

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292083** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.11.09

(51) Int. Cl. *A61K 33/24* (2019.01)
A61K 33/241 (2019.01)
A61K 33/244 (2019.01)
A61K 33/245 (2019.01)
A61K 33/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.08

(54) **ПРОЛОНГИРОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ**

(31) **62/959,879; 63/037,520**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.01.10; 2020.06.10**

**Бьюрак Эрик Стивен, Меткаф Жюли
(CA), Гринштейн Натали (US), Ху
Мейдуо, Вэллиант Джон Фицморис,
Пател Сонал (CA)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/012656**

(87) **WO 2021/142231 2021.07.15**

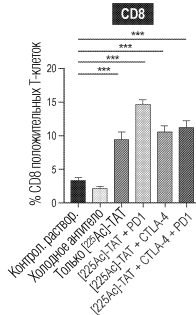
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

**ФБЮЖН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНК. (CA)**

Медведев В.Н. (RU)

(57) Способы индукции инфильтрации CD8⁺ Т-клеток в опухоль у пациента, который нуждается в этом, включающие введение радиоиммуноконъюгата, который способен связывать мишень, экспрессируемую, по меньшей мере, некоторыми клетками в опухоли. В некоторых вариантах осуществления популяция CD8⁺ Т-клеток, которая инфильтрирует опухоль, сохраняется у пациента и, вследствие этого, может предотвращать метастазирование и/или уменьшать вероятность рецидивов.



A1

202292083

202292083

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 575109EA/081

ПРОЛОНГИРОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 62/959879, поданной 10 января 2020 г., и предварительной патентной заявки США № 63/037520, поданной 10 июня 2020 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и в полном объеме включен посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 4 января 2021 г., имеет название FPI_009_Sequence_Listing_ST25.txt и размер 480 байт.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Многочисленные терапевтические средства были оценены для лечения рака. Однако многие терапевтические средства демонстрируют ограниченную лечебную эффективность при использовании в качестве монотерапии или имеют максимальную переносимую дозу, не подходящую для лечения. Неудачные результаты лечения включают раковые клетки, которые сохраняются даже после лечения из-за неспособности цитотоксических терапевтических средств уничтожить все жизнеспособные опухолевые клетки или, в случае пассивных или таргетированных иммунотерапевтических средств, из-за неспособности вызывать продуцирование и рекрутировать достаточное количество цитотоксических Т-клеток. Кроме того, раковые клетки могут метастазировать, с образованием вторичных опухолей, и/или подвергаться генетической перестройке, что позволяет им противостоять терапевтическим эффектам лечения противораковыми средствами, которые ранее приводили к уменьшению объема опухоли у пациентов и даже к кажущейся полной регрессии опухоли.

[0004] Соответственно, существует потребность в терапевтических средствах и способах лечения, обеспечивающих пролонгированную противораковую терапию, которую можно использовать отдельно или в сочетании с другими противораковыми терапевтическими средствами для достижения полного и/или стойкого противоракового терапевтического эффекта. Существует также неотложная потребность в эффективных методах лечения так называемых «холодных опухолей», устойчивых к современным иммунотерапевтическим методам лечения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Раскрытые в настоящем документе способы могут быть использованы для индукции инфильтрации популяции CD8⁺ Т-клеток в сердцевину опухоли, даже в опухоли, которые, как правило, слабо чувствительны к иммунотерапии (например, холодные опухоли). В соответствии с описанными в настоящем