–30% EtOAc/петролейный эфир) получали соединение метил 6-(бром(4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)метил)пиколинат (1,65 г, выход 56%) в виде желтого масла.

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, метил 6-(бром(4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)метил)пиколинат (1,52 г, 3,69 ммоль), метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (1,50 г, 3,69 ммоль), Na_2CO_3 (1,17 г, 11,1 ммоль) и ацетонитрил (30 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл и полученную гетерогенную смесь нагревали при 90 °С в течение 16 ч в атмосфере азота. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через слой целита и концентрировали досуха в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали хроматографией на силикагеле (0–10% MeOH/дихлорметан) с получением метил 6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината в виде коричневого масла (1,2 г, 44%).

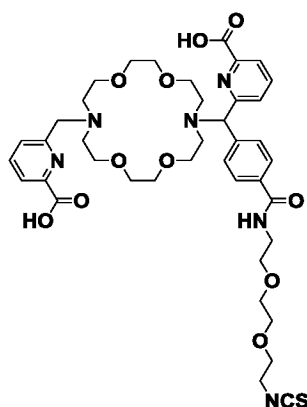
Стадия 4. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (1,2 г, 1,6 ммоль), TFA (0,62 мл, 8,1 ммоль) и DCM (20 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл при комн. темп. и перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали досуха и полученный неочищенный продукт подвергали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 (19 X 150 мм) 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением ТОРА-[С-7]-фенилкарбоновой кислоты (0,8 г, 72%) в виде коричневого масла. ЖХ-МС АРСІ: рассчитанное для $C_{35}H_{44}N_4O_{10}$ 680,31; наблюдаемое m/z $[M+H]^+$ 681,5. чистота по ЖХ-МС: 99,87%. Чистота по ВЭЖХ: 97,14% (97,01% при 210 нм, 97,20% при 254 нм и 97,21% при 280 нм; колонка:

Atlantis dC18 (250 X4,6 мм), 5 мкм; подвижная фаза А: 0,1% ТФА в воде, подвижная фаза В: ацетонитрил; расход: 1,0 мл/мин %. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,12–8,07 (м, 4H), 8,00–7,98 (м, 2H), 7,75–7,73 (м, 4H), 6,10 (с, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,96 (с, 3H), 3,91 (с, 3H), 3,82 (с, 8H), 3,56 (с, 8H), 3,52 (с, 8H).

5

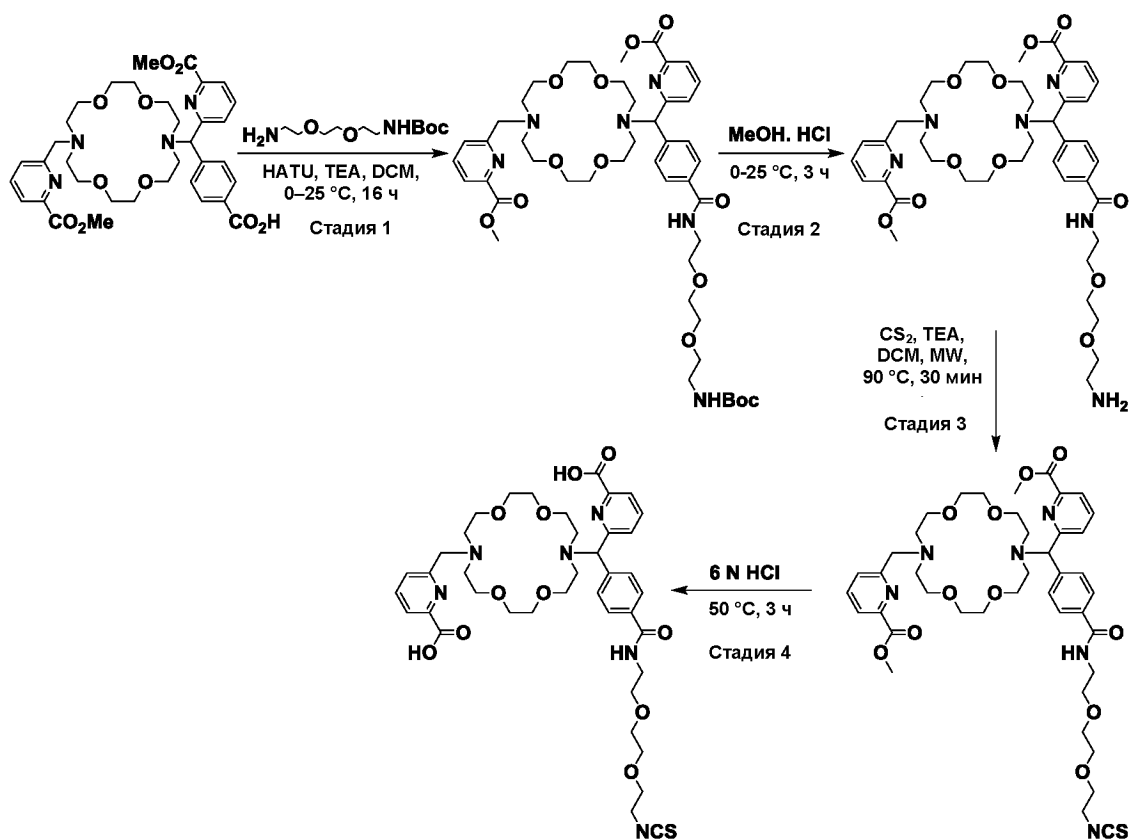
Пример 2

6-((16-((6-Карбоксипиридин-2-ил)(4-((2-(2-изотиоцианатоэтокс)этокс)этил)карбамоил)фенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота



10

Схема 2



- Стадия 1.** Якорь магнитной мешалки, 4-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)бензойную кислоту (0,40 г, 0,60 ммоль), *трет*-бутил (2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамат (0,15 г, 0,60 ммоль), триэтиламин (0,18 г, 0,76 ммоль), NATU (0,33 г, 0,90 ммоль) и DCM (4,0 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С в атмосфере азота. Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали водой (10 мл) и экстрагировали дихлорметаном (10 мл × 3). Объединенные экстракты промывали 10% водным раствором NaHCO₃ (10 мл), соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением масла, которое очищали хроматографией на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением метил 6-((4-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (0,18 г).
- Стадия 2.** Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,18 г, 0,20 ммоль), MeOH (1,8 мл) и HCl в метаноле (4 М, 1,0 мл, 4,0 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную колбу объемом 10 мл при 0 °С, впоследствии нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества удаляли в вакууме с получением метил 6-((4-((2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (0,15 г), который использовали без очистки.
- Стадия 3.** Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,10 г, 0,12 ммоль), триэтиламин (37 мг, 0,37 ммоль), безводный DCM (2 мл) и дисульфид углерода (14 мг, 0,18 ммоль) добавляли в выдерживающий давление сосуд при комнатной температуре в атмосфере азота. Сосуд подвергали микроволновому облучению (150 Вт) при 90 °С в течение 30 мин. Впоследствии сосуд охлаждали до комнатной температуры, реакцию смесь разбавляли дихлорметаном (10 мл), а затем последовательно промывали водой (5 мл), 1 М HCl (5 мл) и водой (5 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением метил 6-

((4-((2-(2-(2-изотиоцианатоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (100 мг), который использовали без очистки.

Стадия 4. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((2-(2-(2-изотиоцианатоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,10 г, 0,12 ммоль) и водный раствор HCl (6 N, 0,4 мл, 2,34 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную колбу объемом 10 мл и перемешивали при 50 °C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали в вакууме досуха с получением масла, которое очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением 6-((16-((6-карбокспиридин-2-ил)(4-((2-(2-(2-изотиоцианатоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновой кислоты (5,0 мг). ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для C₄₀H₅₂N₆O₁₁S: 824,34; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 824,8. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD): δ 8,22–8,20 (м, 2H), 8,14–8,05 (м, 2H), 7,94 (д, J = 8,00 Гц, 2H), 7,79 (д, J = 8,00 Гц, 2H), 7,73–7,67 (м, 2H), 6,16 (с, 1H), 4,77 (с, 2H), 3,93–4,00 (м, 8H), 3,59–3,70 (м, 27H), 3,47–3,44 (м, 2H).

Пример 3

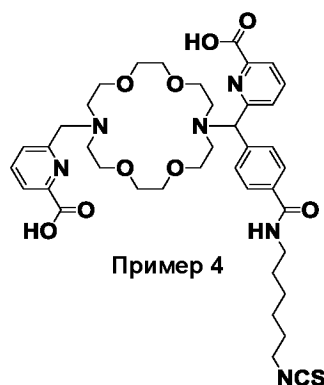
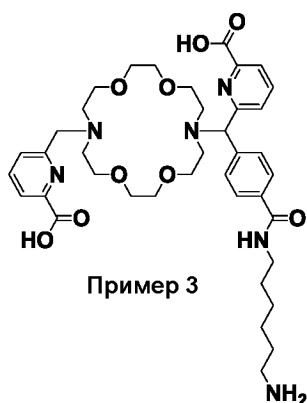
6-((4-((6-Аминогексил)карбамоил)фенил)(16-((6-карбоксипиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота

и

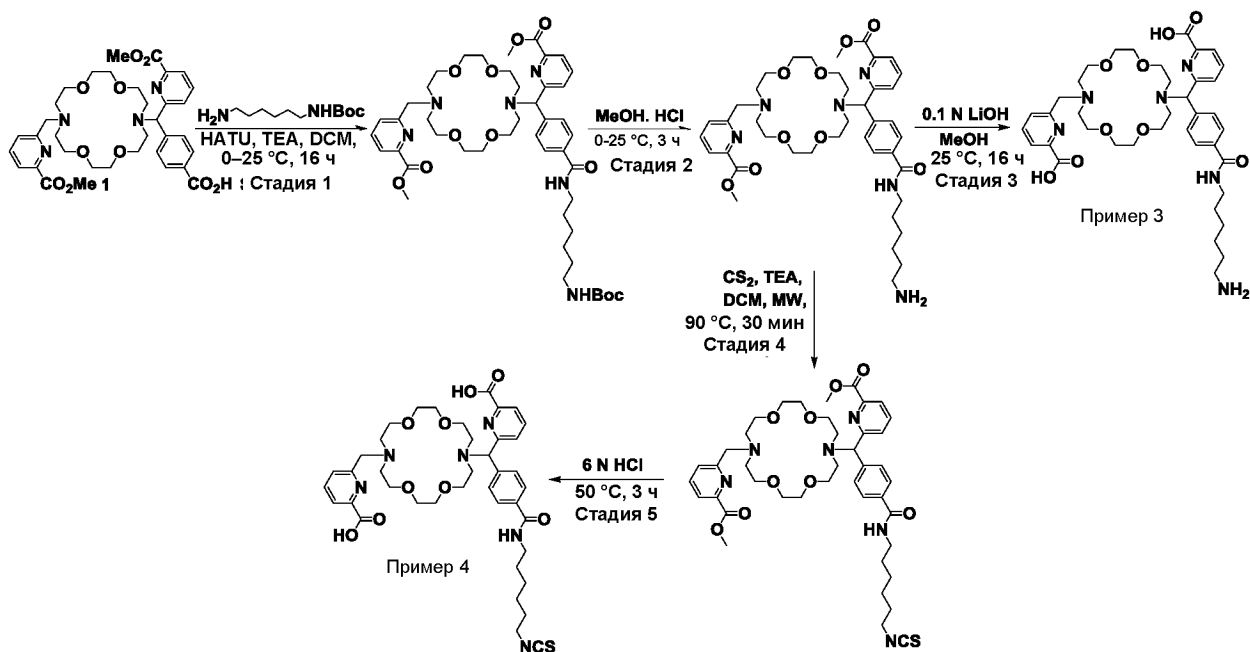
5

Пример 4

6-((16-((6-Карбоксипиридин-2-ил)(4-((6-изотиоцианатогексил)карбамоил)фенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота



10

Схема 3

15 **Стадия 1.** Якорь магнитной мешалки, 4-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)метил)бензойную кислоту (0,12 г, 0,18 ммоль), *трет*-бутил (6-

аминогексил)карбамат (38 мг, 0,18 ммоль), триэтиламин (54 мг, 0,54 ммоль), НАТУ (0,10 г, 0,27 ммоль) и DCM (4,0 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С в атмосфере азота. Реакционную смесь впоследствии доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь впоследствии обрабатывали водой (10 мл) и экстрагировали дихлорметаном (10 мл × 3). Объединенные экстракты промывали 10% водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением масла. Масло очищали хроматографией на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением метил 6-((4-((6-((мет-
 5 бутоксикарбонил)амино)гексил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-
 10 2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (70 мг) в виде клейкого масла.

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((6-((мет-
 15 бутоксикарбонил)амино)гексил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-
 2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (70 мг, 0,080 ммоль), MeOH (1,5 мл) и HCl в метаноле (4 M, 0,4 мл, 1,6 ммоль) добавляли в круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С, которую затем доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества удаляли в вакууме с
 20 получением 6-((4-((6-аминогексил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (30 мг), который использовали без очистки.

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((6-
 25 аминогексил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-
 1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (30 мг, 0,038 ммоль), водный LiOH (1,1 мл, 0,1 N, 0,11 ммоль) и MeOH (1,0 мл) добавляли в реакционный сосуд объемом 8 мл и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Впоследствии реакционную смесь доводили уксусной кислотой до pH ~6,5 и затем концентрировали досуха в вакууме при комнатной температуре.
 30 Полученный продукт подвергали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 5,0 мкм; подвижная фаза: 10 mM ацетата аммония в смеси вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением **примера 3**: 6-((4-((6-аминогексил)карбамоил)фенил)(16-((6-карбоксопиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-

ил)метил)пиколиновой кислоты (10 мг). ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для $C_{39}H_{54}N_6O_9$; 750,40; наблюдаемое m/z $[M+H]^+$ 751,3. 1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ 8,22 (д, $J = 1,60$ Гц, 2H), 8,21–8,06 (м, 2H), 7,92 (д, $J = 8,40$ Гц, 2H), 7,80 (д, $J = 8,40$ Гц, 2H), 7,75–7,69 (м, 2H), 6,20 (с, 1H), 4,70 (с, 2H), 4,02–3,92 (м, 8H), 3,76–3,62 (м, 14H), 3,51–3,32 (м, 4H), 2,93 (т, $J = 8,00$ Гц, 2H), 1,67–1,64 (м, 4H), 1,46–1,45 (м, 4H).

Стадия 4. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((6-аминогексил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,10 г, 0,13 ммоль), триэтиламин (39 мг, 0,38 ммоль), безводный DCM (2 мл) и дисульфид углерода (15 мг, 0,19 ммоль) добавляли в выдерживающий давление сосуд при комнатной температуре в атмосфере азота. Сосуд подвергали микроволновому облучению (150 Вт) при 90 °С в течение 30 мин. Впоследствии сосуд охлаждали до комнатной температуры и реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (10 мл), промывали водой (5 мл), 1 М HCl (5 мл) и водой (5 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха с получением метил 6-((4-((6-изотиоцианатогексил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (0,1 г), который использовали без очистки.

Стадия 5. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((6-изотиоцианатогексил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,10 г, 0,12 ммоль) и водный раствор HCl (6 Н, 0,4 мл, 2,4 ммоль) добавляли в одностороннюю круглодонную колбу объемом 10 мл, впоследствии перемешивали при 50 °С в течение 3 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали досуха в вакууме с получением остатка, который очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 3,5 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 2,0 мл/мин) с получением **примера 4:** 6-((16-((6-карбоксопиридин-2-ил)(4-((6-изотиоцианатогексил)карбамоил)фенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновой кислоты (15 мг). ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для $C_{40}H_{52}N_6O_9S$: 792,35; наблюдаемое m/z $[M+H]^+$ 792,8. 1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ 8,23–8,20 (м, 2H), 8,15–8,06 (м, 2H), 7,92 (д, $J =$

8,40 Гц, 2H), 7,79 (д, $J = 8,40$ Гц, 2H), 7,74–7,68 (м, 2H), 6,17 (с, 1H), 4,77 (с, 2H), 4,01–3,93 (м, 8H), 3,75–3,56 (м, 16H), 3,42–3,33 (м, 5H), 1,74–1,64 (м, 4H), 1,50–1,44 (м, 4H).

Пример 5

5 6-((16-((6-Карбоксипиридин-2-ил)(4-((4-изотиоцианатофенэтил)карбамоил)фенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота

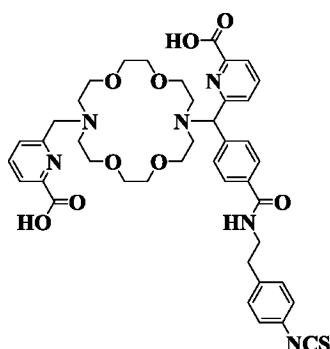
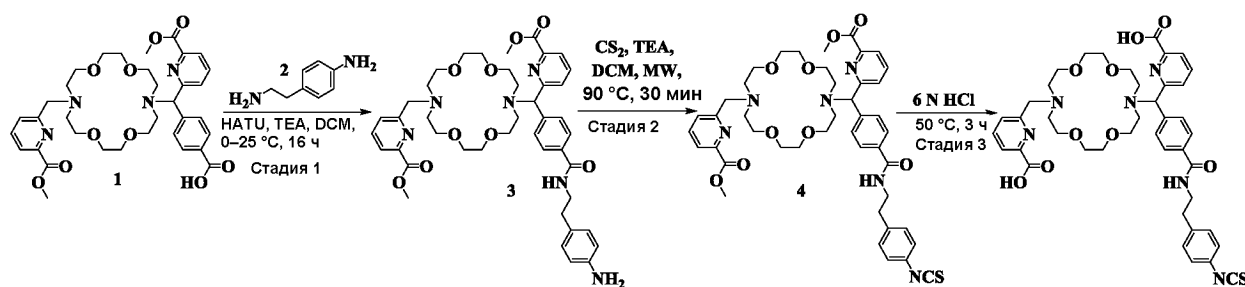


Схема 4



10 **Стадия 1.** Якорь магнитной мешалки, 4-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)бензойную кислоту (0,25 г, 0,37 ммоль), 4-(2-аминоэтил)анилин (60 мг, 0,37 ммоль), TEA (0,11 г, 0,15 мл, 1,1 ммоль), HATU (0,21 г, 0,55 ммоль), и DCM (5 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и впоследствии обрабатывали водой (10 мл) и экстрагировали дихлорметаном (10 мл x3). Объединенные экстракты промывали 10% водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением продукта, который очищали хроматографией на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением метил 6-((4-((4-аминофенэтил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (0,12 г).

15

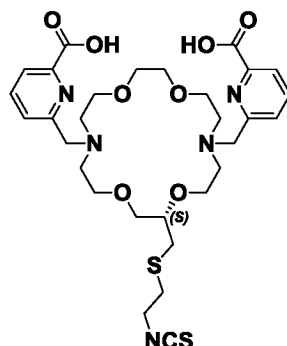
20

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((4-аминофенэтил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,12 г, 0,15 ммоль), ТЕА (45 мг, 65 мкл, 0,45 ммоль), DCM (3 мл) и CS₂(17 мг, 0,23 ммоль) добавляли в выдерживающий давление сосуд для микроволновой обработки объемом 10 мл при комнатной температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь подвергали микроволновому облучению (150 Вт) при 90 °С в течение 30 мин. Впоследствии реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли дихлорметаном (10 мл), промывали последовательно водой (5 мл), 1 М HCl (5 мл) и водой (5 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха с получением метил 6-((4-((4-изотиоцианатофенэтил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (0,12 г), который использовали без очистки.

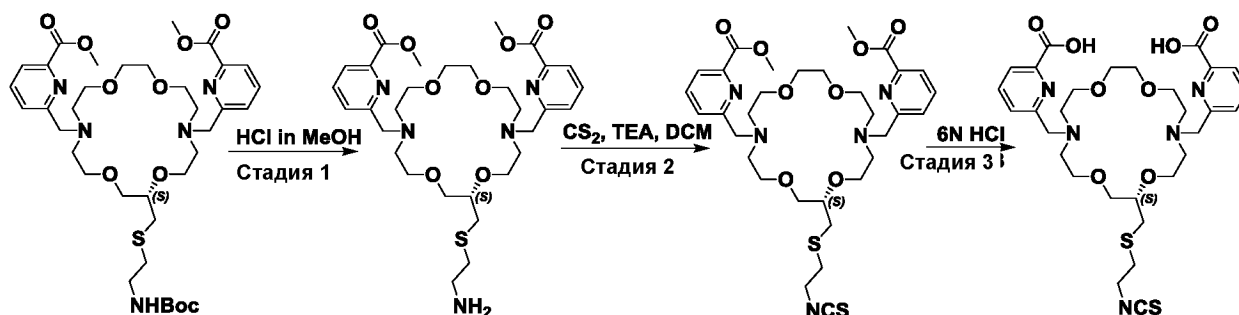
Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-((4-изотиоцианатофенэтил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,12 г, 0,14 ммоль), и водную HCl (0,50 мл, 6 Н, 2,8 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную колбу объемом 10 мл и перемешивали при 50 °С в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали досуха в вакууме и неочищенный продукт подвергали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением 6-((16-((6-карбокиспиридин-2-ил)(4-((4-изотиоцианатофенэтил)карбамоил)фенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновой кислоты (30 мг). ЖХ-МС APC1: рассчитано для C₄₂H₄₈N₅O₁₀S; 812,32; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 812,9. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD): δ 8,22 (д, J = 0,80 Гц, 2H), 8,06–8,21 (м, 2H), 7,85 (д, J = 8,40 Гц, 2H), 7,68–7,78 (м, 4H), 7,31 (д, J = 8,40 Гц, 2H), 7,21 (д, J = 2,00 Гц, 2H), 6,18 (с, 1H), 4,77 (с, 2H), 3,70–4,00 (м, 7H), 3,60–3,67 (м, 16H), 3,44–3,49 (м, 2H), 2,90–3,10 (м, 3H).

Пример 6

(*S*)-6,6'-((2-(((2-Изоотиоцианатоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота



5

Схема 5

10

Стадия 1. Якорь магнитной мешалки, соединение **1** (метил 6-((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат) (0,10 г, 0,15 ммоль), MeOH (0,5 мл) и HCl в метаноле (4 М, 0,6 мл, 4,0 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С, а впоследствии доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества удаляли в вакууме с получением диметил 6,6'-((2-(((2-аминоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(*S*)-дипиколинат (55 мг), который использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-аминоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(*S*)-дипиколинат (50 мг, 0,10 ммоль), триэтиламин (24 мг, 0,24 ммоль), DCM (2 мл) и дисульфид углерода (12 мг, 0,16 ммоль) добавляли в сосуд для микроволновой обработки при

комнатной температуре в атмосфере азота. Сосуд подвергали микроволновому облучению (мощность 150 Вт) при 90 °С в течение 30 мин. Впоследствии сосуд охлаждали до комнатной температуры и реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (10 мл), последовательно промывали водой (5 мл), 1 М HCl (5 мл),

5 водой (5 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, концентрировали досуха и подвергали хроматографии на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением диметил 6,6'-((2-(((2-изотиоцианатоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-

10 изотиоцианатоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (20 мг, 0,030 ммоль) и водный раствор HCl (6 Н, 0,1 мл, 0,6 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную колбу объемом 10 мл и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме и полученный остаток подвергали препаративной

15 ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 (19 X 150 мм) 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением (S)-6,6'-((2-(((2-изотиоцианатоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновой кислоты (6 мг). ЖХ-МС APCI: рассчитано для C₃₀H₄₁N₅O₈S₂: 663,24; наблюдаемое *m/z* [M+H]⁺ 664,2. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ 9,78 (с, 1H), 8,10 (с, 4H), 7,78 (д, *J* = 6,00 Гц, 2H), 4,69 (с, 4H), 3,96–3,52 (м, 23H), 2,85 (т, *J* = 6,40 Гц, 2H), 2,70 (т, *J* = 8,00 Гц, 2H).

20

Пример 7

(S)-6,6'-((2-(((5-Изоцианатопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
25 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота

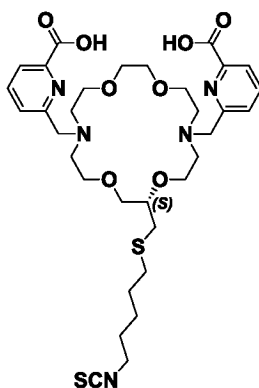
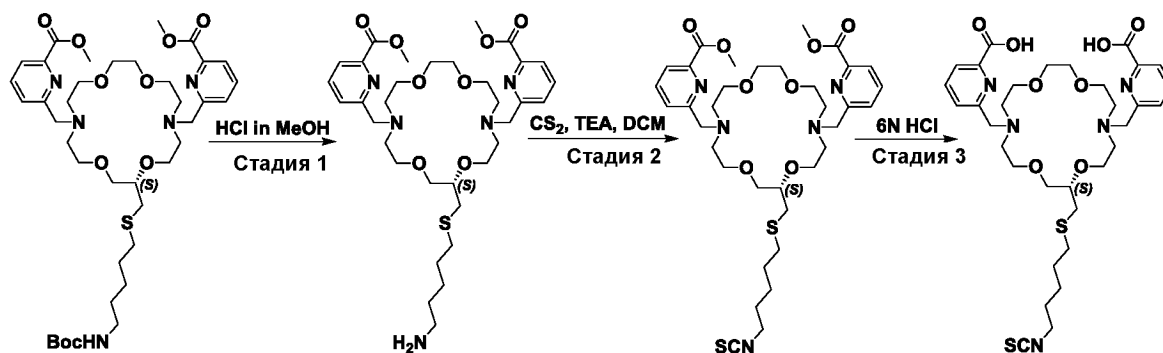


Схема 6

Стадия 1. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-
 5 бутоксикарбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 г, 0,15 ммоль),
 MeOH (0,5 мл) и HCl в метаноле (4 М, 0,6 мл, 4,0 ммоль) добавляли в одnogорлую
 круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С, а впоследствии доводили до комнатной
 температуры и перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества впоследствии удаляли в
 10 вакууме с получением диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-
 тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (70 мг),
 который использовали без очистки.

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-
 1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат
 15 (70 мг, 0,10 ммоль), триэтиламин (20 мг, 0,20 ммоль), безводный DCM (2 мл) и
 дисульфид углерода (15 мг, 0,20 ммоль) добавляли в сосуд для микроволновой
 обработки при комнатной температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь
 подвергали микроволновому облучению (мощность 150 Вт) при 90 °С в течение 30
 мин. Сосуд доводили до комнатной температуры и реакционную смесь разбавляли
 20 дихлорметаном (10 мл), последовательно промывали водой (5 мл), 1 М HCl (5 мл) и
 водой (5 мл), сушили над безводным сульфатом натрия (Na₂SO₄), фильтровали и
 концентрировали досуха с получением остатка. Остаток подвергали хроматографии на
 силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением диметил 6,6'-((2-(((5-
 25 изотиоцианатопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7,16-
 диил)бис(метилен))(S)-дипиколината в виде желтого твердого вещества (30 мг).

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((5-
 изотиоцианатопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7,16-
 диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (30 мг, 0,040 ммоль) и водный раствор HCl (6 Н,

0,2 мл, 0,8 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную колбу объемом 10 мл и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме и концентрат очищали с помощью ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением (S)-6,6'-((2-(((5-изотиоцианатопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновой кислоты (12 мг). ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для $C_{33}H_{47}N_5O_8S_2$: 705,29; наблюдаемое m/z $[M+H]^+$ 706,2. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 13,40 (с, 1H), 9,90 (с, 1H), 8,17–8,09 (м, 4H), 7,78 (д, $J = 6,80$ Гц, 2H), 4,70 (с, 4H), 3,93–3,17 (м, 27H), 2,68–2,67 (м, 2H), 1,64–1,60 (м, 2H), 1,53–1,49 (м, 2H), 1,40–1,38 (м, 2H).

Пример 8

(S)-6,6'-((2-(((2-(2-(4-Изоотиоцианатофенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота

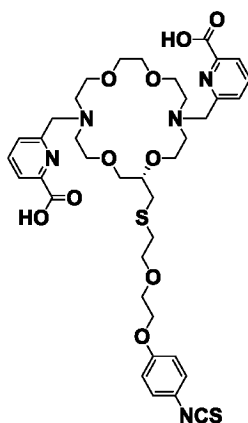
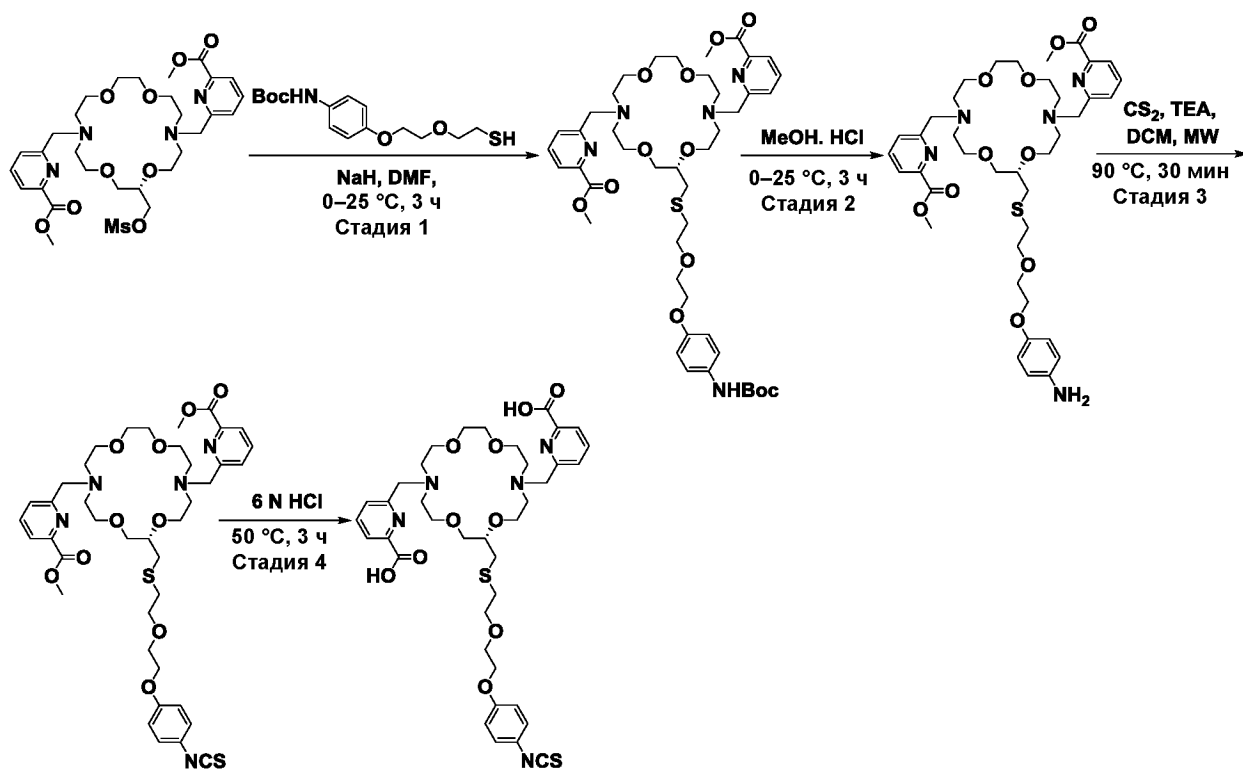
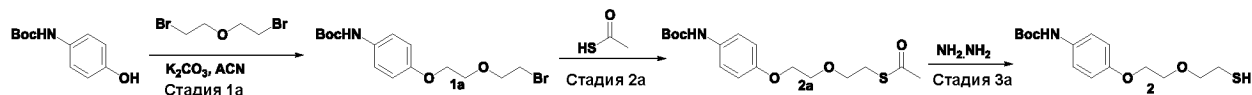


Схема 7**Схема 7а**

5

Схема 7а, стадия 1а. Якорь магнитной мешалки, *трет*-бутил (4-

гидроксифенил)карбамат (4,5 г, 22 ммоль), 1-бром-2-(2-бромэтокси)этан (5,0 г, 22 ммоль), K_2CO_3 (4,6 г, 43 ммоль) и ACN (45 мл) добавляли в трехгорлую

10 круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота и полученную реакционную смесь нагревали при $80\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 16 ч в атмосфере азота. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через Celite^\circledR и концентрировали

15 досуха в вакууме с получением концентрата, который очищали хроматографией на силикагеле (0–20% EtOAc /петролейный эфир) с получением продукта *трет*-бутил (4-(2-(2-бромэтокси)этокси)фенил)карбамата (2,0 г).

Стадия 2а. Якорь магнитной мешалки, *трет*-бутил (4-(2-(2-

бромэтокси)этокси)фенил)карбамат (2,0 г, 5,6 ммоль), этанэтиовую *S*-кислоту (0,42 г, 5,6 ммоль), K_2CO_3 (1,5 г, 11 ммоль) и ACN (50 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота. Реакционную смесь

перемешивали при 80 °С в течение 2 ч и впоследствии охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через Celite® и концентрировали досуха в вакууме.

Концентрат очищали с использованием хроматографии на нейтральном оксиде алюминия (0–50% EtOAc/петролейный эфир) с получением (*S*)-2-(2-(4-((*трет*-
5 бутоксикарбонил)амино)фенокси)этокси)этил)этантоата (1,8 г).

Стадия 3а. Якорь магнитной мешалки, *S*-2-(2-(4-((*трет*-

бутоксикарбонил)амино)фенокси)этокси)этил)этантоат (1,8 г, 5,1 ммоль), этанол (20
мл) и гидразина моногидрат (0,24 г, 0,24 мл, 7,6 ммоль) добавляли в одnogорлую
10 круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота и перемешивали при 80 °С в
течение 1 ч. Реакционную смесь впоследствии охлаждали до комнатной температуры и
концентрировали досуха в вакууме с получением концентрата, который очищали с
помощью хроматографии на силикагеле (5–10% EtOAc/петролейный эфир) с
получением *трет*-бутил (4-(2-(2-меркаптоэтокси)этокси)фенил)карбамата (0,5 г) в виде
бесцветного масла.

Схема 7, стадия 1. Раствор, состоящий из *трет*-бутил (4-(2-(2-

меркаптоэтокси)этокси)фенил)карбамата (0,40 г, 1,0 ммоль) и DMF (3,0 мл), добавляли
по каплям в течение 5 минут в трехгорлую круглодонную колбу объемом 50 мл,
содержащую суспензию гидрида натрия (0,060 г, 60% в минеральном масле, 1,5 ммоль)
в DMF (3,0 мл) при 0 °С и в атмосфере азота. После завершения добавления

20 реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали 15 минут.

Смесь повторно охлаждали до 0 °С и добавляли по каплям раствор, содержащий
диметил 6,6'-((2-(((метилсульфонил)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(*S*)-дипиколинат (0,5 г, 0,7 ммоль) и
DMF (3,0 мл). После завершения добавления реакционную смесь медленно нагревали

25 до комнатной температуры и перемешивали в течение 1,5 ч. Реакционную смесь
медленно обрабатывали насыщ. NH₄Cl (0,2 мл), а впоследствии концентрировали
досуха с получением масла. Масло очищали посредством препаративной ВЭЖХ

(колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси
вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(4-

30 ((*трет*-бутоксикарбонил)амино)фенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-
7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(*S*)-дипиколината (0,15 г) в виде
коричневого масла.

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(4-((*трет*-

бутоксикарбонил)амино)фенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-

диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,15 г, 0,16 ммоль), MeOH (1,0 мл) и HCl в метаноле (4 М, 0,80 мл, 3,2 ммоль) добавляли в одногорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С и впоследствии доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 ч. Летучие вещества удаляли в вакууме с
 5 получением диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(4-аминофенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (0,12 г), который использовали без очистки.

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(4-

10 аминофенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 г, 0,15 ммоль), триэтиламин (46 мг, 0,46 ммоль), безводный DCM (3 мл) и дисульфид углерода (17 мг, 0,22 ммоль) добавляли в выдерживающий давление сосуд при комнатной температуре в атмосфере азота.

Реакционную смесь подвергали микроволновому облучению (мощность 150 Вт) при 90 °С в течение 30 мин. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и
 15 разбавляли дихлорметаном (10 мл), последовательно промывали водой (5 мл), 1 М HCl (5 мл) и водой (5 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха с получением диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(4-изотиоцианатофенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 г), который использовали без очистки.

20 **Стадия 4.** Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(4-

изотиоцианатофенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 г, 0,15 ммоль) и водный раствор HCl (6 Н, 0,51 мл, 3,1 ммоль) добавляли в одногорлую круглодонную колбу объемом 10 мл и перемешивали при 50 °С в течение 3 ч. Реакционную смесь

25 охлаждали до комнатной температуры, концентрировали досуха в вакууме и концентрат очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением (S)-6,6'-((2-(((2-(2-(4-

изотиоцианатофенокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-

30 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновой кислоты (40 мг, 37%).

ЖХ-МС APCi: рассчитано для C₃₈H₄₉N₅O₁₀S₂: 799,29; наблюдаемое *m/z* [M+H]⁺ 799,9.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 8,23–8,20 (м, 2H), 8,15–8,09 (м, 2H), 7,74–7,71 (м, 2H), 7,19 (д, *J* = 8,80 Гц, 2H), 6,92 (д, *J* = 9,20 Гц, 2H), 4,81 (с, 2H), 4,77 (с, 2H), 4,09–4,11 (м, 4H), 3,92–3,95 (м, 6H), 3,79 (т, *J* = 4,00 Гц, 3H), 3,66–3,71 (м, 16H), 2,70–2,76 (м, 4H).

Пример 9

(S)-6,6'-((2-(((2-(2-(2-(4-Изоотиоцианатофенокси)этокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота

5

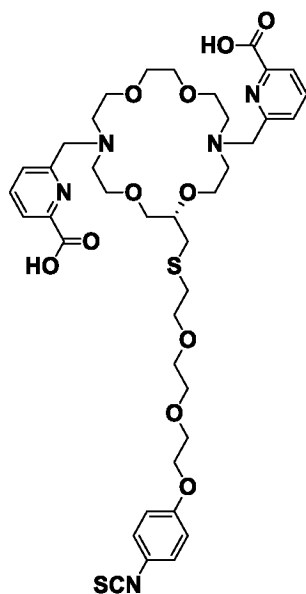
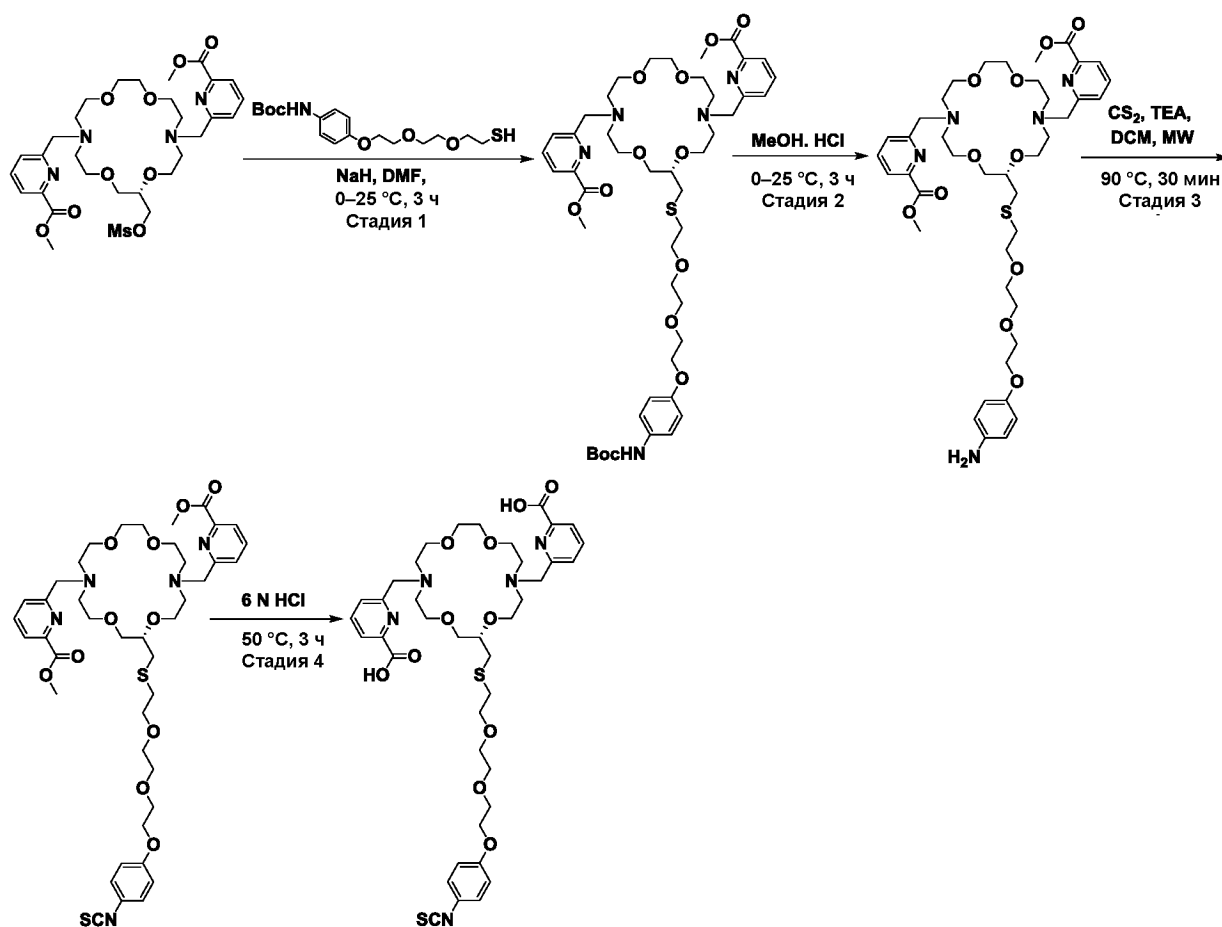
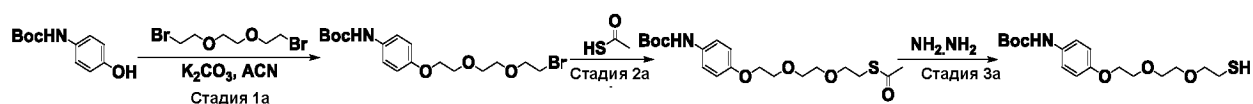


Схема 8**Схема 8а**

5

Схема 8а, стадия 1а. Якорь магнитной мешалки, трет-бутил (4-гидроксифенил)карбамат (3,5 г, 17 ммоль), 1,2-бис(2-бромэтокси)этан (4,6 г, 17 ммоль), K_2CO_3 (4,6 г, 33 ммоль) и ACN (40 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл и впоследствии перемешивали при $80\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 48 ч в атмосфере азота. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через Celite® и концентрировали досуха в вакууме с получением концентрата, который очищали хроматографией на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением *трет*-бутил (4-(2-(2-(2-бромэтокси)этокси)этокси)фенил)карбамат (4,0 г) в виде коричневого масла.

10

15

Стадия 2а. Якорь магнитной мешалки, *трет*-бутил (4-(2-(2-(2-бромэтокси)этокси)этокси)фенил)карбамат (4,0 г, 9,9 ммоль), этантиоевую S-кислоту

(0,75 г, 9,9 ммоль), K₂CO₃ (2,7 г, 20 ммоль) и ACN (50 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота и реакционную смесь нагревали при 60 °С в течение 2 ч в атмосфере азота. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через Celite®, концентрировали досуха в вакууме и концентрат очищали с помощью алюмооксидной хроматографии (0–50% EtOAc/петролейный эфир) с получением *S*-(2-(2-(2-(4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)фенокси)этокси)этокси)этил)этантаноата (3,0 г) в виде коричневого масла.

Стадия 3а. Якорь магнитной мешалки, *S*-(2-(2-(2-(4-((*трет*-

бутоксикарбонил)амино)фенокси)этокси)этокси)этил)этантаноат (3,0 г, 7,5 ммоль), этанол (50 мл) и гидразин моногидрат (0,36 г, 0,36 мл, 11 ммоль) добавляли в одностороннюю круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота и перемешивали при 80 °С в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали досуха в вакууме и концентрат очищали хроматографией на силикагеле (5–10% EtOAc/петролейный эфир) с получением *трет*-бутил (4-(2-(2-(2-меркаптоэтокси)этокси)этокси)фенил)карбамата (1,0 г) в виде бесцветного масла.

Схема 7, стадия 1. Раствор, состоящий из *трет*-бутил (4-(2-(2-(2-

меркаптоэтокси)этокси)этокси)фенил)карбамата (0,40 г, 1,0 ммоль) и DMF (3,0 мл), добавляли по каплям в течение 5 минут в трехгорлую круглодонную колбу объемом 50 мл, содержащую суспензию гидрида натрия (0,060 г, 60% в минеральном масле, 1,5 ммоль) в DMF (3,0 мл) при 0 °С в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь доводили до комнатной температуры и перемешивали непрерывно 15 минут. Смесь повторно охлаждали до 0 °С и добавляли по каплям раствор, состоящий из диметил 6,6'-((2-(((метилсульфонил)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-

7,16-дiazациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(*S*)-дипиколината (0,5 г, 0,7 ммоль) и DMF (3,0 мл) в течение 10 минут. После завершения добавления реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1,5 ч. Впоследствии реакционную смесь медленно обрабатывали насыщ. водным раствором NH₄Cl (0,2 мл) и концентрировали досуха с получением масла. Масло очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 (19 X 150 мм) 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(2-(4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)фенокси)этокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-

7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (0,15 г, 21%) в виде коричневого масла.

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(2-(4-((трет-
 бутоксикарбонил)амино)фенокси)этоксид)этоксид)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-
 5 7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,15 мг, 0,16
 ммоль), MeOH (1,0 мл) и HCl в метаноле (4 M, 0,80 мл, 3,2 ммоль) добавляли в
 одnogорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °C. Реакционную смесь
 оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 ч.
 Летучие вещества удаляли в вакууме с получением диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(2-(4-
 10 аминофеноксид)этоксид)этоксид)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (0,12 г), который
 использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(2-(4-
 аминофеноксид)этоксид)этоксид)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 15 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 г, 0,14 ммоль),
 триэтиламин (44 мг, 0,43 ммоль), безводный DCM (5 мл) и дисульфид углерода (17 мг,
 0,22 ммоль) добавляли в сосуд для микроволновой обработки при комнатной
 температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь подвергали микроволновому
 облучению (мощность 150 Вт) при 90 °C в течение 30 мин. Впоследствии реакцию смесь
 20 охлаждали до комнатной температуры, разбавляли дихлорметаном (10 мл),
 последовательно промывали водой (5 мл), 1 M HCl (5 мл) и водой (5 мл), сушили над
 безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха с получением диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(2-(2-
 (4-изотиоцианатофеноксид)этоксид)этоксид)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 25 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 г), который
 использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия 4. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((2-(2-(2-(4-
 изотиоцианатофеноксид)этоксид)этоксид)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 мг, 0,14 ммоль) и
 водный раствор HCl (6 N, 0,50 мл, 2,8 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную
 30 колбу объемом 10 мл и перемешивали при 50 °C в течение 3 ч. Реакционную смесь
 охлаждали до комнатной температуры, концентрировали досуха в вакууме с
 получением остатка, который очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18
 19 X 150 мм 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход:
 15,0 мл/мин) с получением (S)-6,6'-((2-(((2-(2-(2-(4-

изотиоцианатофенокси)этокси)этокси)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновой кислоты (50 мг). ЖХ-МС
 АРСІ: рассчитано для $C_{40}H_{53}N_5O_{11}S_2$: 843,32; наблюдаемое $m/z [M+H]^+$ 843,9. 1H ЯМР
 (400 МГц, CD_3OD) δ 8,24–8,21 (м, 2H), 8,21–8,11 (м, 2H), 7,74 (д, $J = 7,60$ Гц, 2H), 7,23–
 7,20 (м, 2H), 6,97–6,95 (м, 2H), 4,84–4,79 (м, 5H), 4,14–4,12 (м, 4H), 3,97–3,94 (м, 6H),
 3,83–3,59 (м, 23H), 2,75–2,67 (м, 4H).

Пример 10

10 6-((4-((2-(2-(2-Аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-карбоксопиридин-2-
 ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая
 кислота

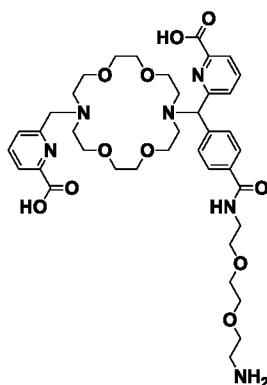
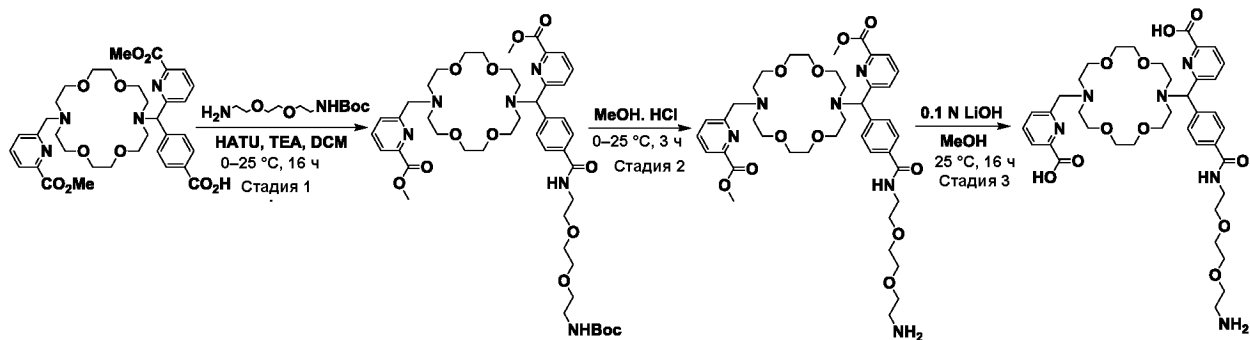


Схема 9



15

Стадия 1. Якорь магнитной мешалки, 4-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)(16-((6-
 (метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-
 7-ил)метил)бензойную кислоту (0,40 г, 0,60 ммоль), *трет*-бутил-(2-(2-(2-
 аминоэтокси)этокси)этил)карбамат (0,15 г, 0,60 ммоль), триэтиламин (0,18 г, 0,76
 20 ммоль), HATU (0,33 г, 0,90 ммоль) и DCM (4,0 мл) добавляли в трехгорлую
 круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °C в атмосфере азота. Смесь перемешивали в
 течение ночи при комнатной температуре, разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали

дихлорметаном (10 мл x 3). Объединенные экстракты промывали 10% водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и соевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением концентрата, который очищали посредством хроматографии на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с
 5 получением метил-6-((4-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (0,18 г).

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, метил-6-((4-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,18 г, 0,20 ммоль), MeOH (1,8 мл) и HCl в метаноле (4 M, 1,0 мл, 4,0 ммоль) добавляли в
 10 одnogорлую круглодонную колбу объемом 10 мл при 0 °C, впоследствии доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества удаляли в
 15 вакууме с получением метил-6-((4-((2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (0,15 г), который использовали без очистки.

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, метил-6-((4-((2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (0,1 г, 0,1 ммоль), водный LiOH (3 мл, 0,1 Н, 0,3 ммоль) и MeOH (1,0 мл) добавляли в
 20 реакционный сосуд объемом 8 мл при комнатной температуре и перемешивали в течение ночи. pH реакционной смеси доводили до ~ 6,5 посредством уксусной кислоты и впоследствии концентрировали досуха в вакууме при комнатной температуре с
 25 получением концентрата, который очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением 6-((4-((2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)(16-((6-карбоксопиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновой кислоты (40
 30 мг). ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для C₃₉H₅₄N₆O₁₁; 782,39; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 783,0.

Пример 11

6,6'-((18-(((2-(2-Аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацicloоктадецин-4,13-
диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота

5

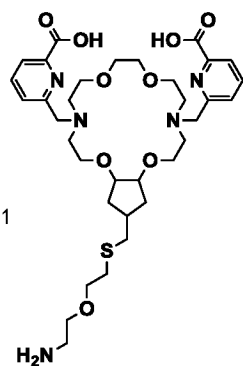
и

Пример 12

N-ацил-DBCO-меченная 6,6'-((18-(((2-(2-аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-
4*H*,13*H*,17*H*-циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацicloоктадецин-4,13-
диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота

10

Пример 11



Пример 12

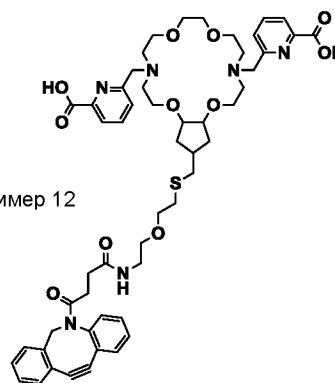
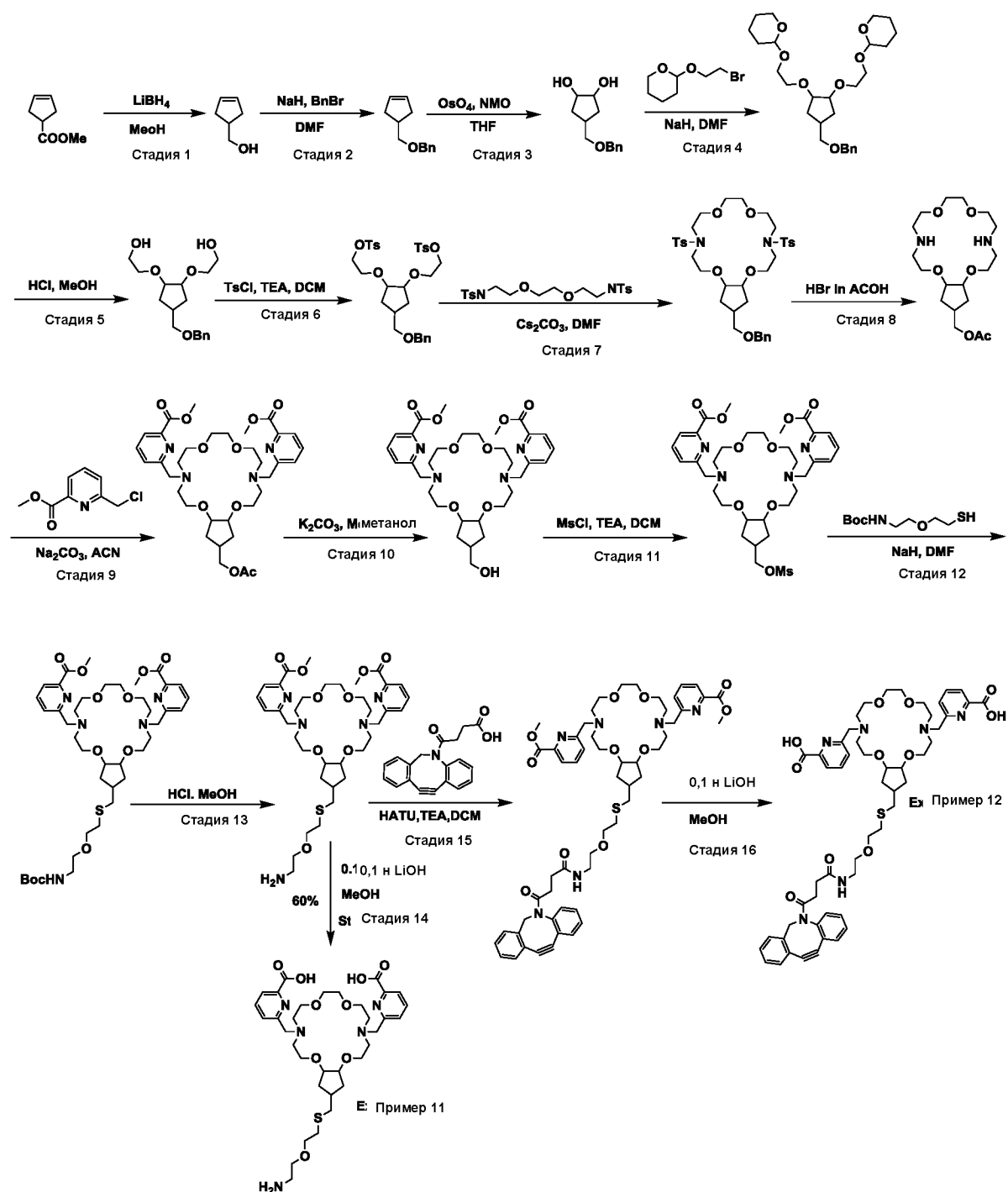


Схема 10



Стадия 1. Якорь магнитной мешалки, метилциклопент-3-ен-1-карбоксилат (25,0 г, 198 ммоль), ТГФ (600 мл), метанол (12,6 г, 16,0 мл, 397 ммоль) и боргидрид лития (198 мл, 2,0 М в ТГФ, 397 ммоль) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 3000 мл при 0 °С. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали при 70 °С в течение 6 ч. Впоследствии реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, медленно обрабатывали ледяной водой (250 мл), охлаждали дополнительно до 0 °С, доводили до pH ~2 посредством 1,5 Н HCl (pH ~2) и

впоследствии экстрагировали DCM (1000 мл x 3). Объединенные экстракты промывали водой (500 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха с получением концентрата, который очищали посредством хроматографии на силикагеле (50–80% EtOAc/петролейный эфир) с получением циклопент-3-ен-1-илметанола (13,8 г).

Стадия 2. Раствор, состоящий из циклопент-3-ен-1-илметанола (13,7 г, 139 ммоль) и DMF (50 мл), по каплям добавляли в течение 30 мин в трехгорлую круглодонную колбу объемом 1000 мл, содержащую суспензию гидрида натрия (6,69 г, 60% в минеральном масле, 167 ммоль) в DMF (50 мл) при 0 °С в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение 30 мин. Смесь впоследствии повторно охлаждали до 0 °С и по каплям обрабатывали в течение 15 мин раствором, состоящим из бензилбромида (19,8 г, 167 ммоль) и DMF (50 мл). После завершения добавления реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и впоследствии перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь медленно обрабатывали насыщ. водным раствором NH_4Cl (50 мл) и впоследствии экстрагировали этилацетатом (1000 мл x 3). Объединенные экстракты промывали водой (500 мл x 3), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха с получением концентрата. Концентрат очищали посредством хроматографии на силикагеле (0–20% EtOAc/петролейный эфир) с получением ((циклопент-3-ен-1-илметокси)метил)бензола (21,0 г).

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, NMO (38,0 г, 50% масс. в H_2O , 158 ммоль), ТГФ (180 мл) и тетроксид осмия (16,2 г, 3,21 мл, 2,5% масс. в *трет*-бутаноле, 0,158 ммоль) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 1000 мл при 0 °С. Реакционную смесь доводили до комнатной температуры, смесь перемешивали в течение 10 мин и повторно охлаждали до 0 °С. После охлаждения смесь по каплям обрабатывали в течение 15 мин раствором ((циклопент-3-ен-1-илметокси)метил)бензола (20,0 г, 158 ммоль) и ТГФ (180 мл). Реакционную смесь доводили до комнатной температуры и смесь перемешивали в течение 16 ч, после чего ее медленно обрабатывали насыщ. водным раствором NaHCO_3 (100 мл) и экстрагировали DCM (1000 мл x 3). Объединенные экстракты промывали водой (500 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха с получением концентрата, который очищали посредством хроматографии на силикагеле (0–20% EtOAc/петролейный эфир) с получением смеси изомеров 4-((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диола в виде

бесцветного масла. Изомеры разделяли посредством СЖХ (прибор: РИС 100; колонка: Chiralpak ОХН (250 x 30) мм, 5 мкм; подвижная фаза: CO₂: 0,5% изопропиламин в IPA (60:40); общий расход: 70 г/мин; противодавление: 100 бар; длина волны: 220 нм; время цикла: 8,0 мин) с получением обоих *цис*-1,2-изомеров 4-

5 ((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диола: первый элюируемый изомер (10 г) и второй элюируемый изомер (5 г).

Стадия 4. Раствор, состоящий из первого элюируемого изомера 4-

10 ((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диола (10,0 г, 45,0 ммоль) и DMF (60 мл), добавляли по каплям в течение 1 ч в трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл, содержащую суспензию гидрида натрия (8,62 г, 60% в минеральном масле, 225 ммоль) в DMF (60 мл) при 0 °С в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь доводили до комнатной температуры и смесь перемешивали в течение 30 мин.

Впоследствии смесь повторно охлаждали до 0 °С и по каплям в течение 15 мин обрабатывали раствором, состоящим из 2-(2-бромэтокси)тетрагидро-2*H*-пирана (47,0 г, 225 ммоль) и DMF (60 мл). После завершения добавления реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч.

15 Впоследствии смесь медленно обрабатывали насыщ. водным раствором NH₄Cl (50 мл) и впоследствии экстрагировали этилацетатом (500 мл x 3). Объединенные экстракты промывали водой (500 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и
20 концентрировали досуха с получением масла, которое очищали посредством хроматографии на силикагеле (0–30% EtOAc/петролейный эфир) с получением 2,2'-(((4-((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(тетрагидро-2*H*-пирана) (21,0 г).

25 **Стадия 5.** Якорь магнитной мешалки, 2,2'-(((4-((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(тетрагидро-2*H*-пиран) (29,0 г, 61,0 ммоль), MeOH (200 мл) и HCl в 1,4-диоксане (4 М, 3,0 мл, 12,0 ммоль) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 1000 мл и впоследствии нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч. Впоследствии колбу охлаждали до комнатной температуры и удаляли летучие вещества в вакууме с получением 2,2'-((4-
30 ((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) (20,0 г) в виде остатка, который использовали без очистки.

Стадия 6. Якорь магнитной мешалки, 2,2'-((4-((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ол) (20,0 г) (20,0 г, 64,4 ммоль), DCM (200 мл) и триэтиламин (32,6 мл, 322 ммоль) добавляли в круглодонную колбу объемом 1000 мл в

атмосфере азота и полученную смесь охлаждали до 10 °С. Впоследствии смесь обрабатывали рTsCl (36,9 г, 193 ммоль), который добавляли порциями, а затем доводили до комнатной температуры. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч, и за это время образовывался осадок.

5 Впоследствии смесь разбавляли DCM (500 мл), промывали холодным водным раствором HCl (1 М, 500 мл x 3) и ледяной водой (500 мл x 2), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением остатка, который очищали посредством хроматографии на силикагеле (0–30% EtOAc/петролейный эфир) с получением ((4-((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-
10 диил)-бис(4-метилбензолсульфоната) (26,0 г).

Стадия 7. Якорь магнитной мешалки, *N,N'*-((этан-1,2-диилбис(окси))бис(этан-2,1-диил))бис(4-метилбензолсульфонамид) (21,0 г, 42,0 ммоль), Cs₂CO₃ (41,3 г, 126 ммоль) и сухой DMF (250 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 2000 мл в атмосфере азота и полученную гетерогенную смесь перемешивали при комнатной
15 температуре в течение 1,5 ч. Впоследствии смесь по каплям обрабатывали раствором, состоящим из ((4-((бензилокси)метил)циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил)-бис(4-метилбензолсульфоната) (26,0 г, 42,0 ммоль) и DMF (250 мл), в течение периода 2 ч. Перемешивание продолжали в течение 20 ч, после чего смесь концентрировали досуха в вакууме с получением пастообразного твердого вещества.
20 Пасту суспендировали в DCM (1000 мл), перемешивали в течение 30 мин и фильтровали посредством вакуумного фильтрования. Фильтрат концентрировали досуха в вакууме с получением концентрата, который очищали посредством хроматографии на силикагеле (0–40% EtOAc/петролейный эфир) с получением 18-((бензилокси)метил)-4,13-дитозилтетрадекагидро-2*H*,11*H*,17*H*-
25 циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацклооктадецина (24 г).

Стадия 8. Раствор HBr (50%, 112 мл, 695 ммоль) в HOAc добавляли в круглодонную колбу объемом 500 мл, содержащую якорь магнитной мешалки и 18-((бензилокси)метил)-4,13-дитозилтетрадекагидро-2*H*,11*H*,17*H*-циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацклооктадецина (24,0 г, 32,8 ммоль) в
30 атмосфере азота. Смесь перемешивали при комнатной температуре до гомогенного состояния и впоследствии обрабатывали фенолом (16,3 г, 174 ммоль). Впоследствии реакционную смесь нагревали при 60 °С в течение 6 ч, после чего ее охлаждали до комнатной температуры и концентрировали досуха в вакууме с получением концентрата. Концентрат очищали посредством обращенно-фазной колоночной

хроматографии (колонка: Revelries C18-330 g; подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде, подвижная фаза В: ацетонитрил, расход: 60 мл/мин) с получением (тетрадекагидро-2*H*,11*H*,17*H*-циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацетоксициклооктадецин-18-ил)метилацетата (8,0 г).

5 **Стадия 9.** Якорь магнитной мешалки, (тетрадекагидро-2*H*,11*H*,17*H*-циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацетоксициклооктадецин-18-ил)метилацетат (8,0 г, 21 ммоль), метил-6-(хлорметил)пиколинат (12,2 г, 53,2 ммоль), Na₂CO₃ (11,1 г, 106 ммоль) и ацетонитрил (100 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 500 мл в атмосфере азота и полученную гетерогенную смесь нагревали при 90 °С в
10 течение 16 ч в атмосфере азота. Впоследствии полученную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через слой Celite® и фильтрат концентрировали досуха в вакууме с получением концентрата. Концентрат подвергали хроматографии на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением диметил-6,6'-((18-(ацетоксиметил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
15 циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацетоксициклооктадецин-4,13-диил)бис(метилена))дипиколината (5,0 г).

Стадия 10. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((18-(ацетоксиметил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацетоксициклооктадецин-4,13-
20 диил)бис(метилена))дипиколинат (5,0 г, 7,4 ммоль), K₂CO₃ (0,10 г, 0,74 ммоль) и метанол (50 мл) добавляли в круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Впоследствии смесь концентрировали досуха в вакууме, а полученный остаток очищали хроматографией на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением 6,6'-((18-(гидроксиметил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
25 циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацетоксициклооктадецин-4,13-диил)бис(метилена))дипиколината (3,0 г).

Стадия 11. Якорь магнитной мешалки, 6,6'-((18-(гидроксиметил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизаацетоксициклооктадецин-4,13-
30 диил)бис(метилена))дипиколинат (2,0 г, 3,1 ммоль), DCM (20 мл) и триэтиламин (1,2 г, 9,5 ммоль) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл в атмосфере азота и полученную смесь охлаждали до 10 °С. Смесь обрабатывали MsCl (0,48 г, 6,3 ммоль) и после завершения добавления реакционный сосуд доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 минут, в течение которых образовывался

осадок. Гетерогенную смесь впоследствии разбавляли DCM (50 мл) и промывали холодным водн. HCl (1 М, 50 мл x3) и ледяной водой (50 мл x2), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением клейкого твердого вещества. Клейкое твердое вещество очищали с помощью колоночной хроматографии на нейтральном оксиде алюминия (0–10% MeOH/DCM) с получением диметил 6,6'-((18-(((метилсульфонил)окси)метил)тетрадекагидро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (1,5 г).

Стадия 12. Раствор, состоящий из диметил 6,6'-((18-(((метилсульфонил)окси)метил)тетрадекагидро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,69 г, 3,2 ммоль) и DMF (5 мл), добавляли по каплям в течение 5 минут в трехгорлую круглодонную колбу объемом 25 мл, содержащую суспензию гидрида натрия (162 мг, 60% в минеральном масле, 4,22 ммоль) в DMF (0,5 мл) при 0 °С в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь доводили до комнатной температуры и перемешивали 15 минут. Реакционную смесь впоследствии повторно охлаждали до 0 °С и обрабатывали по каплям в течение 5 минут раствором, содержащим *трет*-бутил (2-(2-меркаптоэтокси)этил)карбамат (1,50 г, 2,11 ммоль) и DMF (3 мл). После завершения добавления реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и впоследствии перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь далее медленно обрабатывали насыщ. NH₄Cl и затем экстрагировали этилацетатом (10 мл x 3). Объединенные экстракты промывали водой (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением масла. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,2 г).

Стадия 13. Якорь магнитной мешалки, циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]дизациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколинат (0,20 г, 0,24 ммоль), MeOH (1,0 мл) и HCl в метаноле (4 М, 1,2 мл, 4,8 ммоль) добавляли в одnogорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С и полученную смесь доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества удаляли в вакууме с получением диметил 6,6'-((18-(((2-

(2-аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-
диил)бис(метилен))дипиколината (150 мг), который использовали без очистки.

Стадия 14. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((18-(((2-(2-
5 аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-
диил)бис(метилен))дипиколинат (40 мг, 0,054 ммоль), водный раствор LiOH (1,6 мл, 0,1
Н, 0,16 ммоль) и MeOH (0,5 мл) добавляли в реакционный сосуд объемом 8 мл при
комнатной температуре и полученную смесь перемешивали в течение ночи. Значение
10 рН реакционной смеси доводили уксусной кислотой до рН ~6,5 и впоследствии
концентрировали досуха в вакууме при комнатной температуре и полученный
концентрат очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм 5,0
мкм; подвижная фаза: 10 mM ацетата аммония в смеси вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин)
с получением **примера 11**: 6,6'-((18-(((2-(2-
15 аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-
диил)бис(метилен))дипиколиновой кислоты (23 мг). ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для
C₃₄H₅₁N₅O₉S; 705,34; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 706,4.

Стадия 15. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((18-(((2-(2-
20 аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-
диил)бис(метилен))дипиколинат (70 мг, 0,95 ммоль), 11,12-дидегидро-γ-
оксодибенз[*b*,*f*]азоцин-5(6*H*)-бутановую кислоту (29 мг, 0,95 ммоль), триэтиламин (29
мг, 0,76 ммоль), NATU (54 мг, 0,14 ммоль) и DCM (0,5 мл) добавляли в трехгорлую
25 круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С в атмосфере азота. Полученную смесь
доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную
смесь разводили водой (10 мл) и экстрагировали с помощью дихлорметана (10 мл x 3).
Объединенные экстракты промывали 10% водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и
солевым раствором (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и
30 концентрировали досуха с получением масла. Масло очищали хроматографией на
силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением *N*-ацил-DVCO-меченого диметил 6,6'-
((18-(((2-(2-аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-4*H*,13*H*,17*H*-
циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-
диил)бис(метилен))дипиколината (10 мг).

Стадия 16. Якорь магнитной мешалки, *N*-ацил-DBCO-меченный диметил 6,6'-(((18-(((2-(2-аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро-4Н,13Н,17Н-циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколинат (10 мг, 0,01 ммоль), водный LiOH (0,3 мл, 0,1 Н, 0,03 ммоль) и метанол (0,25 мл) добавляли в реакционный сосуд объемом 8 мл при комнатной температуре и полученную смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь доводили уксусной кислотой до pH ~6,5 и затем концентрировали досуха в вакууме при комнатной температуре и полученный концентрат очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 (19 X 150 мм) 5,0 мкм; подвижная фаза: 10 мМ ацетата аммония в смеси вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением

Пример 12. *N*-ацил-DBCO-меченной 6,6'-(((18-(((2-(2-аминоэтокси)этил)тио)метил)тетрадекагидро -4Н,13Н,17Н-циклопента[*b*][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколиновой кислоты (3 мг). ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для C₅₃H₆₄N₆O₁₁S; 992,44; наблюдаемое m/z [M-H]⁻: 991,4.

Пример 13

6-((16-(1-(6-Карбоксипиридин-2-ил)-8-изотиоцианатооктил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота

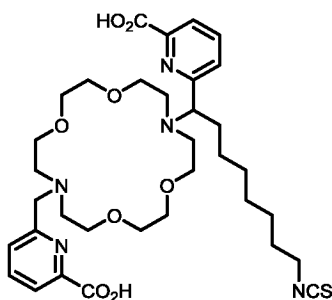
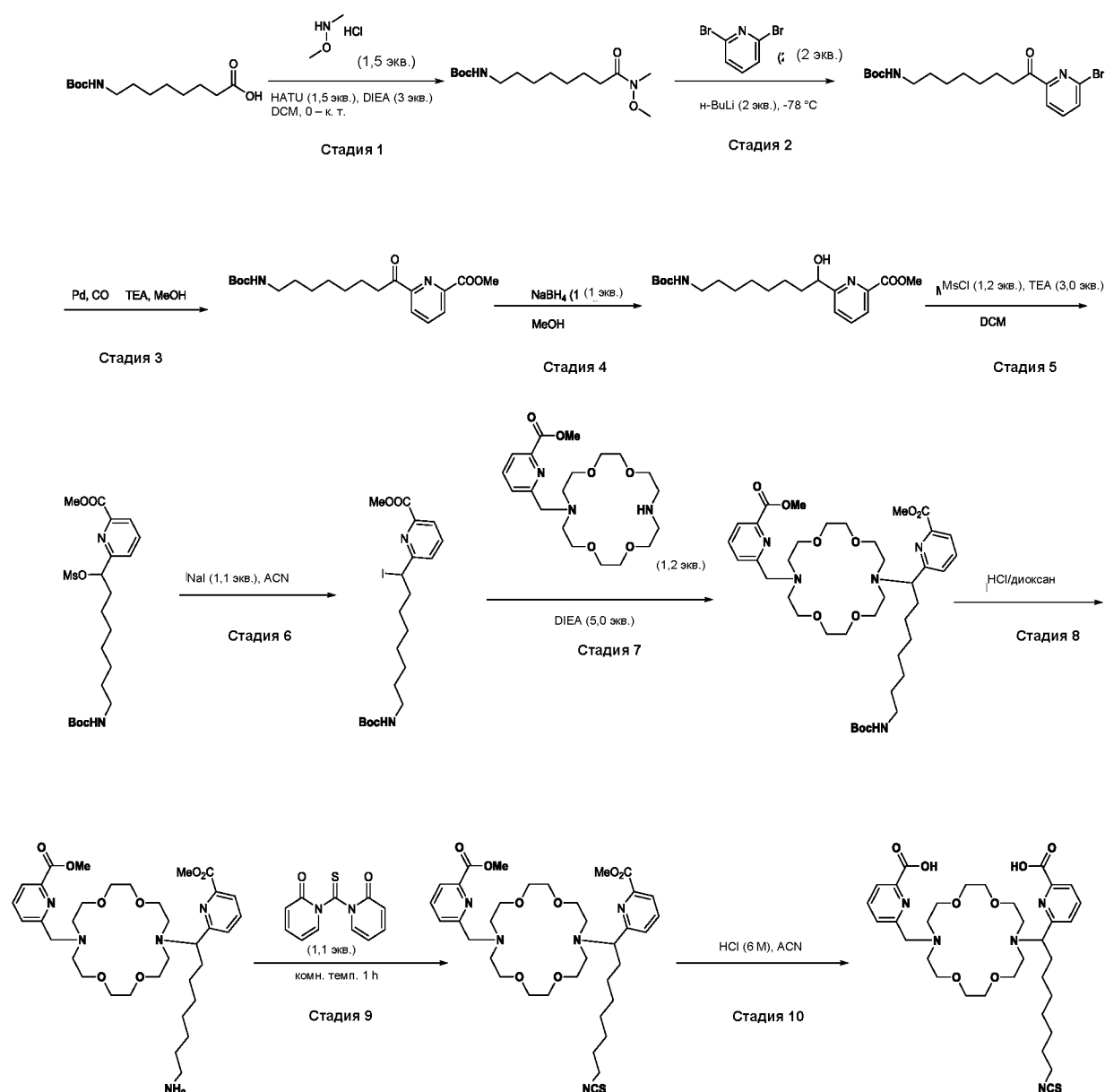


Схема 11

Стадия 1. В трехгорлую круглодонную колбу объемом 500 мл, продутую и поддерживаемую в инертной атмосфере азота, помещали раствор 8-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)октановой кислоты (20,0 г, 77,1 ммоль) в дихлорметане (200 мл), N,O-диметилгидроксиламин (7,0 г, 115 ммоль), диизопропилэтиламин (29,90 г, 231 ммоль). После этого добавляли HATU (43,9 г, 115 ммоль) при перемешивании при 0 °C. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Впоследствии реакционную смесь гасили путем добавления 200 мл воды. Полученный раствор экстрагировали дихлорметаном (100 мл x 2). Объединенные органические слои последовательно промывали HCl (1M) (300 мл X2), водным раствором NH₄CO₃ (400 мл X3) и соевым раствором (400 мл). После высушивания над безводным Na₂SO₄

концентрировали с получением *трет*-бутил (8-(метокси(метил)амино)-8-оксооктил)карбамата (15,4 г, выход 66%) в виде светло-желтого масла.

Стадия 2. В трехгорлую круглодонную колбу объемом 500 мл, которая была продута и в которой поддерживалась инертная атмосфера азота, помещали раствор 2,6-дибромпиридина (23,0 г, 927 ммоль) в ТГФ (400 мл). Раствор охлаждали до -78 °С и
5 быстро добавляли по каплям *n*-BuLi (60,4 мл, 927 ммоль). После перемешивания в течение 10 мин по каплям добавляли *трет*-бутил (8-(метокси(метил)амино)-8-оксооктил)карбамат (14,0 г, 463,5 ммоль) в ТГФ (40 мл) при перемешивании при -78 °С. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре.
10 Реакционную смесь гасили путем добавления 500 мл воды. Полученный раствор экстрагировали этилацетатом (200 мл x 2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (400 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенного продукта. Хроматография на силикагеле (0–10% этилацетат в петролейном эфире) позволила получить *трет*-бутил (8-(6-
15 бромпиридин-2-ил)-8-оксооктил)карбамат (11,8 г, выход 50%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Стадия 3. В реактор высокого давления объемом 1 л, поддерживаемый в инертной атмосфере азота, поместили раствор *трет*-бутил (8-(6-бромпиридин-2-ил)-8-оксооктил)карбамата (11,5 г, 28,8 ммоль, 1,0 экв.) в MeOH (500 мл), затем Pd(dppf)Cl₂ (2,1 г, 2,88 ммоль), TEA (8,7 г, 86,4 ммоль). Затем ввели CO (20 атм). Полученный
20 раствор перемешивали в течение 16 ч при 100 °С. Реакционный раствор фильтровали и напрямую использовали на следующей стадии.

Стадия 4. Раствор в MeOH, полученный выше, охлаждали до 0 °С и добавляли NaBH₄ (1,08 г, 28,8 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной
25 температуре. Реакцию гасили добавлением 500 мл водного раствора NH₄CO₃ и экстрагировали этилацетатом (300 мл X2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (600 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали с получением метил 6-(8-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-1-гидроксиоктил)пиколината (10 г) в виде коричневого масла.

Стадия 5. В трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл, которая была продута и в которой поддерживали инертную атмосферу азота, помещали раствор метил 6-(8-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-1-гидроксиоктил)пиколината (10 г) в DCM (100 мл). После охлаждения до 0 °С добавляли TEA (7,9 г, 78,9 ммоль) и мезилхлорид (3,6 г, 31,5 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре.

Смесь концентрировали под вакуумом. Добавляли MeCN (100 мл) и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт метил 6-(8-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-((метилсульфонил)окси)октил)пиколинат напрямую использовали на следующей стадии.

5 **Стадия 6.** К раствору вышеуказанного неочищенного продукта метил 6-(8-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-((метилсульфонил)окси)октил)пиколината в ACN (100 мл) добавляли NaI (4,3 г, 28,9 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при 80 °С. Смесь фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ: колонка C18; подвижная фаза от H₂O/ACN = 10 50/50% до H₂O/ACN = 20/80% за 30 мин; с получением 4 г метил 6-(8-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-иодоктил)пиколината в виде коричневого масла.

15 **Стадия 7.** К раствору метил 6-(8-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-иодоктил)пиколината (3,0 г, 6,12 ммоль) в DCM (200 мл) добавляли метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (3,0 г, 7,34 ммоль), диизопропилэтиламин (3,9 г, 30,61 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 16 ч при 80 °С. Реакцию концентрировали. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной флэш-ВЭЖХ: колонка C18; подвижная фаза, А: H₂O (0,05% TFA), В: CAN; от 20% В до 40% В за 20 мин. В результате получали 1,9 г метил 6-(8-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)октил)пиколината в виде коричневого масла.

20 **Стадия 8.** В перемешиваемый раствор метил 6-(8-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)октил)пиколината (1,7 г, 2,19 ммоль, 77% по ЖХМС) в DCM (8,5 мл) при 0 °С добавляли по каплям HCl/диоксан. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию гасили по частям добавлением водного раствора NH₄CO₃ (20 мл X3). Полученный раствор экстрагировали дихлорметаном (100 мл x 2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (400 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и 30 концентрировали с получением 1,3 г метил 6-(8-амино-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)октил)пиколината в виде коричневого масла.

Стадия 9. К раствору метил 6-(8-амино-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)октил)пиколината (1,0 г,

1,48 ммоль) в DCM (17 мл) в атмосфере N₂ добавляли 1,1'-тиокарбонилбис(пиридин-2(1H)-он) (0,38 г, 1,63 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Раствор концентрировали с получением 1,6 г метил 6-((16-(1-(6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)-8-тиоцианатооктил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
5 диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината в виде коричневого масла.

Стадия 10. К раствору метил-6-((16-(1-(6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)-8-
тиоцианатооктил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7-
ил)метил)пиколината (1,40 г, 1,42 ммоль) в ACN (4 мл) добавляли HCl (6 M) (7 мл).

Полученный раствор перемешивали в течение 5 ч при 50 °C на масляной бане. Раствор
10 разбавляли 10 мл H₂O. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной
флэш-ВЭЖХ: колонка, C18; подвижная фаза, А: H₂O (0,05% TFA), В: ACN, от 20% В
до 36% В за 20 мин; детектор УФ 210 нм. Фракции продукта концентрировали для
удаления ACN. Водный слой доводили до pH7 ~8 с помощью водного раствора

NaHCO₃. Раствор снова очищали препаративной флэш-ВЭЖХ: колонка, C18;

15 подвижная фаза, А: H₂O, В: ACN, от 95% В до 100% В за 20 мин. Раствор продукта
концентрировали для удаления CAN, а впоследствии лиофилизировали. Получили 190
мг 6-((16-(1-(6-карбоксопиридин-2-ил)-8-тиоцианатооктил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
дiazациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновой кислоты в виде коричневого твердого
вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, D₂O) δ 7,91 (с, 4H), 7,54 (с, 2H), 4,52 (д, J = 17,9 Гц, 3H),
20 3,77 (д, J = 9,3 Гц, 8H), 3,56–3,41 (м, 18H), 2,11 (с, 2H), 1,51 (с, 2H), 1,17 (с, 7H), 0,97 (с,
1H). МС (ЭР, m/z): 688,3 (M + H⁺).

Пример 14

6-((16-(1-(6-Карбоксопиридин-2-ил)-2-(2-(2-изотиоцианатозтокси)этокси)этил)-
25 1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота

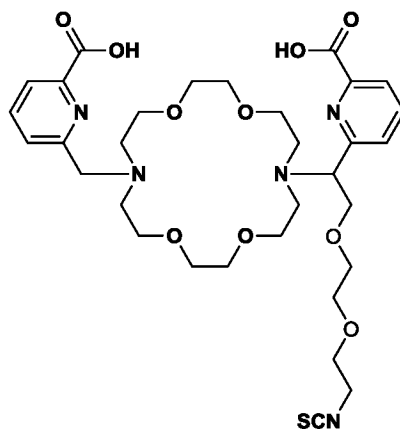
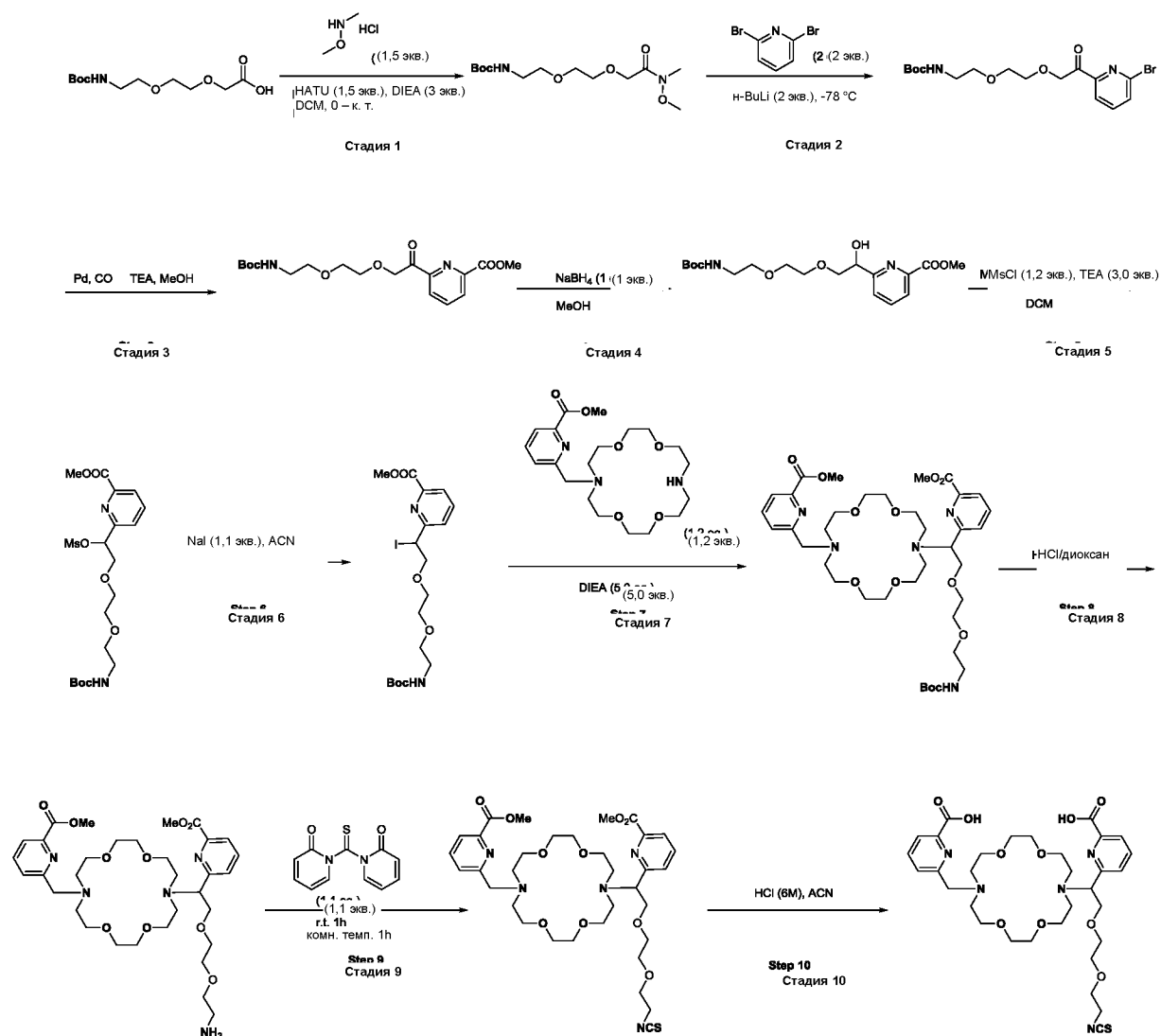


Схема 12



Стадия 1. К перемешиваемому раствору 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-овой кислоты (10,00 г, 37,98 ммоль) и диизопропилэтиламина (14,73 г, 113,94 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при 0 °C в атмосфере азота по каплям добавляли [бис(диметиламино)метилден]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат (15,16 г, 39,88 ммоль), *N,O*-диметилгидроксиламин (5,55 г, 56,97 ммоль). После перемешивания полученной смеси в течение 1 ч при комнатной температуре ее выливали в насыщенный раствор NH_4Cl (водн.). Полученную смесь экстрагировали дихлорметаном (100 мл x 2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации полученный фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством хроматографии: колонка, С18; подвижная фаза А: H_2O с 0,05% ТФА, В: АСN; градиент от 20% В до 40% В за 20 мин; Детектор: УФ 210 нм. Получили *трет-*

бутил (3-метил-4-оксо-2,6,9-триокса-3-азаундекан-11-ил)карбамат (9,90 г выход 85%) в виде светло-желтого масла.

Стадия 2. К раствору 2,6-дибромпиридина (13,3 г, 56,1 ммоль) в ТГФ (260 мл) в 3-горлую круглодонную колбу объемом 500 мл при -78 °С в атмосфере азота добавляли по каплям *n*-BuLi (28,0 мл, 56,1 ммоль). Раствор перемешивали при -78 °С в течение 10 мин. К реакционному раствору по каплям при -78 °С добавляли трет-бутил (3-метил-4-оксо-2,6,9-триокса-3-азаундекан-11-ил)карбамат (7,0 г, 28,0 ммоль) в ТГФ (30 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь гасили добавлением воды/льда (200 мл) при 0 °С. Водный слой экстрагировали этилацетатом (100 мл x 3). Объединенные экстракты сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством хроматографии: колонка, C18; подвижная фаза, подвижная фаза А: H₂O с 0,05% TFA, В: ACN; градиент от 38% до 58% В за 20 мин; Детектор: УФ 210 нм. Получили *трет*-бутил (2-(2-(2-(6-бромпиридин-2-ил)-2-оксоэтокси)этокси)этил)карбамат (4,6 г, выход 50%) в виде желтого твердого вещества. МС (ЭР, *m/z*): 425, 427 (M + Na⁺).

Стадия 3. В реактор высокого давления объемом 250 мл добавляли *трет*-бутил (2-(2-(2-(6-бромпиридин-2-ил)-2-оксоэтокси)этокси)этил)карбамат (4,0 г, 18,1 ммоль), триэтиламин (5,5 г, 54,3 ммоль), Pd(dppf)Cl₂ (1,3 г, 1,8 ммоль) и MeOH (40 мл). Реакционный сосуд вакуумировали и снова заполняли N₂. Затем вводили CO (10 атм). Полученный раствор перемешивали при 100 °С в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали и полученный фильтрат концентрировали досуха. Остаток очищали посредством хроматографии: колонка, C18; подвижная фаза А: H₂O с 0,05% TFA, В: ACN; градиент от 38% до 58% В за 20 мин; Детектор: УФ 210 нм. Получили метил 6-(2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-оил)пиколинат (2,4 г, выход 63%) в виде коричневого масла. МС (ЭР, *m/z*): 405 (M + Na⁺).

Стадия 4. К раствору метил 6-(2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-оил)пиколината (2,30 г, 6,01 ммоль) в MeOH (46 мл) в атмосфере N₂ при 0 °С добавляли NaBH₄ (0,23 г, 6,01 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем гасили добавлением 50 мл насыщенного NH₄HCO₃ (водн.). Полученный раствор экстрагировали этилацетатом (30 мл x 2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (60 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Получили 2,2 г неочищенного продукта метил 6-(13-гидрокси-2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)пиколината в виде коричневого масла.

Стадия 5. К раствору метил 6-(13-гидрокси-2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)пиколината (2,2 г, 5,72 ммоль) в дихлорметане (22 мл) при 0 °С в атмосфере N₂ добавляли триэтиламин (1,74 г, 17,16 ммоль) и MsCl (0,79 г, 6,86 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем гасили H₂O (22 мл). Полученную смесь экстрагировали с использованием дихлорметана (20 мл x 2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (40 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Получили 2,2 г неочищенного продукта метил 6-(2,2-диметил-13-((метилсульфонил)окси)-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)пиколината в виде коричневого масла.

Стадия 6. К раствору метил 6-(2,2-диметил-13-((метилсульфонил)окси)-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)пиколината (2,2 г, 4,75 ммоль) в ACN (22 мл) в атмосфере N₂ добавляли NaI (0,78 г, 5,23 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при 80 °С. Смесь фильтровали и концентрировали. Сырой продукт очищали с помощью хроматографии: колонка, C18; подвижная фаза А: H₂O, В: ACN; градиент от 50% до 80% В за 30 мин; Детектор: УФ 210 нм. Получили метил 6-(13-иод-2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)пиколинат (1,2 г) в виде коричневого масла. МС (ЭР, m/z): 517 (M + Na⁺), 495 (M + H⁺).

Стадия 7. Раствор метил 6-(13-иод-2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)пиколината (840 мг, 1,69 ммоль) и метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (839 мг, 2,03 ммоль) в ACN (16,8 мл) перемешивали в течение ночи при 80 °С в атмосфере азота. Охлажденную реакционную смесь фильтровали, а фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Сырой продукт очищали с помощью хроматографии: колонка, C18; подвижная фаза А: H₂O, В: ACN; градиент от 40% до 60% В за 20 мин; Детектор: УФ 210 нм. Получили метил 6-((16-(13-(6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)-2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (450 мг) в виде коричневого масла. МС (ЭР, m/z): 700 (M + Na⁺), 678 (M + H⁺).

Стадия 8. К раствору метил 6-((16-(13-(6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)-2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (450 мг, 579 ммоль) в дихлорметане (2,5 мл) при 0 °С добавляли HCl/диоксан (2,5 мл, 4 М). Полученный раствор перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Реакцию гасили добавлением насыщенного Na₂CO₃ (водн.). Водный слой экстрагировали с помощью DCM: IPA (5: 1)

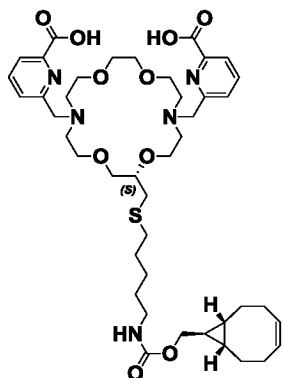
(30 мл X2). Объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта метил 6-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)этил)пиколината (330 мг). Неочищенный продукт использовали напрямую в следующей стадии.

Стадия 9. Раствор метил 6-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)этил)пиколината (300 мг, 0,44 ммоль) и 1-(2-оксопиридин-1-карботиоил)пиридин-2-она (113,08 мг, 0,48 ммоль) в дихлорметане (3 мл) перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта метил 6-(2-(2-(2-изотиоцианатоэтокси)этокси)-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)этил)пиколината (380 мг). Неочищенный продукт использовали напрямую в следующей стадии.

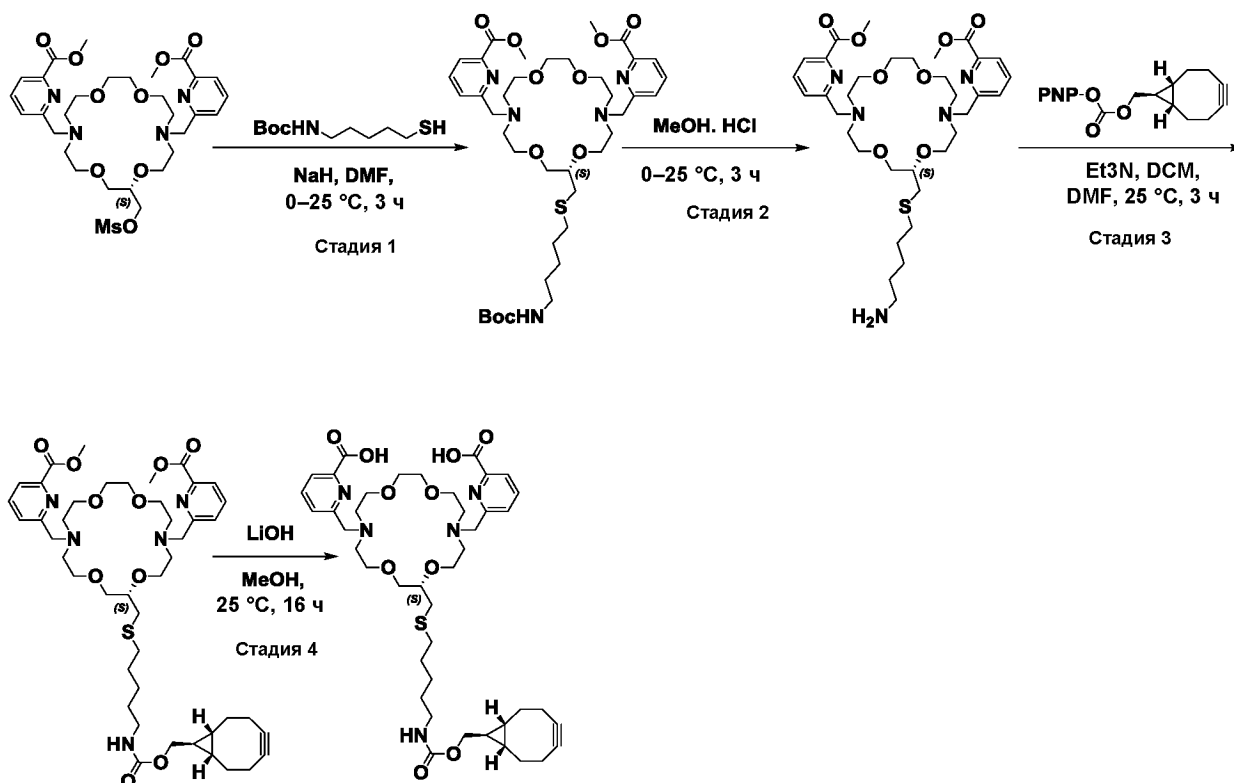
Стадия 10. Раствор метил 6-(2-(2-(2-изотиоцианатоэтокси)этокси)-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)этил)пиколината (380 мг, 0,52 ммоль) и HCl (1,9 мл, 6 М) в дихлорметане (1,9 мл) перемешивали в течение 3 ч при 50 °С в атмосфере азота. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении и подщелачивали до pH 6–7 насыщенным раствором NaHCO_3 (водн.). Остаток очищали посредством хроматографии: колонка, C18; подвижная фаза А: H_2O с 0,05% TFA, В: ACN, градиент от 20% до 36% В за 20 мин; Детектор: УФ 210 нм. Затем фракции продукта концентрировали в вакууме для удаления MeCN . Раствор снова очищали хроматографией: колонка, C18; подвижная фаза А: H_2O , В: ACN, градиент от 95% В до 100% В в течение 20 мин. Раствор концентрировали для удаления большей части MeCN и водный раствор лиофилизировали с получением 6-((16-(1-(6-карбоксопиридин-2-ил)-2-(2-(2-изотиоцианатоэтокси)этокси)этил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновой кислоты (130 мг) в виде коричневого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, D_2O) 8,03–7,84 (м, 2H), 7,57 (дд, $J = 22,3, 7,4$ Гц, 1H), 5,00 (с, 0H), 4,59 (с, 1H), 4,20 (дд, $J = 23,4, 9,5$ Гц, 1H), 3,82 (д, $J = 15,4$ Гц, 4H), 3,70–3,58 (м, 6H), 3,58–3,49 (м, 6H). МС (ЭР, m/z): 692,3 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Пример 15

6,6'-(((*S*)-2-(((5-((((1*R*,8*S*,9*r*)-Бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновая кислота



5

Схема 13

Стадия 1. Раствор, состоящий из *tert*-бутил (5-меркаптопентил)карбамата (0,30 г, 1,0 ммоль) и DMF (3,0 мл), добавляли по каплям в течение 5 минут в трехгорлую круглодонную колбу объемом 50 мл, содержащую суспензию гидроксида натрия (0,07 г, 60% в минеральном масле, 2 ммоль) в DMF (3,0 мл) при 0 °C и в атмосфере азота. После завершения добавления реакцию доводили до комнатной температуры и перемешивание продолжали 15 минут. Впоследствии реакцию

смесь повторно охлаждали до 0 °С и добавляли к ней по каплям раствор, состоящий из диметил 6,6'-((2-(((метилсульфонил)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазаацклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,6 г, 0,9 ммоль) и DMF (3,0 мл), в течение 10 минут. После завершения добавления реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение 1,5 ч. Впоследствии реакционную смесь осторожно обрабатывали насыщ. водн. раствором NH₄Cl (1,0 мл) и концентрировали досуха с получением масла. Масло подвергали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси вода/ацетонитрил; расход: 15,0 мл/мин) с получением диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-бутоксикарбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазаацклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (0,25 г).

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-бутоксикарбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазаацклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,25 г, 0,32 ммоль), MeOH (1,0 мл) и HCl в метаноле (4 М, 1,5 мл, 6,3 ммоль) добавляли в круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С, которую далее доводили до комнатной температуры и смесь перемешивали в течение 3 ч. Летучие вещества впоследствии удаляли в вакууме с получением диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазаацклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,21 г), который использовали без очистки.

Стадия 3. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазаацклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,15 г, 0,22 ммоль), ((1R,8S,9r)-бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-ил)метил 4-нитрофенилкарбонат (68 мг, 0,22 ммоль), триэтиламин (66 мг, 0,65 ммоль) и смесь DCM (2 мл) и DMF (0,1 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С в атмосфере азота. Полученную смесь постепенно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Впоследствии смесь концентрировали досуха с получением диметил 6,6'-(((S)-2-(((5-((((1R,8S,9r)-бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазаацклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколината (0,1 г), который использовали без очистки.

Стадия 4. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-(((S)-2-(((5-((((1R,8S,9r)-бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-

тетраокса-7,16-диазациклооктадекан -7,16-диил)бис(метилен))дипиколинат (0,10 г, 0,12 ммоль), водный LiOH (3,5 мл, 0,1 Н, 0,35 ммоль) и MeOH (0,5 мл) добавляли в реакционный сосуд объемом 8 мл и полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Впоследствии реакционную смесь обрабатывали уксусной кислотой до pH ~6,5 и затем концентрировали досуха в вакууме при комнатной температуре с получением масла, которое очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонок: XBRIDGE C18 19 X 150 мм, 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% муравьиная кислота в смеси H₂O/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением 6,6'-(((S)-2-(((5-(((1*R*,8*S*,9*r*)-бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан -7,16-диил)бис(метилен))дипиколиновой кислоты (42 мг).

Пример 16

N-Ацил-DBCO-меченная 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколиновая кислота

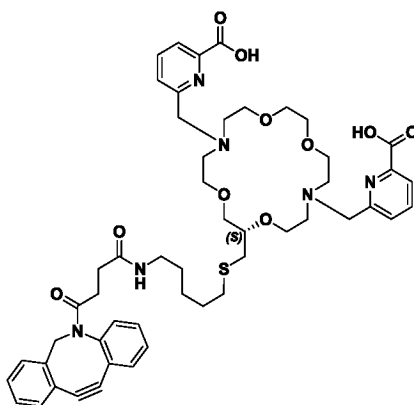
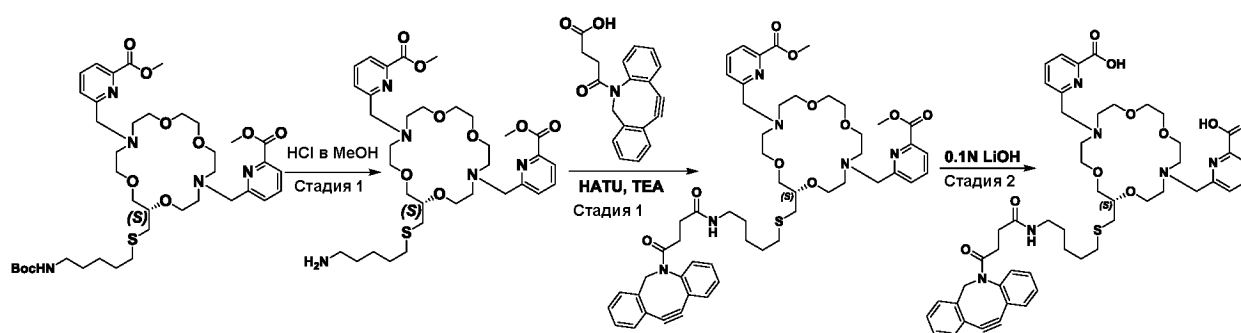


Схема 14



Стадия 1. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-бутоксикарбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (0,12 г, 0,15 ммоль), MeOH (0,5 мл) и HCl в метаноле (4 М, 0,75 мл, 3,0 ммоль) добавляли в круглодонную

колбу объемом 25 мл при 0 °С, впоследствии доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества удаляли в вакууме с получением диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (70 мг), который

5 использовали без очистки.

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (50 мг, 0,070 ммоль), 11,12-дидегидро-γ-окодибенз[b,f]азоцин-5(6H)-бутановую кислоту (20 мг, 0,070 ммоль), триэтиламин (21 мг, 0,21 ммоль), НАТУ (38 мг, 0,10 ммоль) и

10 DCM (0,5 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С в атмосфере азота и затем доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь обрабатывали водой (10 мл) и экстрагировали дихлорметаном (10 мл x3) и объединенные экстракты промывали 10% водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и соевым раствором (10 мл), сушили над безводным

15 Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением масла. Масло очищали хроматографией на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением *N*-ацил-DBCO-меченного диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (16 мг).

20 **Стадия 3.** Якорь магнитной мешалки, *N*-ацил-DBCO-меченый диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (16 мг, 0,016 ммоль), водный LiOH (0,49 мл, 0,1 Н, 0,049 ммоль) и MeOH (0,25 мл) добавляли в реакционный сосуд на 8 мл и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Впоследствии реакционную

25 смесь обрабатывали уксусной кислотой до pH ~6,5 и концентрировали досуха в вакууме при комнатной температуре с получением концентрата, который очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 19 X 150 мм 5,0 мкм; подвижная фаза: 10 mM ацетата аммония в смеси вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением *N*-ацил-DBCO-меченной 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-

30 тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколиновой кислоты (5 мг) в виде твердого вещества почти белого цвета. ЖХ-МС APCI: рассчитано для C₅₁H₆₂N₆O₁₀S; 950,42; наблюдаемое *m/z* [M+H]⁺ 951,4. ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O): δ 7,81–7,75 (м, 4H); 7,52–7,17 (м, 10H); 4,97–4,90 (м, 1H); 4,80 (с, 4H); 4,14 (с, 3H); 3,77–

3,46 (м, 16H); 3,10 (с, 7H); 2,83–2,80 (м, 2H); 2,55–2,53 (м, 2H); 2,42–2,38 (м, 3H); 2,11–2,08 (м, 3H); 1,39–1,35 (м, 2H); 1,20–1,10 (м, 4H).

Пример 17

- 5 *N*-Ацил-DBCO-меченная 6-((4-((6-аминоэтил)карбамоил)фенил)16-((6-карбоксопиридин-2-ил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота (ТОРА-[C7]-бензимида-DBCO)

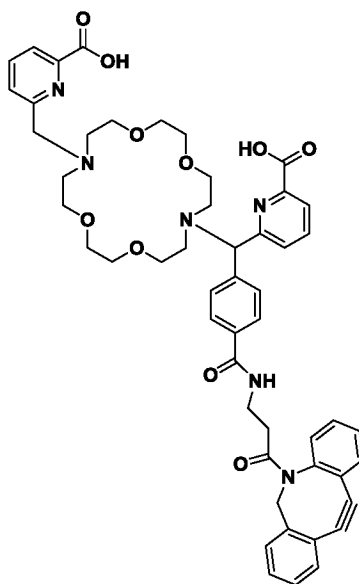
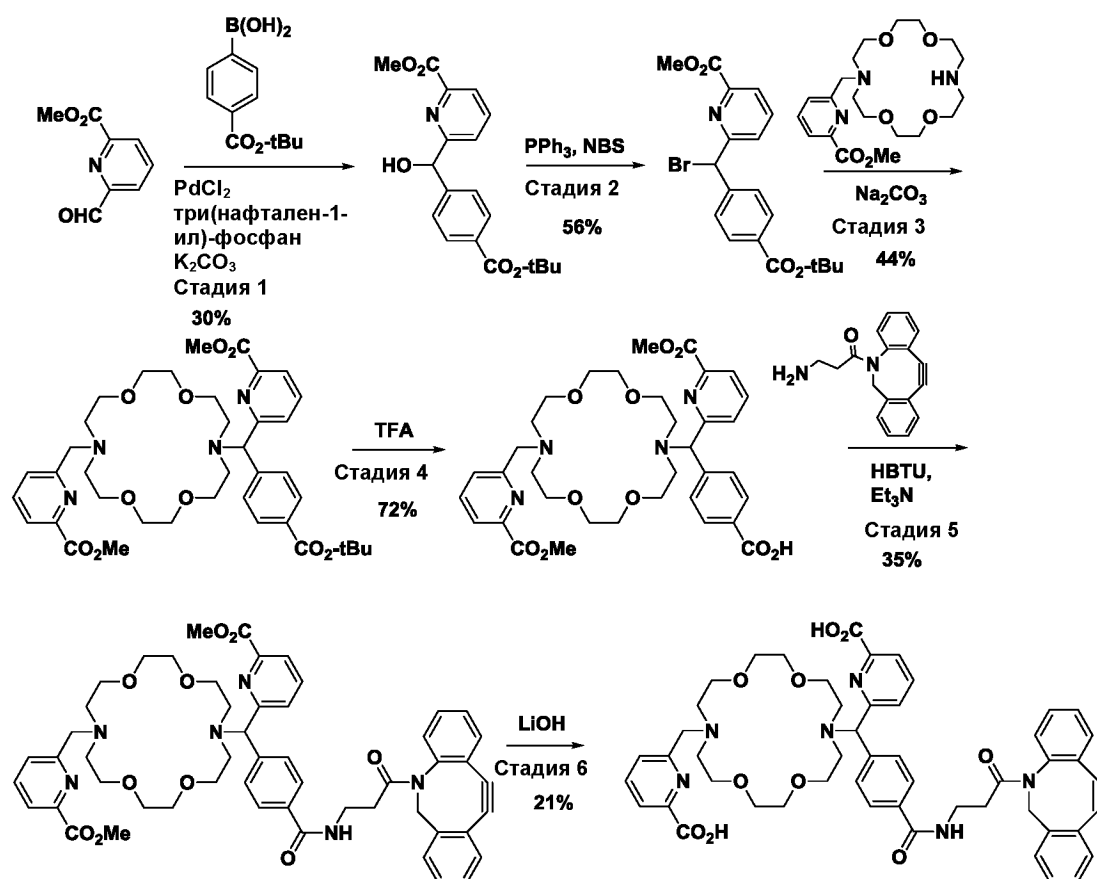


Схема 15



Стадия 1. К смеси метил-6-формилпиколината (4,00 г, 24,2 ммоль), (4-(*трет*-бутоксикарбонил)фенил)бороновой кислоты (10,7 г, 48,5 ммоль), PdCl₂ (0,21 г, 1,2 ммоль), три(нафтаден-1-ил)фосфина (0,50 г, 1,2 ммоль) и карбоната калия (10,0 г, 72,7 ммоль) в атмосфере азота при -78 °С в трехгорлую круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли тетрагидрофуран (100 мл) одной порцией. Смесь продували азотом и перемешивали при комн. темп. в течение 30 мин, впоследствии нагревали при 65 °С в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до комн. темп., фильтровали через слой Celite® и фильтрат концентрировали досуха. Неочищенный продукт подвергали хроматографии на силикагеле (0–50% EtOAc/петролейный эфир) с получением метил-6-((4-(*трет*-бутоксикарбонил)фенил)(гидрокси)метил)пиколината в виде желтого масла (2,5 г, 30%).

Стадия 2. Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-(*трет*-бутоксикарбонил)фенил)(гидрокси)метил)пиколинат (2,50 г, 7,30 ммоль), PPh₃ (3,43 г, 13,1 ммоль), *N*-бромсукцинимид (2,13 г, 12,0 ммоль) и DCM (30 мл) помещали в трехгорлую круглодонную колбу объемом 250 мл в атмосфере азота при комн. темп. и перемешивали в течение 1 ч. Реакционный раствор загружали на колонку с

силикагелем и очищали с использованием 0–30% этилацетата в петролейном эфире с получением соединения метил 6-(бром(4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)метил)пиколината (1,65 г, 56%) в виде желтого масла.

5 **Стадия 3.** Якорь магнитной мешалки, метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 10 диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (1,52 г, 3,69 ммоль), 6-(бром(4-(трет-
 бутоксикарбонил)фенил)метил)пиколинат (1,50 г, 3,69 ммоль), Na₂CO₃ (1,17 г, 11,1
 ммоль) и ацетонитрил (30 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом
 250 мл и полученную гетерогенную смесь нагревали при 90 °С в течение 16 ч в
 атмосфере азота. Затем реакционную массу охлаждали до комн. темп., фильтровали
 15 через слой Celite® и концентрировали досуха в вакууме с получением неочищенного
 продукта. Неочищенный продукт подвергали хроматографии на силикагеле (0–10%
 MeOH/DCM) с получением метил 6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)(16-((6-
 (метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-
 7-ил)метил)пиколината в виде коричневого масла (1,2 г, 44%).

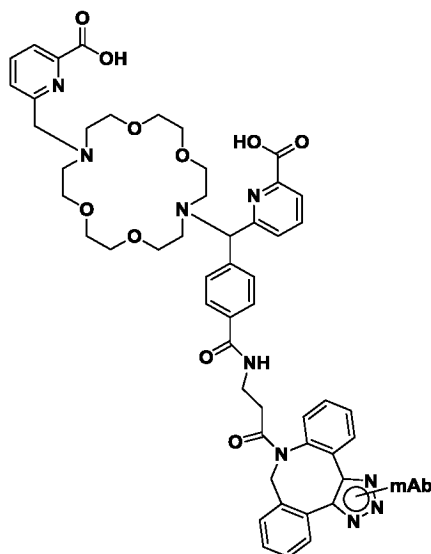
15 **Стадия 4.** Якорь магнитной мешалки, метил 6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)(16-
 ((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 20 diaзациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (1,2 г, 1,6 ммоль), TFA (0,62 мл, 8,1 ммоль)
 и DCM (20 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл при
 комн. темп. и перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали
 25 досуха и полученный неочищенный продукт подвергали препаративной ВЭЖХ
 (колонка: XBRIDGE C18 (19 X 150 мм) 5,0 мкм; подвижная фаза: 0,1% TFA в смеси
 вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением 4-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-
 ил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-
 30 diaзациклооктадекан-7-ил)метил)бензойной кислоты (0,8 г, 72%) в виде коричневого
 масла. **ЖХ-МС APCi:** Рассчитанное для C₃₅H₄₄N₄O₁₀ 680,31; наблюдаемое *m/z* [M+H]⁺
 681,5. чистота по ЖХ-МС: 99,87%. **чистота по ВЭЖХ:** 97,14% (97,01% при 210 нм,
 97,20% при 254 нм и 97,21% при 280 нм; колонка: Atlantis dC18 (250 X4,6 мм), 5 мкм;
 подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде, подвижная фаза В: ацетонитрил; расход: 1,0
 мл/мин %. **¹H ЯМР** (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,12–8,07 (м, 4H), 8,00–7,98 (м, 2H), 7,75–
 7,73 (м, 4H), 6,10 (с, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,96 (с, 3H), 3,91 (с, 3H), 3,82 (с, 8H), 3,56 (с, 8H),
 3,52 (с, 8H).

Стадия 5. Якорь магнитной мешалки, 4-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)(16-((6-
 (метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-diazациклооктадекан-
 7-ил)метил)бензойную кислоту (0,25 г, 0,37 ммоль), DBCO (0,10 г, 0,37 ммоль),

- триэтиламин (0,16 мл, 1,1 ммоль), НВТУ (0,21 г, 0,55 ммоль) и DCM (10 мл) добавляли в трехгорлую круглодонную колбу объемом 25 мл при 0 °С в атмосфере азота при комн. темп. и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили водой (20 мл) и экстрагировали DCM (3 X20 мл). Объединенные экстракты промывали 10% водным раствором NaHCO₃ (20 мл), соевым раствором (20 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением неочищенного продукта в виде масла. Неочищенный продукт подвергали хроматографии на силикагеле (0–10% MeOH/DCM) с получением ТОРА диметилэфир-[С7]-фенил-DBCO (0,12 г, 35%) в виде бесцветного клейкого масла.
- 5
- 10 **Стадия 6.** Якорь магнитной мешалки, ТОРА-диметилэфир-[С7]-фенил-DBCO (0,1 г, 0,1 ммоль), водный раствор LiOH·H₂O (3 мл, 0,1 Н, 0,3 ммоль) и ТГФ/MeOH/H₂O (4 : 1 : 1 об./об./об., 2 мл) добавляли в реакционный сосуд объемом 8 мл при комн. темп. и оставляли перемешиваться в течение 2 ч. Реакционную смесь нейтрализовали водным раствором HCl (1 Н) до pH ~6,5. Реакционную смесь концентрировали досуха в
- 15 вакууме при комнатной температуре и полученный неочищенный продукт подвергали препаративной ВЭЖХ (колонка: XBRIDGE C18 (19 X 150 мм) 5,0 мкм; подвижная фаза: 10 мМ ацетата аммония в смеси вода/ACN; расход: 15,0 мл/мин) с получением ТОРА-[С7]-фенил-DBCO (20 мг, 21%) в виде твердого вещества почти белого цвета.
- 20 **ЖХ-МС АРСІ:** рассчитанное для C₅₁H₅₄N₆O₁₀ 910,39; наблюдаемое *m/z* [M-H]⁺ 909,3. чистота по ЖХ-МС: 92,47%; **чистота по ВЭЖХ:** 90,68% (88,04% при 210 нм, 90,43% при 254 нм и 93,56% при 280 нм; колонка: XBRIDGE C8 (50 X 4,6 мм), 3,5 мкм; подвижная фаза А: 10 мМ бикарбоната аммония в воде, подвижная фаза В: ацетонитрил; расход: 1,0 мл/мин ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,84–7,82 (м, 4H), 7,60–7,29 (м, 12H), 7,13–7,10 (м, 2H), 5,12–5,02 (м, 2H), 3,97 (с, 2H), 3,59–3,44 (м, 20H), 2,85 (с, 4H), 2,73–2,68 (м, 6H).
- 25

Пример 18

Конъюгат антитела TOPA-[C7]-бензиимидо-DBCO-триазол-PSMB-127



Стадия 1. Модификация азидом мАт и клик-реакция. PSMB127 сайт-селективно
 5 модифицировали с помощью 100х молярного избытка 3-азидопропиламина и
 микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI) при 37 °С. Добавление двух азидов к
 тяжелым цепям мАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на
 приборе Agilent G224. Избыток 3-азидо пропиламина и MTG удаляли и очищали азид-
 модифицированное мАт (азидо-мАт) с использованием 1 мл колонки GE Healthcare
 10 MabSelect. Азидо-мАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия,
 рН 3,0, а впоследствии заменяют на 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl, рН 7,5, с
 использованием колонок для обессоливания 7K Zeba ®. 10х молярный избыток TOPA-
 [C7]-фенил-DBCO вводили в реакцию с сайт-специфичным азидо-PSMB127 (DOL = 2)
 при 37 °С в течение 1 часа без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азид
 15 отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток
 свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для
 обессоливания Zeba ®7K в 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl, рН 7,5, с последующими тремя
 последовательными стадиями разведения 15х и концентрирования в 20 мМ Hepes,
 100 мМ NaCl, рН 7,5 с использованием концентрирующего устройства 30K MWCO
 20 Amicon путем центрифугирования при 3800 ×g. Это обеспечивало получение конечного
 сайт-специфического конъюгата TOPA-[C7]-фенил-DBCO-PSMB127 с CAR = 2. При
 помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel
 G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный
 конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура;

колонку элюировали буфером DPBS (1x, без кальция и магния); расход: 0,7 мл/мин; время анализа — 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Стадия 2. Хелатирование. Получали маточные растворы следующих солей металлов в чистой воде:

Соль	№ по каталогу	Концентрация
Хлорид церия (III)	Sigma кат. № 429406	10 мМ
Гексагидрат хлорида неодима (III)	Sigma кат. № 289183	10 мМ
Хлорид тербия (III)	Sigma кат. № 451304	10 мМ
Хлорид лютеция (III)	Sigma кат. № 450960	10 мМ
Хлорид тулия (III)	Sigma кат. № 451304	10 мМ
Хлорид иттрия (III)	Sigma кат. № 451363	10 мМ
Хлорид гольмия (III)	Sigma кат. № 450901	10 мМ

5

Растворы металлов добавляли в TOPA-[C7]-фенил-DBCO-PSMB127 в 5-кратном молярном избытке (6,8 мкМ антитела, 34 мкМ иона металла) в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,2, и инкубировали в течение 2 часов при 37 °С. Избыток металла удаляли путем обессоливания с помощью колонки Zeba® (ThermoFisher®) с последующим двумя циклами разбавления 10x и концентрирования в концентраторе 50K MWCO Amicon (EMD Millipore®). Хелатирование оценивали с помощью ЖХ-МС с интактной и восстановленной массой.

10

Стадия 3. Определение стабильности. Для определения стабильности хелата выполняли провокационное введение ДТРА. 50 мкл образца (6,3 мкМ антитела) объединяли с 50 мкл 10 мМ ДТРА, pH 6,5, и инкубировали при 37 С в течение ночи. Хелатирование оценивали с помощью ЖХ-МС с интактной и восстановленной массой. ЖХ-МС проводили на системе ВЭЖХ Agilent 1260, соединенной с масс-спектрометром Agilent G6224 MS-TOF. ЖХ проводили на колонке Agilent RP-mAb C4 (2,1 x50 мм, 3,5 мкм) при скорости потока 1 мл/мин с подвижной фазой 0,1% муравьиной кислоты в воде (А) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (Sigma-Aldrich кат. № 34688) (В) и градиентом 20% В (0–2 мин), 20–60% В (2–3 мин), 60–80% В (3–5,5 мин). Прибор работал в положительном режиме электрораспылительной ионизации и сканировал диапазон m/z от 600 до 6000. Спектр значений масса/заряд подвергали деконволюции с использованием алгоритма максимальной энтропии и относительные количества соответствующих веществ оценивали по высоте массовых пиков после деконволюции. Настройки прибора включали: напряжение на капиллярах 3500 В; фрагментатор 175 В;

15

20

25

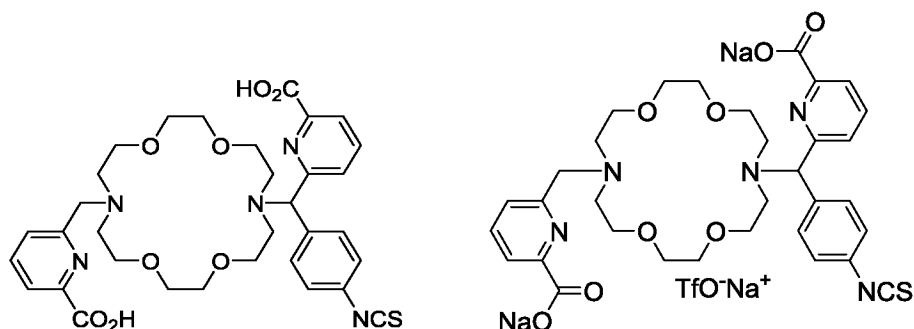
скиммер 65 В; температура газа 325 С; поток высушивающего газа 5,0 л/мин; давление небулайзера 30 фунт/кв. дюйм изб.; диапазон режима накопления 100–7000 с частотой сканирования 0,42.

Изменения MW относительно ТОРА-[С7]-фенил-DVCO-PSMB127 наблюдали для образцов церия и неодима. Интактная масса конъюгата, инкубированного с церием, показала увеличение MW 139 (20% по площади пика) или 276 (77%) Да, что соответствует добавлению 1 или 2 ионов церия. После провокационного введения ДТРА массы оставались сходными с аналогичным содержанием (30 и 67% для форм +138 и +274).

10

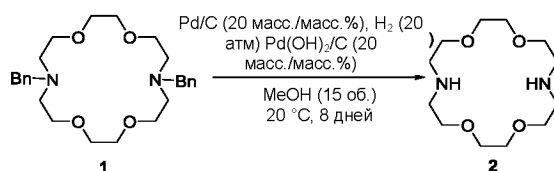
Пример 19

6-((16-((6-Карбоксипиридин-2-ил)(4-изотиоцианатофенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизаациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота (H₂bp18с6-бензил-фенил)(ТОРА-[С7]-фенилизотиоцианат и натриевые солевые формы



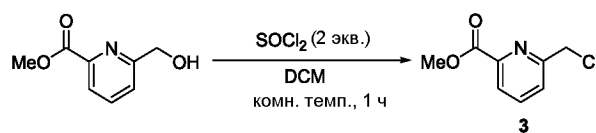
15

Соединение **2** получали аналогично существующим способам, описанным в литературе, см. J. Org. Chem; 1987, 52, 5172.

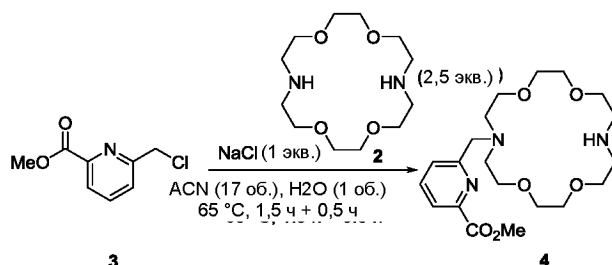


20

Соединение **3** получали аналогично существующим способам, описанным в литературе, см. Chemistry – a European Journal; 2015, 21, 10179.

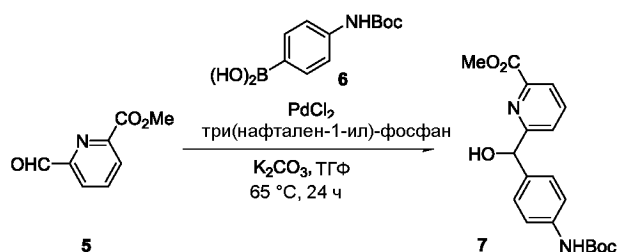


Получение соединения 4



- 5 1,4,10,13-Тетраокса-7,16-диазациклооктадекан (494 г, 1,88 моль, 2,5 экв.), NaCl (44,1 г, 0,75 моль, 1,0 экв.), H₂O (140 мл, 1 объем относительно соединения **3**) и ацетонитрил (2,1 л, 15 объемов) загружали в реактор объемом 10 л в атмосфере N₂ при 15–20 °C и нагревали до 65 °C. К полученной смеси добавляли раствор соединения **3** (140 г, 0,75 моль) в ацетонитриле (280 мл, 2 объема) по каплям в течение 1 часа при 65 °C. Раствор
- 10 выдерживали при 65 °C в течение 0,5 часа. ЖХМС-анализ смеси показал завершение реакции. Смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали в вакууме. К смеси добавляли ацетон (700 мл, 5 объемов) и перемешивали суспензию в течение еще 1 часа. Смесь фильтровали (отфильтрованное твердое вещество было непрореагировавшим соединением **2**). Фильтрат концентрировали в вакууме,
- 15 впоследствии растворяли в DCM (1,4 л, 10 объемов). Органическую фазу промывали водой (3 x 750 мл) и органическую фазу сушили над Na₂SO₄, впоследствии концентрировали под вакуумом с получением соединения **4**, 212 г (выход 63%, анализ: 85 мас.%). ЖХМС: (ЭР, m/z): 412,15 [M+H]⁺ ¹H-ЯМР (300 МГц, DMSO-*d*₆, м.д.): δ 7,98–
- 20 7,87 (м, 2H), 7,81 (дд, *J* = 6,4, 2,6 Гц, 1H), 3,87 (с, 3H), 3,81 (с, 2H), 3,61–3,38 (м, 16H), 2,77 (дт, *J* = 19,0, 5,2 Гц, 8H).

Получение соединения 7



Метил 6-формилпиколинат **5** (250 г, 1,0 экв.), (4-((трет-бутоксикарбонил)амино)фенил)бороновую кислоту **6** (538 г, 1,5 экв.) и дегазированный ТГФ (6,5 л, 26 объемов по отношению к **5**) загружали в реактор объемом 10 л в атмосфере N₂ при 15–20° С. После этого добавляли PdCl₂ (14,0 г, 0,05 экв.),

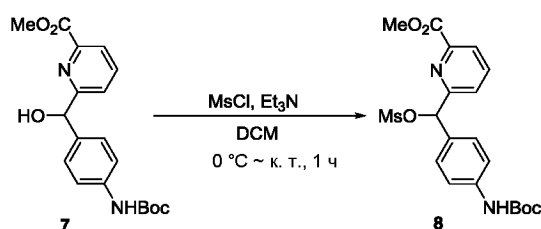
5 три(нафтален-1-ил)-фосфан (31 г, 0,05 экв.) и K₂CO₃ (650 г, 3,1 экв.). Полученный в результате раствор перемешивали при 20 °С в течение 0,5 часа. Смесь впоследствии нагревали до 65 °С и выдерживали в течение 17 часов. Анализ методом ЖХМС показал, что эта реакция завершилась. Полученный раствор охлаждали при комнатной температуре и разбавляли ледяной водой (2,5 л, 10 объемов) и этилацетатом (5 л, 20

10 объемов). Смесь перемешивали, а впоследствии фильтровали через целит. Раствор оставляли для разделения и нижний водный слой отбрасывали. Органическую фазу промывали водой (2 x 1,5 л, 12 объемов). Слои разделяли, а органический слой сушили над Na₂SO₄, затем концентрировали в вакууме. Полученный остаток обрабатывали гептаном (1,25 л, 5 объемов) и полученную суспензию перемешивали в течение 0,5

15 часа. Смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали н-гептаном (500 мл, 2 объема) с получением 530 г (выход 98%, чистота по проценту площади пика жидкостной хроматографии (LCAP): 90%) желаемого продукта **7** в виде желтого твердого вещества, которое использовали напрямую на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС: (ЭР, m/z): 381,10 [M+Na]⁺ ¹H-ЯМР (300 МГц, DMSO-*d*₆, м.д.): δ 9,27 (с, 1H), 8,03–7,85 (м, 2H), 7,79 (дд, *J* = 7,7, 1,4 Гц, 1H), 7,39 (д, *J* = 8,4 Гц, 2H), 7,26 (д, *J* = 8,4 Гц, 2H), 6,13 (д, *J* = 4,0 Гц, 1H), 5,72 (д, *J* = 3,9 Гц, 1H), 3,87 (с, 3H), 1,46 (с, 9H).

20

Получение соединения **8**

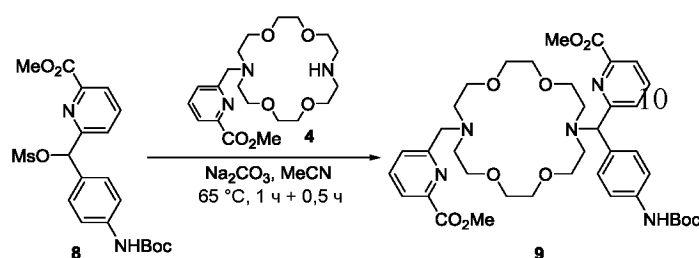


25 Метил 6-((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)фенил)(гидрокси)метил)пиколинат **7** (310 г, 1,0 экв.), триэтиламин (219 г, 2,5 экв.) и DCM (6,2 л, 20 объемов относительно соединения **7**) загружали в реактор объемом 10 л в атмосфере азота при 15–20°С и раствор охлаждали до 0° С По каплям добавляли метансульфонилхлорид (99,2 г, 1,0 экв.) в течение 30 мин при температуре 0 ° С Охлаждающую баню удаляли и

30 температуре позволяли достичь температуры окружающей среды и впоследствии

выдерживали в течение 1 часа при этой температуре. Раствор концентрировали в вакууме при 10–15 °С и остаток впоследствии растворяли в ацетонитриле (438 мл, 2 объема). Полученный раствор концентрировали в вакууме с получением 518 г (неочищенный) желаемого продукта **8**. Этот неочищенный продукт напрямую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

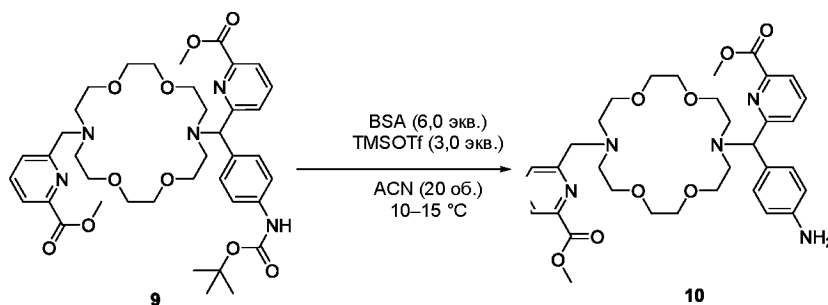
Получение соединения **9**



15 Метил 6-((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)фенил)-
 ((метилсульфонил)окси)метил)пиколинат **8** (212 г, 1,0 экв. чистота 85% по Q-ЯМР),
 Na_2CO_3 (137,6 г, 3,0 экв.) и ацетонитрил (3,56 л, 20 объемов по отношению к
 соединению **8**) загружали в реактор объемом 10 л в атмосфере азота при комнатной
 температуре, впоследствии смесь нагревали до 65 °С и выдерживали в течение 1 часа.
 20 По каплям добавляли раствор метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизаациклооктадекан-
 7-ил)метил)пиколината **4** (377,8 г, 2,0 экв.) в ацетонитриле (3 л, 10 объемов) в течение
 0,5 часа при 65 °С. Смесь выдерживали при этой температуре до тех пор, пока анализ
 ВЭЖХ не показал завершения реакции. Полученный раствор охлаждали при комнатной
 температуре, впоследствии фильтровали и осадок на фильтре промывали MeOH (2 x 1
 25 объем). Фильтрат концентрировали в вакууме и полученный остаток растворяли в EA
 (700 мл), впоследствии добавляли силикагель (800 г, тип: ZCX-2, 100–200 меш, 2,11
 масс./масс.). Смесь концентрировали в вакууме, сохраняя температуру ниже 35 °С.
 Силикагель (9,6 кг, тип: ZCX-2, 100–200 меш, 26,3 масс./масс.) загружали в колонку, а
 затем загружали подготовленный сухой силикагель, содержащий адсорбированное
 30 неочищенное соединение **9**. Колонку элюировали смесью этилацетат : петролейный
 эфир : дихлорметан (3 : 3 : 1) / метанол : дихлорметан (1 : 1) (градиент от 100 : 0 до 90 :
 10 с отбором проб каждые 4 л ± 0,5 л). Фракции анализировали с помощью ТСХ
 (этилацетат : петролейный эфир : дихлорметан : метанол = 4 : 4 : 1 : 1). Содержащие
 продукт фракции объединяли и концентрировали с получением 260 г соединения **9** в

виде желтого твердого вещества (ВЭЖХ: 94%, кЯМР: 92%). Дополнительные 70 г соединения **9** получали в виде желтого масла (ВЭЖХ: 75%, кЯМР: 60%). ЖХМС (ЭР, m/z): 752,30 $[M+H]^+$ наблюдаемое m/z 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, $m. d.$): δ 7,53–7,32 (м, 3H), 7,28–7,18 (м, 3H), 6,86 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H), 6,76 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H), 6,09 (с, 1H), 4,63 (с, 1H), 3,48 (с, 3H), 3,44 (уш.с., 5H), 3,17–2,92 (м, 16H), 2,38 (дк, $J = 25,0$, 7,2, 6,8 Гц, 8H), 0,97 (с, 9H).

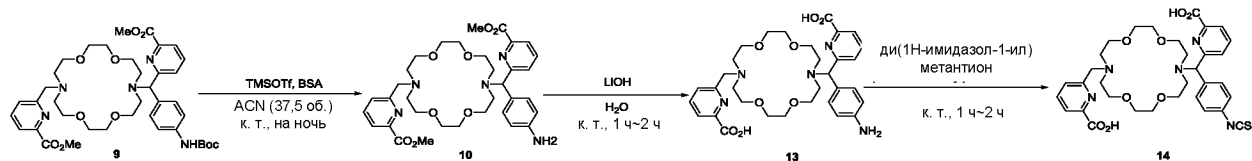
Получение соединения **10**



Соединение **9** (260 г, кЯМР: 92%, 1,0 экв.), N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (BSA, 6,0 экв.) и ацетонитрил (4 л, 15 объемов) загружали в реактор объемом 10 л в атмосфере азота при 15–20 °С. Смесь перемешивали в течение 40 мин при 20 °С. Раствор TMSOTf (212,9 г, 3,0 экв.) в ацетонитриле (1,3 л, 5 объемов) вводили по каплям в течение 0,5 часа при поддержании внутренней температуры в диапазоне 15–20 °С. Раствор выдерживали в течение 1 ч при 15–20 °С. Когда технологический анализ (система подготовки образцов 0,1 мл + 0,9 мл ACN + одна капля диизопропилэтиламина) показал полное превращение исходного материала, смесь гасили диизопроилэтиламино (617 г, 15,0 экв.), поддерживая температуру в диапазоне 5–10 °С. Смесь перемешивали в течение 20 минут при 5–10 °С, впоследствии загружали насыщенный водный раствор NH_4Cl (2,6 л, 10 объемов), поддерживая температуру в диапазоне 5–10 °С. Смесь выдерживали при этой температуре в течение дополнительных 30 минут. Водную фазу (содержание твердых веществ) собирали и экстрагировали 2-МеТГФ (520 мл, 2 объема). Органические фазы объединяли и проверяли на содержание воды с помощью KF (KF: 9,18%), впоследствии сушили над безводным Na_2SO_4 (500 г, 10,0 экв.). Твердые вещества удаляли фильтрованием и осадок на фильтре промывали ацетонитрилом (2 x 520 мл, 2 объема). Фильтраты впоследствии сушили безводным Na_2SO_4 (500 г, 10,0 экв.). После фильтрации осадок на фильтре промывали ацетонитрилом (2 x 520 мл, 2 объема) и проверяли содержание воды с помощью KF (KF: 8,15%). Поток соединения **10** в ацетонитриле/2-МеТГФ

использовали напрямую на следующей стадии. (Продукт не был стабильным для условий ЖХМС).

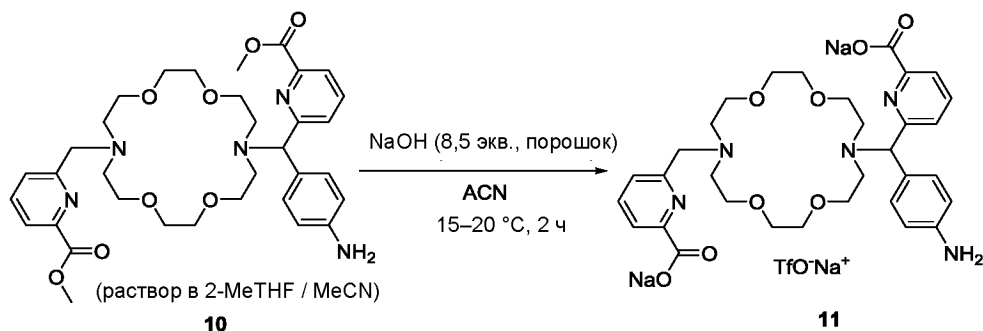
Получение соединения 14 (свободной кислоты)



- 5 Метил 6-(((4-((трет-бутоксикарбонил)амино)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат (6,0 г, 1,0 экв.) и BSA (9,7 г, 6,0 экв.) и MeCN (120 мл, 20 объемов по отношению к соединению 9) загружали в реактор объемом 500 мл в атмосфере азота при комнатной температуре. Раствор TMSOTf (5,4 г, 2,3 экв.) в MeCN (120 мл, 20 объемов) добавляли по каплям в течение 30 мин при комнатной температуре. Смесь выдерживали в течение ночи при комнатной температуре. Анализ смеси (система подготовки образца 0,1 мл + 0,9 мл ACN + одна капля диизопропилэтиламина) показал, что реакция завершилась. Смесь гасили диизопропилэтиламино (15,4 г, 15,0 экв.), поддерживая температуру в диапазоне 0–5 °С. Смесь перемешивали в течение 5 минут при 0–5 °С, впоследствии вводили по каплям насыщенный водный раствор NH₄Cl (60 мл, 10 объемов), поддерживая температуру в диапазоне 0–5° С. Водную фазу удаляли экстракцией и органические фазы собирали и использовали напрямую на следующей стадии. Органическую фазу помещали в трехгорлую круглодонную колбу объемом 500 мл и к раствору добавили раствор LiOH (1,15 г, 6,0 экв.) в воде (60 мл, 10 об.) при комнатной температуре. Раствор перемешивали в течение 1 часа при этой температуре. Анализ смеси (система подготовки образца 0,1 мл + 0,9 мл ацетонитрила) не показал полного превращения. Добавляли еще одну часть LiOH (576 мг, 3,0 экв.) и раствор перемешивали в течение еще 1 часа при комнатной температуре. Анализ смеси (система подготовки образца 0,1 мл + 0,9 мл ацетонитрила) показал завершение реакции. Далее добавили TCDI (5,6 г, 3,9 экв.) и раствор перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Анализ смеси (система подготовки образца 0,1 мл + 0,9 мл ацетонитрила) не показал полного превращения. Добавляли еще одну часть TCDI (2,8 г, 2,0 экв.) и раствор перемешивали в течение еще 1 часа при комнатной температуре. Анализ смеси (система подготовки образца 0,1 мл + 0,9 мл ацетонитрила) показал завершение реакции. Реакционный раствор разделяли с помощью обращенно-фазной хроматографии Combi-Flash: способ: колонка C18, раствор А: H₂O (содержащая 0,01%

муравьиной кислоты), раствор В: ACN; от 5% до 35% в течение 40 мин, поток (100 мл/мин), элюирование продукта на 20–25 мин. Раствор собирали. Раствор концентрировали для удаления ACN и снова разделяли с помощью обращенно-фазной хроматографии Combi-Flash: способ: колонка C18, раствор А H₂O, раствор В ACN; 5% 10 мин, от 5% до 35% в течение 5 мин, 95% 10 мин, поток (100 мл/мин), элюирование продукта на 13–25 мин. Раствор собирали. Раствор концентрировали в вакууме при < 20 °С и сушили лиофилизацией. В результате получали 2,5 г (выход за 3 стадии 47%) соединения **14** в виде желтого твердого вещества. Соединение **14** (6-((16-((6-карбоксопиридин-2-ил)(4-изотиоцианатофенил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколиновая кислота) требовала хранения при -80 °С. ЖХМС: (ЭР, *m/z*): 666,3 [M+H]⁺ ¹H-ЯМР: (400 МГц, D₂O, *м.д.*): 7,94–7,84 (м, 4H), 7,56–7,40 (м, 4H), 7,16–7,14 (м, 2H), 5,83 (с, 1H), 4,56 (с, 2H), 3,80–3,75 (м, 8H), 3,60–3,49 (м, 14H), 3,36–3,33 (м, 2H).

Получение соединения 11 (натриевая соль)

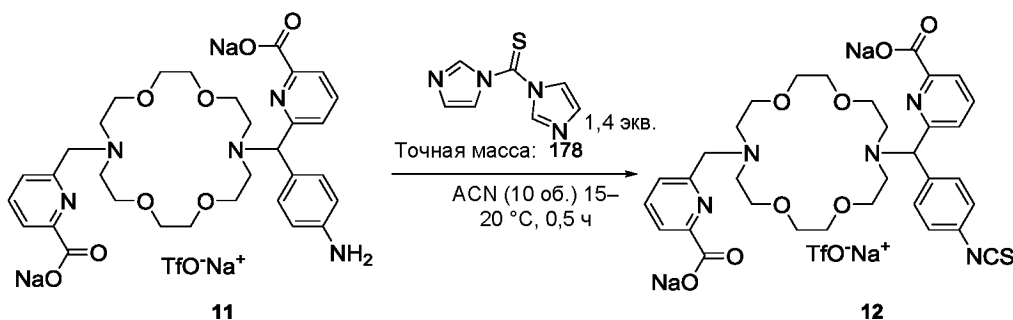


Полученный раствор соединения **10** в ACN и 2-МеТГФ помещали в 4-горлую реакционную колбу объемом 10 л и раствор охлаждали до 5–10 °С. Добавляли порошок NaOH (56,9 г, 4,5 экв.), поддерживая температуру в диапазоне 5–10 °С. Раствор перемешивали в течение 0,5 ч при 15–20 °С. Анализ смеси (система подготовки образца 0,1 мл + 0,9 мл ацетонитрила) не показал превращения. Добавили дополнительный порошкообразный NaOH (25,3 г, 2,0 экв.) при 5–10 °С. Полученный раствор выдерживали в течение дополнительных 0,5 ч при 15–20 °С. Второй технологический контроль (ИРС) был проанализирован и показал 50% превращение. Последнюю порцию порошкообразного NaOH (25,3 г, 2,0 экв.) добавили при 5–10 °С. Смесь перемешивали в течение еще 0,5 ч при 15–20 °С. Анализ показал полное превращение исходного материала **10**. Смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали ацетонитрилом (2 x 520 мл, 2 объема). Конечный раствор (~7,5 л, 28,8 объемов) концентрировали до 1–2 объемов, поддерживая температуру в диапазоне 15–20 °С. Впоследствии остаток

обрабатывали ацетонитрилом (2 л, 7,7 объема), а содержание воды проверяли с помощью KF (KF: 5,7%). Смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали ACN (2 x 520 мл, 2 объема). Впоследствии раствор концентрировали до 1–2 объема под вакуумом при 15–20 °С. Содержание воды снова проверяли с помощью KF (KF: 5,5%).

5 Раствор разбавляли ацетонитрилом (390 мл, 1,5 объема) и добавляли по каплям в течение 0,5 часа в МТВЕ (2,6 л, 10 объемов), поддерживая температуру в диапазоне 15–20 °С. Растворители декантировали, оставляя вязкое масло, которое повторно растворяли в ацетонитриле (520 мл, 2 объема) и добавляли в МТВЕ (2,6 л, 10 объемов). Этот процесс повторяли еще четыре раза. В итоге получили вязкое масло, которое в
10 конечном итоге растворяли в ацетонитриле (520 мл, 2 объема) и сушили, впоследствии концентрировали при 15–20 °С при пониженном давлении. Впоследствии остаточные растворители удаляли путем выпаривания масляным насосом при 15–20 °С. После сушки 335 г соединения **11** получали в виде твердого вещества почти желтого цвета (кЯМР: 70%, общий выход 87% за две стадии). ЖХМС (ЭР, m/z): 624,3 [M-TfONa-2Na+3H]⁺ ¹H-ЯМР (300 МГц, метанол-d₄, м.д.): δ 7,97 (дд, J = 7,8, 2,1 Гц, 2H), 7,84 (т, J = 7,7 Гц, 1H), 7,75 (т, J = 7,8 Гц, 1H), 7,36 (дд, J = 7,8, 1,1 Гц, 1H), 7,23 (д, J = 7,7 Гц, 1H), 7,11 (д, J = 8,5 Гц, 2H), 6,72 (д, J = 8,5 Гц, 2H), 3,96 (с, 1H), 3,83–3,36 (м, 18H), 3,03–2,62 (м, 6H), 2,55 (д, J = 14,3 Гц, 2H).

Получение соли соединения **12** (ТОРА-[C7]-фенилизотиоцианат натрияевая соль)



20

ТСДИ (68,7 г, 1,4 экв.) и ацетонитрил (2,6 л, 8 объемов) загружали в реактор объемом 10 л в атмосфере азота при 15–20 °С. Раствор соединения **11** (330 г, соль Na⁺, кЯМР: 70%, 1,0 экв.) в ацетонитриле (660 мл, 2 объема) добавляли по каплям в течение
25 30 мин, поддерживая температуру в диапазоне 15–20 °С. Смесь выдерживали в течение 0,5 часа при 15–20 °С. Анализ смеси (система приготовления образца 30 мкл + 300 мкл ACN + капля воды) показал, что реакция завершилась. Содержание воды проверяли с помощью KF (KF: 0,19%). Систему сушили и концентрировали при 15–20 °С при

пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в ацетонитриле (945 мл, 2,9 объема) и измеряли содержание воды с помощью KF (KF: 0,34%). В раствор вводили изопропилацетат (660 мл, 2 объема) в течение 40 минут при 15–20 °С. Образования активных центров кристаллизации не наблюдали и медленно вводили по каплям

5 дополнительное количество изопропилацетата (6,6 л, 18 объемов) в течение 40 мин при 15–20 °С, что привело к осаждению продукта **12**, который собирали путем фильтрации в виде твердого вещества почти желтого цвета. Твердое вещество растворяли в ацетонитриле (330 мл, 1 объем) и медленно вводили по каплям IPAc (6,6 л, 20 объемов) в течение 40 мин при 15–20 °С. Смесь фильтровали с получением 230 г продукта в виде

10 твердого вещества почти желтого цвета (LCAP: 80,99%, кЯМР: 59%, 10% IPAc). Влажный осадок сушили в вакууме в течение 2 часов при 15–20 °С с получением 224 г неочищенного соединения **12** в виде твердого вещества почти желтого цвета (LCAP: 80,9%, кЯМР: 60,4%, ~6% IPAc). Неочищенное соединение **12** повторно растворяли в ацетонитриле (330 мл, 1 объем) и медленно вводили по каплям изопропилацетат (412

15 мл, 1,25 объема) в течение 40 минут при 15–20 °С. Полученную смесь фильтровали и собирали соединение **12** (30,5 г, ВЭЖХ = 60,9%, анализ: 25,5%). Маточные растворы разбавляли изопропилацетатом (6,6 л, 20 объемов), добавленными в течение 40 минут при 15–20 °С. Смесь фильтровали и осадок сушили с получением 173,5 г неочищенного

20 продукта **12** в виде твердого вещества почти желтого цвета (LCAP: 85,4%, кЯМР: 66%, 3,9% IPAc, RRT1.19 = 3,9%). 190 г неочищенного соединения **12** растворяли в 760 мл ацетонитрил : изопропилацетат (2 : 1) и смесь пропускали через колонку с силикагелем (380 г, 2 х). Силикагель промывали ацетонитрилом : изопропилацетатом (2 : 1, 5,7 л) и впоследствии 12 л ацетонитрила (очень мало продукта). Фракцию, содержащую

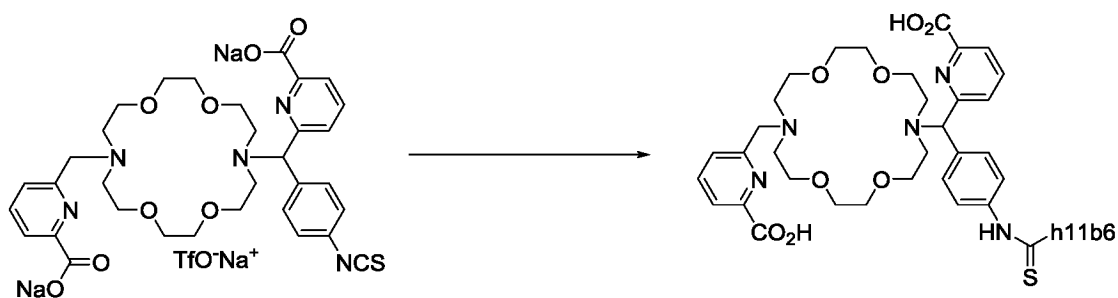
25 продукт, концентрировали с получением 118 г продукта **12** в виде твердого вещества почти желтого цвета (LCAP: 95%). Впоследствии слой силикагеля промывали MeCN/H₂O (12 л, 10 : 1). Растворители удаляли в вакууме с получением еще 60 г неочищенного соединения **12** в виде твердого вещества почти желтого цвета, которое

30 растворяли в ацетонитриле (1,5 л), перемешивали в течение 30 мин, впоследствии фильтровали. Впоследствии маточный раствор концентрировали с получением 24 г неочищенного соединения **12** в виде твердого вещества почти желтого цвета (LCAP = 92%). Неочищенное соединение **12** (118 г) и неочищенное соединение **12** (24 г), полученные, как описано выше, растворяли в ацетонитриле (330 мл, 1 объем) и добавляли изопропилацетат (6,6 л, 20 объемов) по каплям в течение 40 мин при 15–20 °С. Впоследствии смесь фильтровали с получением 133 г соединения **12** в виде твердого

вещества почти желтого цвета приемлемой чистоты (LCAP: 95%, кЯМР: 60,8%, 7,8% IPAc). Следует отметить, что соединение **12** требовало хранения при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. ЖХМС: (ЭР, m/z): 666,61 $[\text{M-TfONa-2Na+3H}]^{+}$ $^1\text{H-ЯМР}$: (400 МГц, метанол- d_4 , м.д.): δ 8,00 (дд, $J = 13,8, 7,7, 1,0$ Гц, 2H), 7,84 (дт, $J = 20,4, 7,7$ Гц, 2H), 7,58–7,49 (м, 2H), 7,40 (дд, $J = 7,6, 1,0$ Гц, 1H), 7,36–7,28 (м, 2H), 7,28–7,20 (м, 1H), 4,96 (гепт, $J = 6,3$ Гц, 1H), 3,96–3,88 (м, 1H), 3,83 (д, $J = 15,1$ Гц, 1H), 3,70–3,52 (м, 11H), 3,55–3,39 (м, 4H), 3,07–2,73 (м, 6H), 2,62 (дт, $J = 15,1, 3,6$ Гц, 2H).

Пример 20

Антительный конъюгат ТОРА-[C7]-фенилтиомочевины-h11b6



10

(В указанном выше конъюгате ТОРА-[C7]-фенилтиомочевина-антитело h11b6 структура не показывает остаток лизина h11b6, который связан с функциональной группой фенилтиомочевины).

15 *Модификация МАт с помощью ТОРА-[C7]-фенилтиомочевины*

МАт h11b6 (10,2 мг/мл) разбавляли до 1 мг/мл с помощью 10 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 5,2. Непосредственно перед конъюгированием рН доводили до 9 с помощью бикарбонат-натриевого буфера (VWR 144-55-8). рН подтверждали с помощью рН-бумаги. Впоследствии к 10-кратному молярному избытку динатриевой соли ТОРА-[C7]-фенилизотиоцианата натриевой соли (50 мМ маточный раствор, разведенный в воде) добавляли МАт h11b6, и инкубировали смесь антитела и натриевой соли ТОРА-[C7]-фенилизотиоцианата при комнатной температуре без встряхивания в течение приблизительно 1 часа. Добавление натриевой соли ТОРА-[C7]-фенилизотиоцианата контролировали с помощью интактной масс-спектрометрии ESI-TOF ЖХ-МС на приборе Agilent® G224 до тех пор, пока значение CAR не составило 1,5–2,0. Впоследствии смесь немедленно гасили добавлением 1М Tris рН 8,5 (Teknova T1085) до получения конечной концентрации 100 мМ. Избыток свободного хелатора удаляли путем реакции обессоливания в 10 мМ ацетате натрия, рН 5,2, с использованием обессоливающей колонки 7K Zeba®. Для подтверждения отсутствия

25

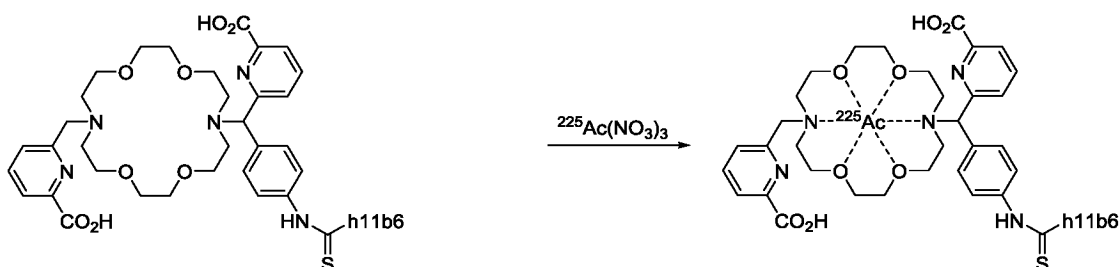
избытка хелатора проводили циклы 3-кратного разбавления образца до 15 мл с последующим концентрированием до 1 мл с использованием концентрирующего устройства 50 000 MWCO Amicon. Впоследствии образец концентрировали до конечной концентрации для мечения радиоактивной меткой. При помощи

5 аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWx1 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали 0,2 М фосфатом натрия, pH 6,8; расход: 0,8 мл/мин; время анализа — 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

10

Пример 21

Ac-225-меченый антительный конъюгат ТОРА-[С7]-фенилтиомочевины-h11В6



15 (В указанном выше Ac-225-меченом конъюгате ТОРА-[С7]-фенилтиомочевина-антитело h11В6 структура не показывает остаток лизина h11b6, который связан с функциональной группой фенилтиомочевины).

(i) Мечение ТОРА-[С7]-фенилтиомочевины-h11В6 с помощью Ac-225 в буфере 3 М NaOAc

20 К раствору NaOAc (3 М в H₂O, 60 мкл) в пластиковом сосуде добавляли последовательно Ac-225 (10 мКи/мл в 0,1 Н HCl, 15 мкл), а также ТОРА-[С7]-фенилтиомочевину-h11В6 (1,13 мг/мл в 10 мМ NaOAc pH = 5,5, 441 мкл, 0,5 мг). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Сосуд оставляли для выдержки при 37 °С в течение 2 ч.

бТСХ реакционной смеси для мечения

25 0,5 мкл реакционной смеси для мечения наносили на бТСХ-СГ и проявляли 10 мМ EDTA (pH 5–6). Высушенные полоски бТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, Ac-225, связанный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6,

остается в исходной точке, а весь свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование БТСХ показало, что 99,9% Ас-225 связано с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6.

Провокационное введение ДТРА в реакционную смесь для мечения

5 0,5 мкл реакционной смеси для мечения также смешивали с 10 мМ ДТРА (рН = 6,5, 15 мкл) при 37 °С. Через 30 мин 10 мкл смеси наносили на БТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски БТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в
10 настоящем документе, Ас-225, хелатированный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6, остается в исходной точке, а весь свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование БТСХ показало, что 99,7% ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6 было хелатировано Ас-225.

Очистка на колонке PD10

15 Смола PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл × 3 буфера NaOAc (25 мМ NaOAc, 0,04% PS-20, рН 5,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь для мечения вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционный сосуд промывали 0,2 мл × 3 буферным раствором NaOAc (25 мМ NaOAc, 0,04% PS-20, рН
20 5,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (25 мМ NaOAc, 0,04% PS-20, рН 5,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл. Радиохимическую чистоту собранных фракций проверяли методом БТСХ: 10 мкл каждой собранной фракции
25 наносили на БТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски БТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. Чистая фракция не должна иметь сигнала радиоактивности на фронте растворителя БТСХ-СГ.

30 *Провокационное введение ДТРА, очистка ²²⁵Ас-ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6*

10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (рН 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на БТСХ-СГ, проявляли 10 мМ EDTA и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В фронте

растворителя бТСХ-СГ сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ас-225 во фракции №3.

ВЭЖХ-анализ, очистка ²²⁵Ас-ТОРА-[С7]-фенилтиомочевины-h11B6

Фракцию №3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ.

5 Способ ВЭЖХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); расход: 0,7 мл/мин; время анализа — 20 мин; объем введенной пробы: 40 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 секунд или 1 минута. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре.

10 Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику ТОРА-[С7]-фенилтиомочевины-h11B6 на УФ-кривой ВЭЖХ.

(ii) Мечение ТОРА-[С7]-фенилтиомочевины-h11B6 с более высокой
15 концентрацией с помощью Ас-225 в буфере 1,5 М NaOAc

К раствору NaOAc (1,5 М в H₂O с 0,04% PS-20, 63 μл) в пластиковом сосуде добавляли последовательно Ас-225 (10 мКи/мл в 0,1 н HCl, 10 мкл), а также ТОРА-[С7]-фенилтиомочевину-h11B6 (9,36 мг/мл в 10 мМ NaOAc pH = 5,2, 0,04% PS-20, 36 мкл, 337 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным
20 измерения pH-бумагой. Сосуд оставляли для выдержки при 37 °С в течение 2 ч.

бТСХ реакционной смеси для мечения

0,5 мкл реакционной смеси для мечения наносили на бТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски бТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной
25 тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, Ас-225, связанный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6, остается в исходной точке, а весь свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование бТСХ показало, что 99,9% Ас-225 связано с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6.

30 *Провокационное введение ДТРА в реакционную смесь для мечения*

0,5 мкл реакционной смеси для мечения также смешивали с 10 мМ ДТРА (pH = 6,5, 15 мкл) при 37 °С. Через 30 мин 10 мкл смеси наносили на бТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски бТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной

тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, Ас-225, хелатированный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6, остается в исходной точке, а весь свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование бТСХ показало, что 99,9% ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6 было хелатировано с Ас-225.

(iii) Мечение ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6 с более высокой концентрацией с помощью Ас-225 в буфере 1 М NaOAc

К раствору NaOAc (1,0 М в H₂O с 0,04% PS-20, 63 мкл) в пластиковом сосуде добавляли последовательно Ас-225 (10 мКи/мл в 0,1 Н HCl, 10 мкл), а также ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6 (9,36 мг/мл в 10 мМ NaOAc pH = 5,2, 0,04% PS-20, 36 мкл, 337 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Сосуд оставляли для выдержки при 37 °С в течение 2 ч.

бТСХ реакционной смеси для мечения

0,5 мкл реакционной смеси для мечения наносили на бТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски бТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, Ас-225, связанный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6, остается в исходной точке, а весь свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование бТСХ показало, что 99,9% Ас-225 связано с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6.

Провокационное введение ДТРА в реакционную смесь для мечения

0,5 мкл реакционной смеси для мечения также смешивали с 10 мМ ДТРА (pH = 6,5, 15 мкл) при 37 °С. Через 30 мин 10 мкл смеси наносили на бТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски бТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, Ас-225, хелатированный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6, остается в исходной точке, а весь свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование бТСХ показало, что 99,9% ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6 было хелатировано с Ас-225.

Маркирование ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11В6 с более высокой концентрацией с помощью Ас-225 в 25 мМ NaOAc с 0,4% tween-20, pH 5,5

К раствору NaOAc (25 мМ в H₂O с 0,04% PS-20, pH 5,5, 10 мкл) в пластиковом сосуде добавляли последовательно Ac-225 (10 мКи/мл в 0,1 Н HCl, 5 мкл), ТОРА-[С7]-фенилтиомочевину-h11B6 (10,4 мг/мл в 10 мМ NaOAc pH = 5,2, 16 мкл, 166 мкг) и NaOH (0,1 М, 5 мкл). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,0 по данным измерения pH-бумагой. Сосуд оставляли для выдержки при 37 °С в течение 2 ч.

бТСХ реакционной смеси для мечения

0,5 мкл реакционной смеси для мечения наносили на бТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски бТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, Ac-225, связанный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6, остается в исходной точке, а весь свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование бТСХ показало, что 99,9% Ac-225 связано с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6.

Провокационное введение ДТРА в реакционную смесь для мечения

0,5 мкл реакционной смеси для мечения также смешивали с 10 мМ ДТРА (pH = 6,5, 15 мкл) при 37 °С. Через 30 мин 10 мкл смеси наносили на бТСХ-СГ и проявляли с помощью 10 мМ EDTA. Высушенные полоски бТСХ-СГ оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для радиоактивной тонкослойной хроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, Ac-225, хелатированный с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6, остается в исходной точке, а весь свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем к фронту растворителя. Сканирование бТСХ показало, что 99,8% Ac-225 было хелатировано с ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6.

Условия реакции мечения ТОРА-[С7]-фенилтиомочевинной-h11B6 с помощью Ac-225

ТОРА-[С7]-фенилтиомочевина-h11B6 в буфере	Буфер для реакции мечения	Радиохимический выход (бТСХ)	Провокационное введение ДТРА
1,13 мг/мл в 10 мМ NaOAc pH = 5,5	3 М NaOAc	> 99%	> 99%
9,36 мг/мл в 10 мМ NaOAc, pH = 5,2; 0,04% PS-20	1,5 М NaOAc, 0,04% PS-20	> 99%	> 99%

ТОРА-[С7]- фенилтиомочевина- h11B6 в буфере	Буфер для реакции мечения	Радиохимический выход (БТСХ)	Провокационное введение ДТРА
9,36 мг/мл в 10 мМ NaOAc, pH = 5,2; 0,04% PS-20	1,0 М NaOAc, 0,04% PS-20	> 99%	> 99%
10,4 мг/мл в 10 мМ NaOAc, pH = 5,2	25 мМ в NaOAc, 0,04% PS-20, pH 5,5	> 99%	> 99%

ПРИМЕР 22. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К KLK2

Получение антител с использованием трансгенных мышей (Ablexis[®]) и трансгенных крыс (OmniRat[®]), экспрессирующих локусы иммуноглобулина

5 человека

Крысы OmniRat[®] содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента VH, все человеческие сегменты D и JH в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом CH), а также полностью человеческие локусы IgL (12 Vk, связанных с Jk-Ск, и 16 Vl, связанных с Jλ-Сλ) (см., например, 10 Osborn, *et al.*, *J Immunol*, 2013, 190(4): 1481–90). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации с образованием высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с 15 полностью человеческими вариабельными областями. Получение и применение OmniRat[®] и геномные модификации в таких крысах описаны в международной публикации № WO14/093908.

Мыши линии Ablexis[®] производят антитела, имеющие вариабельные домены человека, связанные с доменами CH1 и CL человека, химерной человеческой/мышинной шарнирной областью и мышинными областями Fc. Мыши линий Ablexis каппа и лямбда 20 различаются тяжелыми цепями, которые являются человеческими или мышинными, как отмечено ниже. Антитела, продуцируемые мышами линии каппа, не имеют последовательности, полученной из мышинных экзонов VH, DH и JH и мышинных экзонов Vk, Jk и Ск. Эндогенный мышинный Igl активен у мышей линии каппа. Цепи 25 Iгк человека содержат приблизительно 90–95% наивных репертуаров, а цепи Igl мышей содержат приблизительно 5–10% наивных репертуаров в этой линии. Антитела, продуцируемые мышами линии лямбда, не имеют последовательности, полученной из

мышинных экзонов VH, DH и JH и мышинных экзонов V λ , J λ и C λ . Эндogenous мышинный Ig κ активен у мышей линии лямбда. Цепи Ig λ человека содержат приблизительно 40% наивных репертуаров, а цепи Ig κ мыши, содержат приблизительно 60% наивных репертуаров. Получение и применение мышей линии Ablexis® и геномные модификации в таких мышах описаны в международной публикации № WO11/123708.

Мышей Ablexis® и крыс OmniRats® иммунизировали растворимым полноразмерным белком KLK2 (человеческий белок калликреин-2 6-His с аминокислотной последовательностью

10 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAАНCLKKNSQ
VWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLLRLSEP
AKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLLRPRSLQCVSLHYSEKVTEFML
CAGLWTGGKDTCCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWI
KDTIAANPHHHHHH (SEQ ID NO: 454).

15 Лимфоциты от мышей линии Ablexis и крыс линии OniRats экстрагировали из лимфатических узлов и проводили слияния по когортам. Клетки объединяли и сортировали на основании экспрессии CD138. Скрининг гибридомы проводили в формате миниатюрного MSD с высокой пропускной способностью с использованием растворимого антигена к hK2. Было установлено, что приблизительно более

20 300 образцов способны связывать hK2. Связывание более 300 образцов супернатанта антител к hKLK2 с белком KLK2 человека измеряли способом оценки кинетики одиночного цикла с помощью чувствительного элемента Biacore 8K SPR. Кроме того, образцы супернатанта исследовали на связывание с белком KLK3 человека.

Параллельно также тестировали супернатанты на связывание с клеточными линиями, экспрессирующими KLK2, линией VCar и отрицательной клеточной линией DU145

25 методом проточной цитометрии. Выбранные вещества, связывающие клетки, стимулировали для конверсии scFv как в ориентации VH-VL, так и в ориентации VL/VH, а также в тестах оценки термостабильности, как описано выше. KL2B413, KL2B30, KL2B53 и KL2B242 получали в результате иммунизации мышей линии

30 Ablexis. KL2B467 и KL2B494 получали в результате иммунизации крыс линии OmniRat.

Антитела, полученные посредством различных кампаний иммунизации и гуманизации, описанных выше, экспрессировали в формате fab, формате mAb, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH и

дополнительно анализировали, как описано ниже. Линкерную последовательность SEQ ID NO: 7, описанную выше, использовали для конъюгирования областей VH/VL.

Пример 23. Определение структурных характеристик антител к KLK2

5 В настоящем документе представлены переменные домены антитела и фрагменты антител scFv, которые демонстрировали наивысшую эффективность при внутриклеточном анализе. Переменные домены экспрессировали в формате Fab, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH.

10 Переменные домены VH, VL и CDR

В **таблице 3** приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2. В **таблице 4** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к hK2 по Кабату. В **таблице 5** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к hK2 по Кабату. В **таблице 6** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3
15 выбранных антител к hK2 по АбМ. В **таблице 7** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител к hK2 по АбМ. В **таблице 8** представлена обобщенная информация по последовательности переменного домена и SEQ ID NO выбранных антител к hK2. В **таблице 9** показан белок и ДНК SEQ ID NO для областей VH и VL.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2.

Название Ат	Название VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
m11B6	m11B6_VH	DVQLQESGPGLVK PSQSLSLTCTVTG NSITSDYAWNWR QFPGNRLEWGYI SYSGSTTYSPSLKS RFSITRDTSKNQFF LQLNSVTPEDTAT YFCATGYYYGSGF WGQGTLVTVSS	125	m11B6_VL	DIVLTQSPASLAVS LGQRATISCRASES VEYFGTSLMHWY RQKPGQPPKLLIY AASNVEGVPARF SGSGSGTDFSLNIQ PVEEDDFSMYFCQ QTRKVPYTFGGGT KLEIK	124
h11B6	hu11B6_VH	QVQLQESGPGLVK PSDTLSLTCAVSG NSITSDYAWNWR QPPGKGLEWIGYI SYSGSTTYNPSLK SRVTMSRDTSKNQ FSLKLSVTAVD AVYYCATGYYYG SGFWGQGTLVTVS S	5	hu11B6_VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCKASE SVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLI YAASNRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYC QTRKVPYTFGQG TKLEIK	2

Название Ат	Название VH	Аминокислотная последовательность VH	VH c SEQ ID NO:	Название VL	Аминокислотная последовательность VL	VL c SEQ ID NO:
HCF3-LCD6	HCF3_VH	QVQLQESGPGLVK PSDTLSLTCAVSG NSITSDYAWNWR QFPGKGLEWIGYI SYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQF SLKLSSVTPVDTA VYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	6	LCD6_VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCKASE SVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPKLLI YAASNRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTI QSVQAEDVSVYFC QQTRKVPYTFGQG TKLEIK	1
HCG5-LCB7	HCG5_VH	QVQLQESGPGLVK PSDTLSLTCAVSG NSITSDYAWNWR QFPGKGLEWIMGY ISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQF SLKLSSVTPVDTA VYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	4	LCB7_VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCKASE SVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPKLLI YAASNRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTI SSVQAEDVAVVY CQQTRKVPYTFGQ GTKLEIK	3
KL2B357	KL2B357_VH	QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVSG NSITSDYAWNWR QFPGKGLEWIGYI SYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQF SLKLSSVTAADTA VYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	159	KL2B357_VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCRASES VEYFGTSLMHWY QQKPGQPPKLLIY AASNVEESGVPDRF SGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYFCQ QTRKVPYTFGGGT KVEIK	160
KL2B358	KL2B358_VH	QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVSG NSITSDYAWNWR QPPGKGLEWIGYI SYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQF SLKLSSVTAADTA VYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	161	KL2B358_VL	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSCRASE SVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPRLI YAASNVEESGIPAR FSGSGSGTDFTLTI SSVEPEDFAVYFC QQTRKVPYTFGGG TKVEIK	140
KL2B359	KL2B359_VH	QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVSG NSITSDYAWNWR QFPGKRLEWIGYIS YSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFS LKLSSVTAADTAV YYCATGYYYGSG FWGQGTLVTVSS	139	KL2B359_VL	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSCRASE SVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPRLI YAASNVEESGIPAR FSGSGSGTDFTLTI SSVEPEDFAVYFC QQTRKVPYTFGGG TKVEIK	140

Название Ат	Название VH	Аминокислотная последовательность VH	VH c SEQ ID NO:	Название VL	Аминокислотная последовательность VL	VL c SEQ ID NO:
KL2B360	KL2B360_VH	QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVSG NSITSDYAWNWR QFPGKGLEWIGYI SYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQF SLKLSSVTAADTA VYYCATGYYYGS GFWGQGTLVTVSS	159	KL2B360_VL	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSCRASE SVEYFGTSLMHW YQKPGQPPRLLI YAASNVESGIPAR FSGSGSGTDFTLTI SSVEPEDFAVYFC QQTRKVPYTFGGG TKVEIK	140
KL2B413	KL2B413_VH	evqlvesggglvqpggsrl scaasgftfssywmtwvrq apgkglewvanikqdgser yyvsvkgrftisrdnakns lylqmnsraedtavyycar dqnydiltghy gmdvwg qgtvtvss	137	KL2B413_VL	eivltqspflsasvdrvit crasqgissylswyqqkpg kapklliyatstlqsgvpsrfs gsgsgteftlisslqpedfat yycqqlnsyprtfgqgtkve ik	138
KL2B30	KL2B30_VH	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYS GSTNYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYY CAGTTIFGVVTPN FYYGMDVWGQGT TVTSS	162	KL2B30_VL	DIQMTQSPSFLSAS VGDRVTITCRASQ GISSYLAWYQQKP GKAPKFLIYAAS LQSGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQP EDFATYYCQQLNS YPLTFGGGTKVEI K	163
KL2B53	KL2B53_VH	EVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCVAS GFTFSSYDIHWVR QAPGKGLEWVAII SYDGSKKDYTDSV KGRFTISRDNKSN TLYLQMDSLRVED SAVYSCARESGWS HYYYGMDVWG QGTMTVTVSS	164	KL2B53_VL	DIVMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQ DISNYLAWYQQKP GKVPKFLIYAAS LHSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQP EDVATYYCQKYN SAPYTFGQGTRLEI K	165
KL2B242	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWLRQP AGSGLEWIGRLYV SGFTNYNPSLKSR VTLSLDPSRNQLS LKLSSVTAADTAV YYCAGDSGNYWG WFDPWGQGT VTVSS	166	KL2B242_VL	SYELTQPPSVSVSP GETASITCSGDQL GENYACWYQQKP GQSPVLVIYQDSK RPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQA LDEADYYCQAWD NSIVVFGGGTKL VL	167
KL2B467	KL2B467_VH	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFSYYGMHWV RQAPGKLEWVA FISYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDN	168	KL2B467_VL	QSVLTQPPSVSVA PGQTASITCGGDNI GSKSVHWYQQKP GQAPVLVYDINS DRPSGIPERFSGSN SGTTATLTISRVEA	169

Название Ат	Название VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
		KNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAHL PYSGSYWAFDYW GQGTQVTVSS			GDEADYYCQVWD SSSDHPVVFGGGT KVTV	
KL2B494	KL2B494_VH	QVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTFSHY AMSWVRQAPGK GLEWVSTIGGSGG STYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQM NSLR AEDTAVYY CAKPHIVMVT ALLYDGM DVWVGQGT MVT VSS	204	KL2B494_VL	SSELTQPPSVSVAP GQTARITCGGNNI GSKSVHWYQQKP GQAPVLVYD DSDRPSGIPERF SGSN SGNTATLTISR VEAGDEADYYC QVWD SSSDHVVF GGGTLTVL	205
KL2B242LC_C33S	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWLRQP AGSGLEWIGRLYV SGFTNYPNPSL KSRVTLSLDPSRN QLSLKLS LKLSSVTAADTAV YYCAGDSGNYWG WFDPWGQGT LTVT VSS	166	KL2B242LC_C33S_VL	SYELTQPPSVSVSP GETASITCSGDQL GENYASWYQQKP GQSPVLVIYQDSK RPSGIPERFSGS NSNGNTATLTIS GTQALDEADYYC QAWD NSIVVF GGGTKLTVL	444

Таблица 4. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к KLK2 по Кабату.

Название Ат	HCDR1 по Кабату		HCDR2 по Кабату		HCDR3 по Кабату	
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYSPSLKS	64	GYYYGSGF	66
hu11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
HCF3-LCD6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
HCG5-LCB7	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B357	sdyawn	63	yisysgsttynpslks	65	gyyygsgf	66
KL2B358	sdyawn	63	yisysgsttynpslks	65	gyyygsgf	66
KL2B359	sdyawn	63	yisysgsttynpslks	65	gyyygsgf	66

Название Ат	HCDR1 по Кабату		HCDR2 по Кабату		HCDR3 по Кабату	
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
KL2B360	sdyawn	63	yisysgsttynpslks	65	gyyygsgf	66
KL2B413	sywmt	141	nikqdgseryyvdsvkq	142	dqnydiltghygmvdv	143
KL2B30	SYIWS	170	YIYYSGSTNYNPSLKS	171	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
KL2B53	SYDIH	176	IISYDGSKKDYTDSVKG	177	ESGWSHYYYYYGMDV	178
KL2B242	SYIWS	170	RLYVSGFTNYNPSLKS	183	DSGNYWGWFDV	184
KL2B467	YIGMH	188	FISYDGSNKYYADSVKG	189	LPYSGSYWAFDY	190
KL2B494	HYAMS	206	TIGSGGSTYYADSVKG	207	PHIVMVTALLYDGMDV	208

Таблица 5. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к hK2 по Кабату.

Название Ат	LCDR1 по Кабату		LCDR2 по Кабату		LCDR3 по Кабату	
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3-LCD6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5-LCB7	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
KL2B357	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvpvt	71
KL2B358	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvpvt	71
KL2B359	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvpvt	71
KL2B360	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvpvt	71
KL2B413	rasqgissyls	144	atstlqs	145	qqlnsyprt	146
KL2B30	RASQGISSYLA	173	AASTLQS	174	QQLNSYPLT	175
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	191	DNSDRPS	192	QVWDSSSDHPVV	193
KL2B494	GGNNIGSKSVH	182	DDSDRPS	470	QVWDSSSDHVV	209

Таблица 6. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 мАм
выбранных антител к hK2 по АбМ.

Название Ат	HCDR1 АбМ		HCDR2 АбМ		HCDR3 АбМ	
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
hu11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCF3-LCD6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCG5-LCB7	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B357	gnsitsdyawn	72	yisysgstt	73	gyyygsgf	66
KL2B358	gnsitsdyawn	72	yisysgstt	73	gyyygsgf	66
KL2B359	gnsitsdyawn	72	yisysgstt	73	gyyygsgf	66
KL2B360	gnsitsdyawn	72	yisysgstt	73	gyyygsgf	66
KL2B413	gftfssywm	147	nikqdgser	148	dqnydiltghygm	143
KL2B30	GGSISSYYWS	194	YIYSGSTN	195	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
KL2B53	GFTFSSYDIH	196	IISYDGSKKD	197	ESGWSHYYYGMDV	178
KL2B242	GGSISSYYWS	198	RLYVSGFTN	199	DSGNYWGWFDV	184
KL2B467	GFTFSYY	200	FISYDGSNKY	201	LPYSGSYWAFDY	190
KL2B494	GFTFSHYAMS	216	TIGSGGSTYY	217	PHIVMVTALLYDGMDV	218

Таблица 7. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 мАм
выбранных антител к hK2 по АбМ.

5

Название Ат	LCDR1 АбМ		LCDR2 АбМ		LCDR3 АбМ	
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3-LCD6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5-LCB7	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
KL2B357	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvyt	71
KL2B358	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvyt	71
KL2B359	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvyt	71
KL2B360	rasesveyfgtslmh	67	aasnves	69	qqtrkvyt	71
KL2B413	rasqgissyls	144	atstlqs	145	qqlnsyprt	146
KL2B30	RASQGISSYLA	173	AASTLQS	174	QQLNSYPLT	175
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNSAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	191	DNSDRPS	192	QVWDSSSDHPVV	193
KL2B494	GGNNIGSKSVH	182	DDSDRPS	470	QVWDSSSDHVV	209

Таблица 8. Аминокислотные последовательности и сводный обзор SEQ ID NO
вариабельных доменов выбранных антител к hK2

Название антитела	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYSPSLKS	64
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (m11B6_VH)	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWRQFP GNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNS VTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	125
	VL (m11B6_VL)	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQ KPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEED DFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	124
h11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (hu11B6_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTC AVSGNSITSDYAWNWRQPP GKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSS VTAVDTA VYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	5
	VL (hu11B6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	2
HCF3-LCD6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (HCF3_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTC AVSGNSITSDYAWNWRQFP GKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV TPVDTA VYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	6
	VL (LCD6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAE DVSVYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	1
HCG5-LCB7	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68

Название антитела	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (HCG5_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIWIRQFP GKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSS VTPVDTAVYYCATGYYYGSGFVWGQGLVTVSS	4
	VL (LCB7_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLVQAED VAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	3
KL2B357	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B357_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQFP GKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCATGYYYGSGFVWGQGLVTVSS	159
	VL (KL2B_357_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLVQAED VAVYYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	160
KL2B358	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B358_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQFP GKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCATGYYYGSGFVWGQGLVTVSS	161
	VL (KL2B_358_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQK PGQPPRLIYAASNRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISVPEPDA VYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B359	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B359_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQFP GKRLIEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCATGYYYGSGFVWGQGLVTVSS	139
	VL (KL2B_359_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQK PGQPPRLIYAASNRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISVPEPDA VYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B360	HCDR1	sdyaw	63
	HCDR2	yisysgsttynpslks	65

Название антитела	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
	HCDR3	gyyygsgf	66
	LICDR1	rasesveyfgtslmh	67
	LCDR2	aasnves	69
	LCDR3	qqrkvpyt	71
	VH (KL2B360_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRQFP GKGLEWIGYISYSGSTIYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTILVTVSS	159
	VL (KL2B_360_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQK PGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFA VYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B413	HCDR1	SYWMT	141
	HCDR2	NIKQDGSERYVDSVKG	142
	HCDR3	DQNYDILTGHYGMDV	143
	LICDR1	RASQGISSYLS	144
	LCDR2	ATSTLQS	145
	LCDR3	QQLNSYPRT	146
	VH (KL2B413_VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTITVTV SS	137
	VL (KL2B_413_VL)	EIVLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAP KLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQLNSYPRTFGGGTKVEIK	138
KL2B30	HCDR1	SYIWS	170
	HCDR2	YIYYSGSTNYNPSLKS	171
	HCDR3	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
	LICDR1	RASQGISSYLA	173
	LCDR2	AASTLQS	174
	LCDR3	QQLNSYPLT	175
	VH (KL2B30_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGK GLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSV AADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTITVTVSS	162
	VL (KL2B30_VL)	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKA PKFLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQLNSYPLTFGGGTKVEIK	163
KL2B53	HCDR1	SYDIH	176
	HCDR2	IISYDGSKKDYTDSVKG	177
	HCDR3	ESGWSHYYYYGMDV	178
	LICDR1	RASQDISNYLA	179
	LCDR2	AASTLHS	180
	LCDR3	QKYNSAPYT	181
	VH (KL2B53_VH)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPG KGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMD SLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTIMVTVSS	164
	VL (KL2B53_VL)	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLAWYQQKPGK VPKFLIYAASSTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY	165

Название антитела	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
		YCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	
KL2B242	HCDR1	SYIWS	170
	HCDR2	RLYVSGFTNYNPSLKS	183
	HCDR3	DSGNYWGWFDL	184
	LICDR1	SGDQLGENYAC	185
	LCDR2	QDSKRPS	186
	LCDR3	QAWDNSIVV	187
	VH (KL2B242_VH)	QVQLQESGPGLVKPSLTLTCTVSGGSISSYYWSWLRQAGS GLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRLTSLDPSRNQLSLKLSVT AADTAVYYCAGDSGNYWGWFDLWVGGTGLVTVSS	166
	VL (KL2B242_VL)	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQALDEADYY CQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	167
KL2B467	HCDR1	YYGMH	188
	HCDR2	FISYDGSNKYYADSVKG	189
	HCDR3	LPYSGSYWAFDY	190
	LICDR1	GGDNIGSKSVH	191
	LCDR2	DNSDRPS	192
	LCDR3	QVWDSSTDHPVV	193
	VH (KL2B467_VH)	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCLASGFTFSYYGMHWVRQAP GKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAHLPSGYSYWAFDYWGQGTQVTVSS	168
	VL (KL2B467_VL)	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQA PVLVYDSDRPSGIPERFSGNSGTTATLTISRVEAGDEADYY YCQVWDSSTDHPVVFVGGGKLVTVL	169
KL2B494	HCDR1	HYAMS	206
	HCDR2	TIGGSGGSTYYADSVKG	207
	HCDR3	PHIVMVTALLYDGMDV	208
	LICDR1	GGNNIGSKSVH	182
	LCDR2	DDSDRPS	470
	LCDR3	QVWDSSTDHV	209
	VH (KL2B494_VH)	QVQLVESGGGLVQPGSLRLSCLASGFTFSHYAMSWVRQAP GKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWVGGTMTV SS	204
	VL (KL2B494_VL)	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQA PVLVYDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYY YCQVWDSSTDHVVFVGGGKLVTVL	205

Таблица 9. SEQ ID NO последовательностей белков и ДНК доменов VH и VL выбранных антител hK2.

Антитело	Белок VH, SEQ ID NO:	Белок VL, SEQ ID NO:	кДНК VH, SEQ ID NO:	кДНК VL, SEQ ID NO:
m11B6	125	124	225	237
hu11B6	5	2	226	238
HCF3-LCD6	6	1	227	239
HCG5-LCB7	4	3	228	240
KL2B357	159	160	229	241
KL2B358	161	140	230	242
KL2B359	139	140	231	242
KL2B360	159	140	229	242
KL2B413	137	138	232	243
KL2B30	162	163	233	244
KL2B53	164	165	234	245
KL2B242	166	167	235	246
KL2B467	168	169	236	247
KL2B494	204	205	263	271

SEQ ID NO:225 (кДНК VH m11B6)

5 GATGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCCGGACTTGTTAAACCAAGTCAGTCTCTGT
 CCCTGACCTGTACCGTCACCGGCAACAGCATCACAAGCGATTACGCATGGAAGTGG
 GATCAGGCAGTTCCCTGGAAATCGACTCGAATGGATGGGCTACATTTTCATACTCC
 GGTTCAACCACTTACTCTCCATCCTTGAAATCTAGGTTTCAGCATCACCCGTGATAC
 CTCAAAGAACCAATTTTTTCTGCAACTGAATAGCGTAACTCCAGAGGACACAGCC
 10 ACATATTTCTGCGCCACTGGGTATTAATACTATGGCTCAGGTTTCTGGGGTCAGGGCA
 CTCTCGTCACCGTCAGCAGC

SEQ ID NO: 226 (кДНК VH hu11B6)

CAGGTCCAAGTGCAGAGAGCGGACCGGGCCTGGTAAAGCCATCCGACACATTG
 15 TCCCTGACGTGTGCGGTAAGTGGAAACTCTATCACTAGCGACTATGCGTGGAATT
 GGATAAGACAACCGCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGATAGGATATATCAGCTATT
 CCGGTTCTACGACATACAATCCTTCCCTGAAAAGCAGAGTCACTATGTCACGCGA
 CACGTCCAAGAATCAGTTCTCATTGAAATTGTCATCCGTAACGGCCGTTGACT
 GCGGTTTATTATTGCGCAACCGGATATTAATACTACGGCTCTGGTTTTTGGGGACAGG
 20 GAACACTTGTTACTGTTAGTTCA

SEQ ID:NO 227 (κДHK VH HC3-LCD6)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACACCCTG
 AGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTGGAAC
 5 TGGATCCGCCAGTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAGCTACA
 GCGGCAGCACCACCTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAGCCGCG
 ACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGTGGACA
 CCGCCGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGGGGCCA
 GGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

10

SEQ ID NO: 228 (κДHK VH HCG5-LCB7)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACACCCTG
 AGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTGGAAC
 TGGATCCGCCAGTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCAGCTACA
 15 GCGGCAGCACCACCTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAGCCGCG
 ACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGTGGACA
 CCGCCGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGGGGCCA
 GGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

20

SEQ ID NO: 229 (κДHK VH KL2B357, KL2B360)

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGT
 CTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAACTG
 GATTCGGCAGTTCCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCC
 GGTTCCACCACCTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACA
 25 CCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGC
 CGTGTACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGC
 AACTGGTTACCGTGTCTAGT

30

SEQ ID NO: 230 (κДHK VH KL2B358)

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGT
 CTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAACTG
 GATTCGGCAGCCACCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCC
 GGTTCCACCACCTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACA
 CCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGC

CGTGTACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGC
 AACTGGTTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 231 (κДНК VH KL2B359)

5 CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGT
 CTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAAGT
 GATTCGGCAGTTCCTGGCAAGCGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCC
 GGTTCCACCACCTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACA
 CCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGC
 10 CGTGTACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGC
 AACTGGTTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 232 (κДНК VH KL2B413)

GAGGTGCAACTTGTGGAGAGCGGCGGAGGTCTGGTCCAACCCGGAGGAAGTCTC
 15 CGTCTCTCCTGTGCTGCTAGTGGCTTCACTTTTCACTCATATTGGATGACATGGGT
 GAGACAAGCCCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTAGCTAACATTAAACAGGACGG
 CTCCGAACGGTACTATGTTGATTCTGTGAAGGGACGGTTCATATATCCAGGGAT
 AATGCAAAAATTCATCTATCTTCAAATGAACTCACTCAGAGCAGAGGACACTG
 CCGTGTATTATTGCGCCAGGGATCAAATTATGACATACTGACCGGTCATTATGG
 20 AATGGATGTTTGGGGCCAGGGAACAACCGTTACCGTCTCAAGT

SEQ ID NO:233 (κДНК VH KL2B30)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
 TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGAT
 25 CCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGG
 GAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACG
 TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCG
 TGTATTACTGTGCGGGGACTACGATTTTGGAGTGGTTACCCCAACTTCTACTAC
 GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

30

SEQ ID NO: 234 (κДНК VH KL2B53)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTACCTTCACTAGTTATGACATACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTTCATATGATGGA

AGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGACTCG
 GCTGTGTATTCTGTGCGAGAGAAAGTGGCTGGTCCCCTACTACTATTACGGTA
 TGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

5

SEQ ID NO: 235 (κДНК VH KL2B242)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
 TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCTGGCT
 CCGGCAGCCC GCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAGTGGG
 10 TTCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCCTAGACCCGT
 CCAGGAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGT
 ATATTATTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTGGGGC
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

15 **SEQ ID NO: 236 (κДНК VH KL2B467)**

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATCATATGATGGA
 AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA
 20 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGG
 CTGTGTATTACTGTGCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGGCCTTTGACTAC
 TGGGGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID NO: 263 (κДНК VH KL2B494)

25 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTAGTGGT
 GGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA
 ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG
 30 CCGTATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCTACGAC
 GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 237 (κДНК VL m11B6)

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTATCTTTGGGGCAGCGGG
CAACAATTTTCATGCCGTGCATCTGAAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTCTTATG
CACTGGTATCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACCTCCTTATATATGCCGCTT
5 CCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTTCCGGCTCTGGGTCCGGCACAGA
CTTTTCCCTCAATATCCAACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCATGTATTTTGGC
AACAGACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGGCGGCACTAAACTTGAGATCA
AA

10 SEQ ID NO: 238 (κДНК VL hu11B6)

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCGGATTCCCTTGCTGTGTCTCTGGGAGAACGAG
CTACGATCAACTGCAAGGCAAGTGAATCCGTAGAATACTTCGGGACATCATTGAT
GCATTGGTATCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATATGCGGCT
AGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTAGTGGTTCAGGATCAGGTACA
15 GATTTACCCCTGACAATAAGTAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTATTACT
GCCAACAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAAAGTTGGAAA
TCAAA

SEQ ID NO: 239 (κДНК VL HCF3-LCD6)

20 GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGGCAGCGC
GCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTG
ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCT
GCCAGCAACCGCGAGAGCGGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCCAGAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCTCCGTGTACT
25 TCTGCCAGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGG
AGATCAAG

SEQ ID NO: 240 (κДНК VL HCG5-LCB7)

30 GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGGCAGCGC
GCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTG
ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCT
GCCAGCAACCGCGAGAGCGGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCCCGTGTACT

ACTGCCAGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGG
AGATCAAG

SEQ ID NO: 241 (κДНК VL KL2B357)

5 GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAG
CCACCATCAACTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGAT
GCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCC
TCCAACGTGGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG
ACTTTACCCTGACCATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTA
10 CAGCAGACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATC
AAG

SEQ ID NO: 242 (κДНК VL KL2B358, KL2B359, KL2B360)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAG
15 CCACCCTCTCTTGTAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGATG
CACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACGCCGCCT
CCAACGTGGAATCTGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGA
CTTTACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAACCCGAGGATTTTCGCTGTGTA
20 AGCAGACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCA
AG

SEQ ID NO: 243 (κДНК VL KL2B413)

GAAATCGTACTGACCCAGTCCCCTTCTTTCTTGAGTGCATCAGTTGGGGATAGAG
TGACCATTA
25 CAAAAACCTGGCAAGGCACCCAAACTCTTGATCTACGCCACCTCTACATTGCAAA
GTGGGGTTCTTCTAGGTTTTTCAGGCTCCGGCTCTGGTACCGAGTTCACCCCTACT
ATAAGCAGTCTCCAACCTGAAGATTTTCGCTACTTATTATTGTCAGCAGCTTAATTC
TTATCCCCGAACCTTTGGTCAAGGA
ACTAAGGTTCGAGATCAAA

30 **SEQ ID NO: 244 (κДНК VL KL2B30)**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCA
GCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAA
AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTC
ACTCTCA

CAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAA
TAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEQ ID NO: 245 (κДНК VL KL2B53)

5 GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAC
TCTGGGGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
10 CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGTATAA
CAGTGCCCCGTACACTTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

SEQ ID NO: 246 (κДНК VL KL2B242)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGAGAGACAGCCA
GCATCACCTGCTCTGGAGATCAATTGGGGGAAAATTATGCTTGCTGGTATCAGCA
15 GAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGATAGTAAGCGGCCCTCA
GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCA ACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCA
TCAGCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAA
CAGTATTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

20 **SEQ ID NO: 247 (κДНК VL KL2B467)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCGGGCAGACGGCCA
GTATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGC
AGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTTCGCTCTATGATAATAGCGACCGGCCCTC
AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCA ACTCTGGGACCACGGCCACCCTGACC
25 ATCAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAT
AGTAGTAGTGATCATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

SEQ ID: 271 (ДНК KLK2B494_VL)

TCTTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCA
30 GGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGC
AGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTTCGCTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTC
AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCA ACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACC
ATCAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAT
AGTAGTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Fab-Fc и scFv

5 Специфические области VH/VL hK2 конструировали как VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и VL-CL и экспрессировали как IgG2 или IgG4 или конструировали как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. Линкер, используемый в scFv, представлял собой линкер с SEQ ID NO: 7, описанный выше. ScFv использовали для получения биспецифических антител, как описано в примере 7, или с получением CAR, как описано в примере 11.

10 В **таблице 10** приведены аминокислотные последовательности выбранных антител к hK2 в формате мАт. В **таблице 11** приведены аминокислотные последовательности LC выбранных антител к hK2 в мАт. В **таблице 12** представлена обобщенная информация по HC и LC ДНК SEQ ID NO выбранных антител к hK2 в формате мАт. В **таблице 13** показаны аминокислотные последовательности выбранных scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH.

15 *Таблица 10. Аминокислотная последовательность HC (VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3) выбранных антител к hK2 в формате мАт.*

hK2 ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ	Белок HC, SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность HC
m11B6_HC	202	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIWIRQFPGNRLE WMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYF CATGYYYGSGFWGQGLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVT LGCLVKGYFPEPVTLTWSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVT SSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG GPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEV HTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKFKCKVNNKDLPL APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
h11B6_HC	203	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCVAVSGNSITSDYAWNWIWIRQPPGKGLE WIGYISYSGSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQFSLKLSVTAVDTAAY YCATGYYYGSGFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYF SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

hK2 ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ	Белок hC, SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность hC
KL2B30_hC	210	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
K2B53_hC	211	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWVSHYIYYGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
KL2B242_hC	212	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRTVLSLDPNQLSLKLSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
KL2B467_hC	213	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
K12B494_hC	219	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMTALLYDGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

Таблица 11. Аминокислотные последовательности LC (VL-CL) выбранных антител к hK2 в формате mAb (Fab-Fc).

hK2 ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ	БЕЛОК LC, SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность LC
m11B6_LC	214	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVE YFGTSLMHWYRQKPGQ PPKLLIYAASNVEGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQ QTRKVPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTL TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
h11B6_LC	215	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPG QPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQTRKVPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B30_LC	221	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKF LIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNS YPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B53_LC	222	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKF LIYAASLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYN APYTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B242_LC	223	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLV IYQDSKRPSGIPERFSGSNGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDN SIVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
KL2B467_LC	224	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVL VYDSDRPSGIPERFSGSNGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWD SSSDHPVVFGGGTKVTLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
KL2b494_LC	220	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDSDRPSGIPERFSGSNGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLT PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Таблица 12. SEQ ID NO последовательностей κДНК HC и LC выбранных антител к hK2

5

Антитело	Белок HC, SEQ ID NO:	Белок LC, SEQ ID NO:	κДНК HC, SEQ ID NO:	κДНК LC, SEQ ID NO:
m11B6	202	214	284	296
hu11B6	203	215	285	297
KL2B30	210	221	292	450

Антитело	Белок HC, SEQ ID NO:	Белок LC, SEQ ID NO:	κДНК HC, SEQ ID NO:	κДНК LC, SEQ ID NO:
KL2B53	211	222	293	451
KL2B242	212	223	294	305
KL2B467	213	224	295	306
KL2B494	219	220	274	282

Таблица 13. Аминокислотные последовательности переменного домена выбранных антител scFv к hK2 в формате VH-линкер-VL (HL) или VL-линкер-VH (LH).

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv1	HCG5_LDC6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQFPKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKN QFSLKLSVTPVDTA VYYCATGYYYGSGFWGQGT VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGE RATINCKASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQ TRKVPYTFGQGTKLEIK	8
scFv2	HCG5_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQFPKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKN QFSLKLSVTPVDTA VYYCATGYYYGSGFWGQGT VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGE RATINCKASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSQAEDVAVYYCQQ TRKVPYTFGQGTKLEIK	9
scFv3	HCF3_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQFPKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQ FSLKLSVTPVDTA VYYCATGYYYGSGFWGQGT VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGER ATINCKASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQ TRKVPYTFGQGTKLEIK	10
scFv4	HCG5_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQFPKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKN QFSLKLSVTPVDTA VYYCATGYYYGSGFWGQGT VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGE RATINCKASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQ TRKVPYTFGQGTKLEIK	11
scFv5	LCD6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT IQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAV SGNSITSDYAWNWI RQFPKGLEWMGYISYSGSTTYP SLKSRTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTA VYYCATGY YSGFWGQGT VTVSS	12
scFv6	hu11B6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEG	13

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
		KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAV SGNSITSDYAWNWIWIRQFPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTAVYYCATGY YGSFGWGQGLVTVSS	
scFv7	hu11B6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLAQEDVAVYYCQQRTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAV SGNSITSDYAWNWIWIRQFPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTAVYYCATGY YGSFGWGQGLVTVSS	14
scFv8	LCB7_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSVQAEDVAVYYCQQRTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAV SGNSITSDYAWNWIWIRQFPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTAVYYCATGY YGSFGWGQGLVTVSS	15
scFv9	LCB7_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSVQAEDVAVYYCQQRTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAV SGNSITSDYAWNWIWIRQFPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTAVYYCATGY YGSFGWGQGLVTVSS	16
scFv10	LCD6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT IQSVQAEDVSVYFCQQRTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAV SGNSITSDYAWNWIWIRQFPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTAVYYCATGY YGSFGWGQGLVTVSS	17
scFv11	hu11B6_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKN QFSLKLSVTAVDVAVYYCATGYGSGFGWGQGLVTV VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGE RATINCKASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQ TRKVPYTFGQGTKLEIK	18
scFv12	hu11B6_LCD6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKN QFSLKLSVTAVDVAVYYCATGYGSGFGWGQGLVTV VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGE RATINCKASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQ TRKVPYTFGQGTKLEIK	19
scFv13	hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWI RQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKN QFSLKLSVTAVDVAVYYCATGYGSGFGWGQGLVTV VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGE RATINCKASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAQEDVAVYYCQ TRKVPYTFGQGTKLEIK	20

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv14	LCD6_hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPELLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFLT IQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTC AVSGNSITSDYAWNWRQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGY YYGSGFWGQGLTVTVSS	21
scFv15	hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPELLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFLT ISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTC AVSGNSITSDYAWNWRQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGY YYGSGFWGQGLTVTVSS	22
scFv16	LCB7_hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPELLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFLT ISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGKLEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTC AVSGNSITSDYAWNWRQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGY YYGSGFWGQGLTVTVSS	23
scFv17	KL2B413_HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWV RQAPGKGLEWVANIKQDGSERYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYG MDVWGQGTITVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSEIVL TQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPKA PKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	133
scFv18	KL2B413_LH	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQK PKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSEKSSGSGS ESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYVDSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDIL TGHYGMDVWGQGTITVTVSS	134
scFv19	KL2B359_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWI RQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVTV SSGGSEKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPELLIYAAS NVESGIPARFSGSGSGTDFLTISSVEPEDFAVYFCQQTR KVPYTFGGGTKVEIK	135
scFv20	KL2B359_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPELLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFLT ISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEK SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GNSITSDYAWNWRQPPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY GSGFWGQGLTVTVSS	136

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv21	KL2B357_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWI RQFPKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVTV SSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGER ATINCRASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPKLLIYAAS NVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYFCQQT RKVPYTFGGGTKVEIK	318
scFv22	KL2B357_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTV SGNSITSDYAWNWIWIRQFPKGLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCATGYY YSGFWGQGLVTVSS	319
scFv23	KL2B358_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWI RQPPKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVTV SSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPRLIYAAS NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR KVPYTFGGGTKVEIK	320
scFv24	KL2B358_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPRLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GNSITSDYAWNWIWIRQPPKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCATGYYY GSGFWGQGLVTVSS	321
scFv25	KL2B360_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWI RQFPKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVTV SSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQKPGQPPRLIYAAS NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR KVPYTFGGGTKVEIK	322
scFv26	KL2B360_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHW YQKPGQPPRLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS GNSITSDYAWNWIWIRQFPKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCATGYYY GSGFWGQGLVTVSS	323
scFv27	KL2B467_HL	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWV RQAPKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYW GQGTQVTSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPS VSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQKPGQAPVLV YDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDSSSDHPVVFVGGGTVTV	324
scFv28	KL2B467_LH	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQK PGQAPVLVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGTVTVGGSEGKS SGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	325

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
		GFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHL PYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	
scFv39	KL2B494_HL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWV RQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDG MDVWGQGTMTVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSELTQPPSVSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFGGGTKLTVL	308
scFv40	KL2B494_LH	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAM SWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVT ALLYDGMVWGQGTMTVTVSS	316
scFv41	KL2B30_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAGTTFIFG VVTNPFYYGMDVWGQGTITVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIQMTQSPSFLSASVGD RVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGKVEIK	404
scFv42	KL2B30_LH	DIQMTQSPSFLSASVGD RVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGKVEIK GGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC AGTTFIFGVVTNPFYYGMDVWGQGTITV TVSS	405
scFv43	KL2B53_HL	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSY DIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSL RVEDSAVYSCARESGW SHY YYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIVMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKF LIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQKYN SAPYTFGGGTRLEIK	406
scFv44	KL2B53_LH	DIVMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLI YAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQKYN SAPYTFGGGTRLEIKGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEW VAIISYDGSKKDYTD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSL RVEDSAVYSCARESGW SHY YYYGMDVWGQGTMTVTVSS	407
scFv45	KL2B242_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWLRLQPAAGGLEWIGRLYVSGFTNYPNPSLK SRVTLSDPSRNQLSLKLSVTAADTAVYYCAGD SGNYWGWFD PWGQGTITVTVSSGGSEGKSSGSGSESKST GGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQL GENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQ AWD NSIVVFGGGTKLTVL	408

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv46	KL2B242_LH	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKP GQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA LDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGS GSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS SYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRT LSLDPSRNQLSLKLSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGW FDPWGGQTLTVSS	409

Пример 24. Определение биофизических характеристик антител к hK2

Аффинность и термостабильность антител к hK2.

Аффинность выбранных антител к hK2 к растворимому hK2 измеряли методом
5 поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR представляет собой способ
изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без
использования меток путем измерения изменения массы при формировании и
диссоциации комплекса. Антитела захватывали на чипе датчика, покрытом антителом к
Fc, с последующей инъекцией растворимого hK2 в различных концентрациях, и
10 определяли время ассоциации и диссоциации. После диссоциации поверхность
восстанавливали подходящим раствором для подготовки к следующему
взаимодействию. Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и
диссоциации) экстрагировали путем подбора сенсограмм к модели связывания
Ленгмюра в соотношении 1:1. Аффинность связывания (K_D) регистрировалась как
15 отношение констант скорости ($k_{\text{диссоциации}}/k_{\text{ассоциации}}$). Значения K_D выбранных антител к
hK2 перечислены в **таблице 14**.

Термостабильность определяли с помощью дифференциальной сканирующей
флуориметрии (NanoDSF) на автоматическом приборе Prometheus. NanoDSF
использовали для измерения T_m молекул в концентрации 0,5 мг/мл в фосфатно-солевом
20 буферном растворе, pH 7,4. Измерения проводили путем загрузки образцов в 24-
капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Для каждого образца
выполняли повторные измерения. Термическое сканирование образцов охватывает
диапазон от 20°C до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Флуоресценцию интактного
триптофана и тирозина мониторили при длинах волн излучения 330 нм и 350 нм, а
25 соотношение F350/F330 нм наносили на график зависимости от температуры для
создания кривых разворачивания белка. Измеренные значения T_m перечислены в
таблице 14.

Таблица 14. K_D и T_m выбранных молекул

Молекула	K_D (нМ)	T_m (°C)
KL2B413 (scFv-LH-Fc)	34,3	67
KL2B359 (scFv-LH-Fc)	0,7–1	67
KL2B30 (Fab)	0,460	> 70
KL2B242 (Fab)	0,040	> 70
KL2B53 (Fab)	0,080	> 70
KL2B467 (Fab)	0,078	> 70
KL2B494 (Fab)	0,053	> 70

scFv KL2B413, полученный в результате кампании иммунизации мышей линии
 5 Ablexis, имел термостабильность (T_m) 67°C, измеренную с помощью Nano DSF, и
 аффинность связывания (K_D) с hK2 человека около 34 нМ. Клон KL2B359, полученный
 для проведения повторной гуманизации и который сохранял аффинность связывания,
 аналогичную мышинному 11B6, преобразовали в scFv-Fc и CAR-T для дополнительного
 профилирования. ScFv KL2B359 показывает значения T_m 67°C и аффинности
 10 связывания (K_D) с hK2 ~0,7 нМ–1 нМ. KL2B30, KL2B242, KL2B53, KL2B467 и
 KL2B494 Fab демонстрировали показатели аффинности связывания менее 0,5 нМ, а
 значения T_m выше 70°C.

Картирование эпитопов

Эпитоп и паратоп выбранных антител к hK2 и биспецифических антител к
 15 hK2/CD3 определяли методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом
 (HX-MS). Для эксперимента по картированию эпитопа и паратопа использовали
 антиген KLK2 человека.

Вкратце, очищенный антиген KLK2 инкубировали с антителами к hK2 и без них
 или биспецифическими антителами к hK2/CD3 в буфере для мечения оксидом
 20 дейтерия. Смесь, полученную в результате водородно-дейтериевого обмена (HDX),
 гасили в разные моменты времени путем добавления 8 М мочевины, 1М TCEP, pH 3,0.
 Гашенный образец пропускали через колонку с иммобилизованным пепсином/FPXIII
 при 600 мкл/мин, уравновешенную буфером А (1% ацетонитрил, 0,1% МК в H₂O) при
 комнатной температуре. Пептические фрагменты загружали в обращенно-фазную

предколонку при концентрации 600 мкл/мин с буфером А и обессоливали в течение 1 мин (600 мкл буфера А). Обессоленные фрагменты разделяли с помощью колонки С18 с линейным градиентом от 8% до 35% буфера В (95% ацетонитрила, 5% Н₂О, 0,0025% ТФА) при 100 мкл/мин в течение 20 мин и анализировали методом масс-спектрометрии. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °С, разрешением 150 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300–1800. Приложение BioPharma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) использовали для идентификации пептидов недейтерированных образцов перед проведением экспериментов HDX. Для экстракции значений центроидов из MS файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDExaminer версии 2.5 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния).

Инкубация антител hK2, hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B30, KL2B413 и KL2B53 с растворимым белком hK2 приводила к различным паттернам водородного обмена и общего уровня защиты. Для визуализации связывающих эпитопов защищенные сегменты сопоставляли с последовательностью антигена hK2. KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные с общими последовательностями (i) остатков 174–178 (**SEQ ID NO: 111, KVTEF**) (например, KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные по меньшей мере с тремя остатками SEQ ID NO: 111, а именно остатки KVT 174–176) и (ii) остатки 230–234 (**SEQ ID NO: 112, HYRKW**) (например, KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные по меньшей мере с тремя остатками SEQ ID NO: 112, а именно, остатками HYR в 230–232). KL2B413 также связывают все остатки SEQ ID NO: 111 и остатки KW SEQ ID NO: 112. В варианте осуществления настоящего изобретения также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем указанный антигенсвязывающий домен связывается с hK2 в эпитопах, имеющих последовательности SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112; например, указанный антигенсвязывающий домен связывает все остатки или по меньшей мере четыре остатка или по меньшей мере три остатками SEQ ID NO: 111 и связывает все остатки или по меньшей мере четыре остатка или по меньшей мере три остатка SEQ ID NO: 112.

KL2B53 показал другой характер защиты и был связан с последовательностью, состоящей из остатков 27–32 (**SEQ ID NO: 113, SHGWAH**), 60–75 (**SEQ ID NO: 114, RHNLFPEDTGQRVP**) и 138–147 (**SEQ ID NO: 115, GWGSIEPEE**).

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/CD3 (например, hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B30, KL2B413 или KL2B53) содержит hK2-специфичный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с диспергированным эпитопом (т. е., с эпитопами, остатки которых отдаленно расположены в последовательности) hK2, содержащим одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114 и 115.

Паратоп антител к hK2 hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B413 и биспецифических антител к hK2/CD3 KLCB113 и KLCB80 идентифицировали на основании существенных различий в поглощении дейтерия на графиках остатков, созданных программой HDExaminer. KL2BB494 содержит три области паратопа, две из которых расположены в варибельном домене тяжелой цепи KL2B494 (GFTFSH (SEQ ID NO: 455) и TAVYYCAKPHIVMVTAL (SEQ ID NO: 456)), а одна область паратопа расположена в варибельном домене легкой цепи (YDDSDRPSGIPER (SEQ ID NO: 457)). KL2BB467 содержит три области паратопа, две из которых расположены в варибельном домене тяжелой цепи KL2B467 (FTFSY (SEQ ID NO: 458) и GSYWAFDY (SEQ ID NO: 459)), а одна область паратопа расположена в варибельном домене легкой цепи (DNSD (SEQ ID NO: 460)). Hu11B6 содержит одну область эпитопа, расположенную в тяжелой цепи (GNSITSDYA (SEQ ID NO: 461)). KL2B413 содержит две области паратопа, расположенные в варибельном домене тяжелой цепи (GFTF (SEQ ID NO: 462) и ARDQNYDIL (SEQ ID NO: 463)). KL2B30 биспецифического KLCB80 содержит область паратопа, расположенную в тяжелой цепи (содержащей аминокислотные остатки TIF и VTPNF (SEQ ID NO: 464)), и область паратопа, расположенную в легкой цепи (YAASTLQSG (SEQ ID NO: 465)). KL2B53 биспецифического KLCB113 содержит одну область паратопа, расположенную в тяжелой цепи (содержащей аминокислотные остатки ESGWSHY (SEQ ID NO: 466)).

Пример 25. Конъюгация MMAF с Fab из KL2B30

Иммуноконъюгаты настоящего изобретения получали путем конъюгации Fab из KL2B30 (обозначенного как KL2B997) с MMAF. Конъюгацию проводили посредством случайной конъюгации и сайт-специфической конъюгации; такие способы описаны, например, в WO2020/229974. Как описано в настоящем документе, KL2B997 (Fab из KL2B30) содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и KL2B997 содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.

На ФИГ. 1 термин «DAR» означает «соотношение лекарственного средства и антитела», что подразумевает количество молекул лекарственного средства, т. е. MMAF, присоединенных к фрагменту антитела, т. е. к KL2B997. Количество связанных молекул лекарственного средства на фрагмент антитела или степень мечения, представляет собой параметр, обычно применяемый в данной области техники, и обозначается «DAR», подразумевая «соотношение лекарственное средство / антитело».

Для оценки связывания с клетками-мишенями Fab из KL2B30 с различными вариантами конъюгации использовали клетки VCaP в качестве клеток-мишеней, положительных по hK2, а клетки DU145 использовали в качестве отрицательных по hK2. Исходное антитело KL2B30 (содержащее тяжелую цепь и легкую цепь с SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 221 соответственно) и h11B6 (антитело к hK2, также называемое в данном документе h11B6, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 215 соответственно) применяли в качестве положительного контроля. Антитело h11B6 описано в патенте США № 10,100,125, который включен в настоящий документ путем ссылки. Для обнаружения связывания на основе Fab использовали античеловеческое специфическое к F(ab')₂-фрагменту вторичное детектирующее антитело. Тестовые антитела инкубировали с клетками-мишенями при 4 °C в течение 60 минут и обнаруживали вторичным окрашиванием. Связывание с клетками количественно определяли с помощью проточной цитометрии на основе сигнала связывания вторичного антитела и гейтировали из числа живых клеток. Результаты показали положительное и дозозависимое связывание клеток с использованием всех трех протестированных способов, которые включали неконъюгированный KL2B997, случайную конъюгацию KL2B997 и сайт-специфическую конъюгацию KL2B997 (показаны на ФИГ. 1 как KL2B997*, KL2B997 NHS и KL2B997 SORT). Было показано, что Fab из KL2B30 специфически связывается с hK2-положительными клетками VCaP и не связывается с hK2-отрицательными клетками DU145. Как показано на ФИГ. 1, результаты показали, что Fab из KL2B30 связывается с hK2-экспрессирующими клетками VCaP и может интернализироваться и инициировать зависимое от интернализации уничтожение клеток при конъюгировании с MMAF.

Описанные выше иммуноконъюгаты получали посредством случайной конъюгации и сайт-специфической конъюгации. Для сайт-специфической конъюгации 2,1 мг h11B6 с концентрацией 2 мг/мл в 1 x dPBS (Thermo Fisher14190144) дегликозилировали, используя 5 мкл Rapid PNGaseF (NEB #P0711S), при 37 °C в

течение ночи. Добавляли бактериальную трансглутаминазу (bTG; Aactiva TI от Ajinomoto) при 30% мас./об., а также 1000-кратный молярный избыток разветвленного субстрата амино-PEG4-(PEG3-азид)₂ (CP-2051 Conju-Probe LLC) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Модифицированное азидом mAb очищали на приборе АКТА Avant, оснащенный колонкой Mabselect объемом 1 мл (GE11003493) и заменяли на 1 x dPBS, используя 10 мл обессоливающие колонки Zeba (Thermo Fisher). Добавляли DBCO-PEG4-vc-PAВ-MMAF (Levena Biopharma) в 10-кратном молярном избытке и реакцию контролировали с помощью ЖХ-МС до достижения соотношения лекарственное средство : антитело, равного 4. Полученный ADC-конъюгат h11B6-vcMMAF очищали на обессоливающей колонке Zeba с последующим концентрированием и диафильтрацией с помощью концентратора Amicon.

Для случайной конъюгации KL2B30 сначала вводили в реакцию с NHS-PEG4-азидом (Thermo Fisher № по кат. 26130). К 1,5 мг KL2B30 при 1 мг/мл в 1 x dPBS добавляли 30 мкл 1 М раствора бикарбоната натрия pH 9 (BDH № 144-55-8) с последующим немедленным добавлением в NHS-PEG4-азид 7 x молярном соотношении. Реакцию контролировали с помощью масс-спектрометрии до достижения степени мечения 2–2,5, а впоследствии гасили путем добавления Tris pH 8,5 (Teknova T1085) до получения конечной концентрации 100 mM. После удаления непрореагировавшего NHS-PEG4-азид добавляли 10 x молярный избыток DBCO-PEG4-vc-PAВ-MMAF и инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Полученный ADC-конъюгат (DAR = 2,7) очищали на обессоливающей колонке Zeba объемом 10 мл с последующим концентрированием и диафильтрацией с помощью концентратора Amicon.

Сайт-специфический ADC (конъюгат антитело-лекарственное средство) KL2B997 получали конъюгацией с помощью сортазной метки. 1 мг KL2B997 при 1 мг/мл инкубировали с ферментом-сортазой A из *S. pyogenes* (2 мкМ) [см. Chen et al. PNAS 2011:11399] и избытком Gly3-vcMMAF (Levena Biopharma) в 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM буфера CaCl₂. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Конъюгат, очищенный на колонке HisTrap (Cytiva 17524701) объемом 1 мл на приборе АКТА Avant. ADC дополнительно очищали на колонке Superdex 75 10/300 (Cytiva 29148721) объемом 24 мл в 1 x dPBS для удаления любых агрегатов или остаточных субстратов.

KL2B997, случайным образом конъюгированный в ADC, готовили добавлением NHS-PEG4-азид с последующей реакцией с DBCO-vcMMAF, как описано выше.

Пример 26 – TOPA-KL2B1251 Fab и NODA-GA-KL2B1251 Fab

Ниже представлен способ конъюгирования Fab из KL2B30 (обозначенного как KL2B1251) с TOPA и NODA-GA.

Получение конъюгата TOPA-KL2B1251

5 *Случайная TOPA-модификация Fab:* Fab из *KL2B1251* разводили до 1 мг/мл в стерильном 1xDPBS. Доводили pH мАт до 9,0 с помощью буфера с бикарбонатом натрия, pH 9 (VWR 144-55-8). Впоследствии добавляли 8-кратный молярный избыток TOPA (TOPA-фенил-NCS (промежуточное соединение); 50 мМ маточный раствор в DMSO), и пул инкубировали при комнатной температуре без встряхивания в течение
10 приблизительно 1 часа. Добавление TOPA контролировали с помощью интактной масс-спектрометрии ESI-TOF ЖХ-МС на приборе Agilent G224 до тех пор, пока значение CAR не составило 1,5–2,0. Пул гасили добавлением 1М Tris pH 8,5 (Teknova T1085) до получения конечной концентрации 100 мМ. Избыток свободного хелатора удаляли последовательными раундами обессоливания и элюирования по 15 мл пула конъюгата
15 за раз на обессоливающей колонке HiPrep26/10 (17508701 — Cytiva) объемом 55 мл. Все уравнивание и элюирование проводили в 1xDPBS. Впоследствии образец концентрировали до 2 мл. Для подтверждения отсутствия избытка хелатора проводили циклы 3-кратного разбавления образца до 15 мл с последующим концентрированием до
20 1 мл с использованием концентрирующего устройства 50 000 MWC0 Amicon. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWx1 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали 0,2 М фосфатом натрия, pH 6,8; расход: 0,8 мл/мин; время анализа — 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Получение конъюгата NODA-GA-KL2B1251

Случайная NODA-модификация Fab: Fab из *KL2B1251* разводили до 1 мг/мл в стерильном 1xDPBS. Весь пул вращали со смолой Chelex (BioRad 1432832) в течение 30 минут при комнатной температуре, затем отфильтровывали смолу перед следующими стадиями через стерильный фильтр. Непосредственно перед конъюгацией добавляли
30 обработанный хелексом 1 М бикарбонат натрия с pH 9,0 (1 М раствор VWR с pH 9,0, кат. № 144-55-8). Добавляли 30-кратный сложный эфир NODA-GA-NHS (2,2'-(7-(1-карбоксо-4-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-4-оксобутил)-1,4,7-триазолан-1,4-диил)диуксусной кислоты; Chematech кат. № C098 в 50 мМ DMSO). Инкубировали при комнатной температуре без встряхивания в течение ~ 1 часа. Добавление NODA

контролировали с помощью интактной масс-спектрометрии ESI-TOF ЖХ-МС на приборе Agilent G224 до тех пор, пока значение CAR не составило 1,5–2,0. Пул гасили добавлением 1М Tris pH 8,5 (Teknova T1085) до получения конечной концентрации 100 мМ. Чтобы максимально снизить содержание металлов в препарате, очистку проводили только с помощью концентраторов с MWCO 30 000. Пул разделяли на шесть концентраторов Amicon с MWCO 30 000, каждый из которых вмещал ~ 6 мл объема и пополнялся PBS Chelex. Концентраторы центрифугировали в течение 8 минут при 3800 x g, оставляя ~ 1 мл конъюгата в каждом. Каждый концентратор пополняли PBS Chelex. Операцию повторяли еще 5 раз. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали 0,2 М фосфатом натрия, pH 6,8; расход: 0,8 мл/мин; время анализа — 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Используя способы, описанные в примере 25, для оценки связывания с клетками-мишенями Fab из KL2B1251 с различными вариантами конъюгации использовали клетки VCaP в качестве клеток-мишеней, положительных по hK2, а клетки DU145 использовали в качестве отрицательных по hK2. Как показано на ФИГ. 3, было показано, что Fab KL2B1251 и KL2B1251-NODA-GA специфически связываются с hK2-положительными клетками VCaP (ФИГ. 3А), а не с hK2-отрицательными клетками DU145 (ФИГ. 3Б).

Пример 27 – Фармакокинетическое (ФК) исследование KL2B1251-NOTA и KL2B1251-ТОРА

Целью данного исследования было выяснение фармакокинетических свойств NODA-GA-KL2B1251 Fab, как описано в настоящем документе (называемого в этом примере «KL2B1251-NOTA»), и ТОРА-KL2B1251 Fab, как описано в настоящем документе (называемого в этом примере «KL2B1251-ТОРА»), после однократного в/в введения у самцов яванских макак. Первая доза была введена в день 1. KL2B1251-NOTA вводили 4 самцам яванских макак путем внутривенной (в/в) медленной болюсной инъекции в течение приблизительно одной минуты в целевой дозе 1 мг/кг. KL2B1251-ТОРА также вводили 4 самцам яванских макак путем внутривенного (в/в) введения в виде медленной болюсной инъекции в течение приблизительно одной минуты в целевой дозе 1 мг/кг. Индивидуальные массы тела и вводимые дозы представлены на ФИГ. 5.

Оценки индивидуальной и средней (СО) ФК сыворотки KL2B1251-NOTA и KL2B1251-TOPA после однократной в/в болюсной дозы обобщены на ФИГ. 6. Средние (СО) концентрации KL2B1251-NOTA и KL2B1251-TOPA в сыворотке в зависимости от времени у самцов обезьян проиллюстрированы на ФИГ. 7. Концентрации KL2B1251-NOTA и KL2B1251-TOPA в сыворотке были ниже самой низкой поддающейся количественному определению концентрации во всех образцах, собранных до введения дозы в группах дозирования KL2B1251-NOTA и KL2B1251-TOPA. Воздействие KL2B1251-NOTA (в пересчете на AUC_{inf}) было в 1,72 раза выше, чем воздействие KL2B1251-TOPA. KL2B1251-NOTA демонстрировал более быстрый клиренс в сыворотке и меньший объем распределения по сравнению с KL2B1251-TOPA. Конечный показатель T_{1/2} для KL2B1251-NOTA был немного короче, чем KL2B1251-TOPA. После однократного в/в введения KL2B1251-NOTA и KL2B1251-TOPA средние значения составляли 21 555,77 и 16 933,83 нг/мл для C_{max}, 1440,71 и 837,55 нг·сутки/мл для AUC_{inf}, 711,23 и 1271,46 мл/сутки/кг для CL и 0,60 (14,4 часа) и 0,85 (20,4 часа) суток для T_{1/2} соответственно.

Следует понимать, что описанные в настоящем документе примеры и варианты осуществления приведены исключительно для целей иллюстрации и что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отступления от широкой концепции изобретения. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сущности и объема изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноконъюгат, содержащий: комплекс радиоактивного металла, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем комплекс радиоактивного металла содержит ^{64}Cu , связанный с хелатором, и при этом хелатор конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).
2. Иммуноконъюгат по п. 1, в котором хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусную кислоту (NOTA), 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA), 3,6,9,15-тетраазабицикло[9.3.1]-пентадека-1(15),11,13-триен-4-(S)-(4-изотиоцианатобензил)-3,6,9-триуксусную кислоту (PCTA), 5-S-(4-аминобензил)-1-окса-4,7,10-триазациклододекан-4,7,10-трис(уксусную кислоту) (DO3A) или их производное.
3. Иммуноконъюгат по п. 1, в котором хелатор представляет собой NOTA или ее производное, такое как NODA-GA, NODA-GA(tButyl)₃, ди-трет-бутил-NOTA, NOTA-тиосемикарбазид, NODA-MPAA или NODA-MPAEM, предпочтительно NODA-GA.
4. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1–3, в котором антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с hK2, представляет собой Fab.
5. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1–4, в котором антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170 (SYYWS), SEQ ID NO: 171 (YIYYSGSTNYPNPSLKS), SEQ ID NO: 172 (TTIFGVVTPNFYYGMDV), SEQ ID NO: 173 (RASQGISSYLA), SEQ ID NO: 174 (AASTLQS) и SEQ ID NO: 175 (QQLNSYPLT) соответственно.
6. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1–5, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH с SEQ ID NO: 162 (QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS), и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL с SEQ ID NO: 163

(DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK).

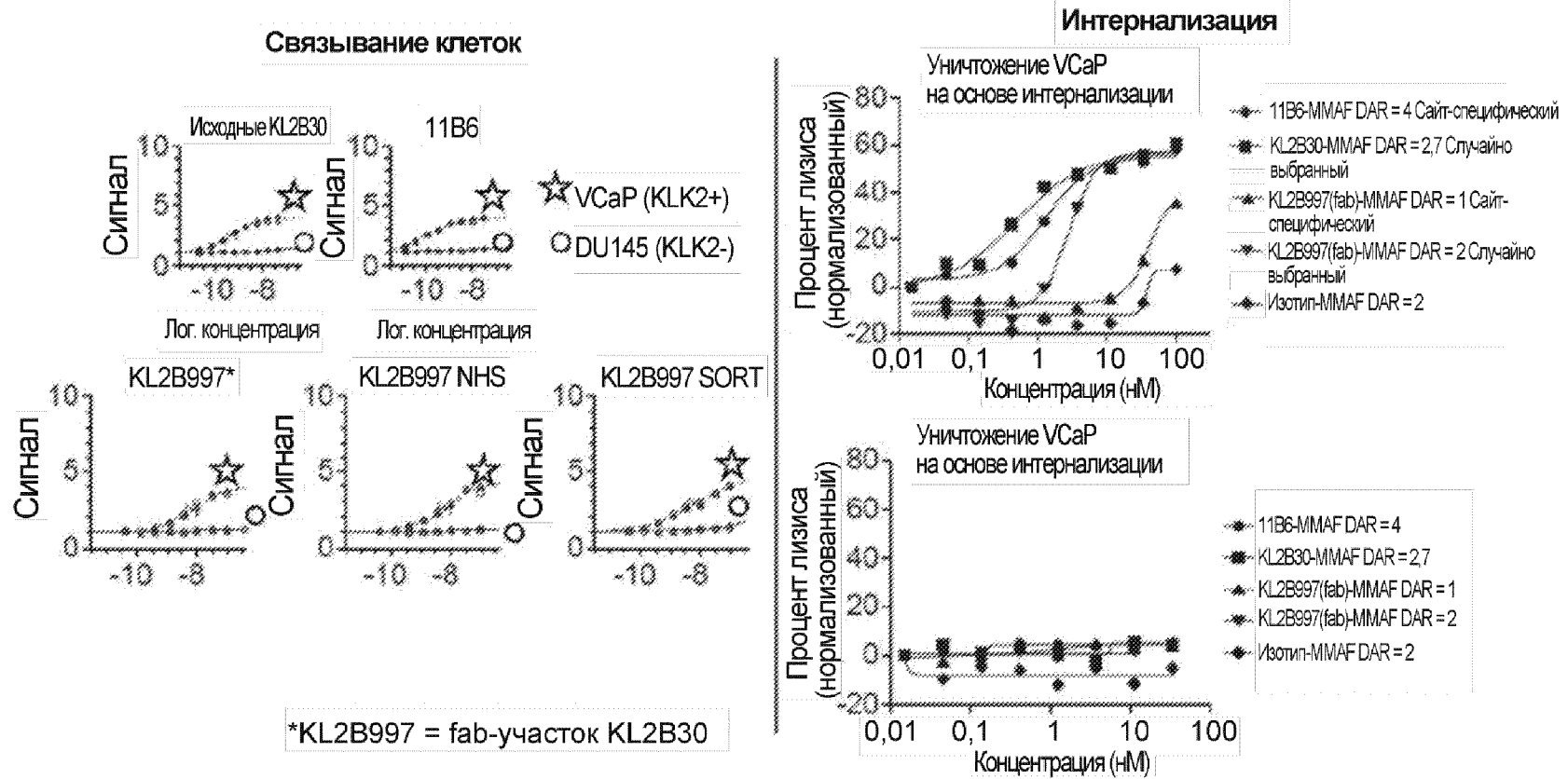
7. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1–5, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.
8. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1–5, в котором антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, содержащий:
- HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175 соответственно; и/или
 - VH с SEQ ID NO: 162 и VL с SEQ ID NO: 163.
9. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1–8, который представляет собой иммуноконъюгат с коротким периодом полужизни.
10. Иммуноконъюгат, содержащий комплекс радиоактивного металла, конъюгированный с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем:
- комплекс радиоактивного металла содержит ^{64}Cu , связанную с хелатором, который представляет собой NOTA или ее производное, такое как NODA-GA, NODA-GA(tButyl)₃, ди-трет-бутил-NOTA, NOTA-тиосемикарбазид, NODA-МРАА или NODA-МРАЕМ, предпочтительно NODA-GA,
- при этом хелатор конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), и при этом антигенсвязывающий домен содержит:
- HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 170 (SYYWS), SEQ ID NO: 171 (YIYYSGSTNYPNPSLKS), SEQ ID NO: 172 (TTIFGVVTPNFYYGMDV), SEQ ID NO: 173 (RASQGISSYLA), SEQ ID NO: 174 (AASTLQS) и SEQ ID NO: 175 (QQLNSYPLT) соответственно; и/или
 - VH, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH с SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL с SEQ ID NO: 163.
11. Способ обнаружения наличия рака предстательной железы у субъекта, включающий введение иммуноконъюгата по любому из пп. 1–10 субъекту, предположительно имеющему рак предстательной железы, и визуализацию биологических структур, с которыми связывается иммуноконъюгат (например, с

помощью компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом наличия рака предстательной железы.

12. Способ обнаружения прогресса лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту иммуноконъюгата по любому из пп. 1–10 и визуализацию биологических структур, с которыми связывается конъюгат (например, с помощью компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии), с обнаружением таким образом прогресса лечения рака предстательной железы у субъекта.

13. Способ по п. 11 или п. 12, включающий использование позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для визуализации биологических структур, с которыми связывается иммуноконъюгат.

Связывание клеток и интернализация



ФИГ. 1

Последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) KL2B997 и KL2B1251

KL2B997

HC (SEQ ID NO. 472)

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL
KLSSVTAADT AVYYCAGTTI FGVVTPNFYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE
PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTGSGSGSH
HHHHHGSGLP ETGG

LC (SEQ ID NO. 473)

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKPF GKAPKFLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP
EDFATYYCQQ LNSYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVEIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNMFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

KL2B1251

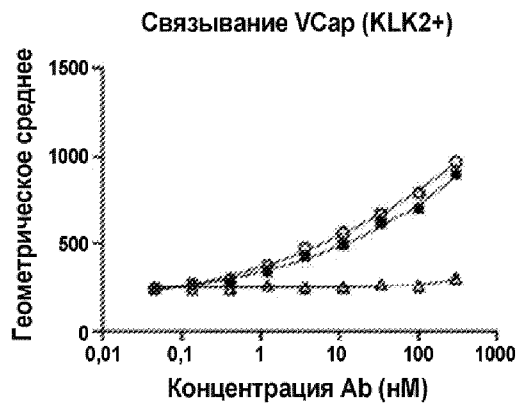
HC (SEQ ID NO. 474)

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL
KLSSVTAADT AVYYCAGTTI FGVVTPNFYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE
PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

LC (SEQ ID NO. 475)

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKPF GKAPKFLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP
EDFATYYCQQ LNSYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVEIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNMFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

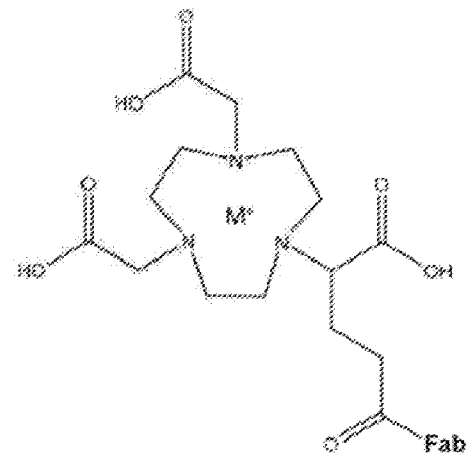
ФИГ. 2



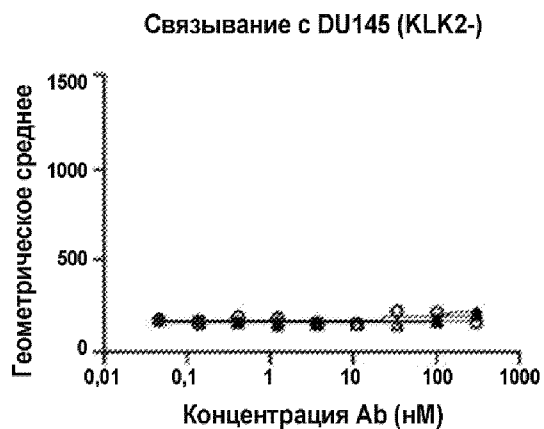
ФИГ. 3А

- Исходные KL2B1251
- KL2B1251-NOTA
- △ Изотипический контроль

** В приведенном выше обозначении KL2B1251-NOTA относится к KL2B1251-NODA-GA.



ФИГ. 4



ФИГ. 3Б

- Исходные KL2B1251
- KL2B1251-NOTA
- △ Изотипический контроль

** В приведенном выше обозначении KL2B1251-NOTA относится к KL2B1251-NODA-GA.

Масса тела отдельных животных и дозы, вводимые самцам яванских макак, получавшим однократные в/в дозы KL2B1251-NOTA (в группе 1) и KL2B1251-ТОРА (в группе 2)

Животное	Группа	Масса тела (кг)	Путь введения	Фактическая концентрация дозы (мг/мл)	Целевой уровень дозы (мг/кг)	Фактический объем дозы (мл/животное)	Рассчитанная введенная доза	
							(мг/животное)	(мг/кг)
0101	1	4,8	IV	0,784	1	4,8	3,76	0,784
0102	1	4,8	IV	0,784	1	4,8	3,76	0,784
0103	1	2,8	IV	0,784	1	2,8	2,20	0,784
0104	1	4,4	IV	0,784	1	4,4	3,45	0,784
0201	2	3,4	IV	1,03	1	3,4	3,50	1,03
0202	2	4,7	IV	1,03	1	4,7	4,84	1,03
0203	2	3,1	IV	1,03	1	3,1	3,19	1,03
0204	2	3,3	IV	1,03	1	3,3	3,40	1,03

В/В Внутривенно; вводится в виде медленной болюсной инъекции в течение примерно 1 минуты.

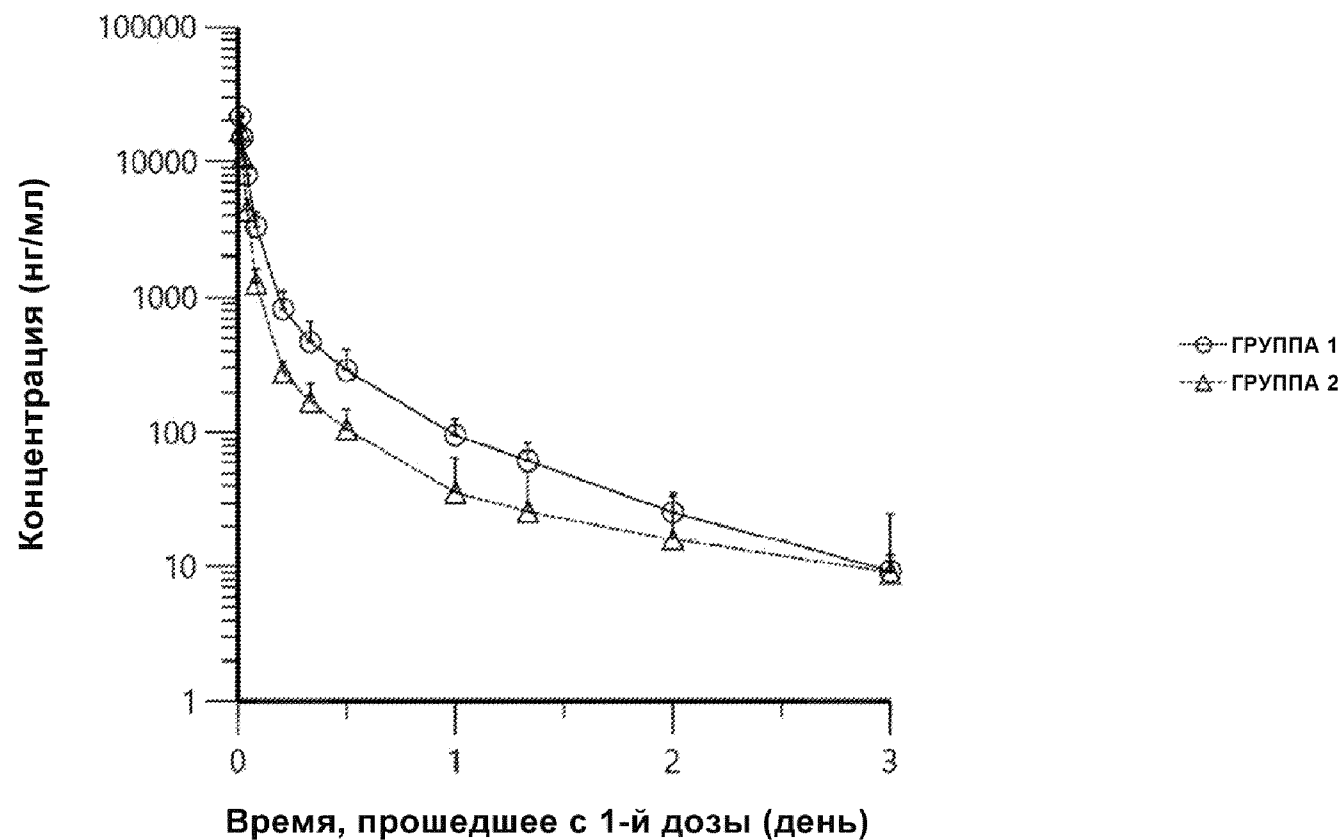
ФИГ. 5

Индивидуальные и средние (СО) оценки фармакокинетики сыворотки KL2B1251-NOTA (в группе 1) и KL2B1251-ТОРА (в группе 2) после однократного в/в введения самцам яванских макак дозы 1 мг/кг

Группа	ID	C_{max} (нг/мл)	AUC_{last} (нг·сут/мл)	AUC_{inf} (нг·сут/мл)	V_Z (мл/кг)	CL (мл/день/кг)	T_{1/2} (дни)
Группа 1	101	23022,95	1786,98	1796,61	464,24	556,6	0,58
	102	21253,62	1430,23	1439,25	609,28	694,81	0,61
	103	19911,69	1155,4	1160,51	796,97	861,69	0,64
	104	22034,81	1359,64	1366,49	623,67	731,80	0,59
	Среднее	21555,77	1433,06	1440,71	623,54	711,23	0,60
	СО	1313,57	263,15	265,01	136,21	125,49	0,03
Группа 2	201	22224,62	985,93	989,86	1106,42	1010,25	0,76
	202	18140,25	1018,39	1091,11	2120,84	916,50	1,60
	203	14576,70	661,19	665,65	161,32	1502,29	0,54
	204	12793,75	600,47	603,57	1243,17	1656,82	0,52
	Среднее	16933,83	816,49	837,55	1407,94	1271,46	0,85
	СО	4169,1	216,22	239,3	478,58	363,32	0,51

ФИГ. 6

Профили зависимости средней (СО) концентрации в сыворотке от времени после однократного в/в введения самцам яванских макак 1 мг/кг KL2B1251-NOTA (в группе 1) и KL2B1251-ТОРА (в группе 2)



Примечание: Точки данных с концентрациями ниже наименьшей поддающейся количественному определению концентрации (0,25 нг/мл) не показаны на графике.

ФИГ. 7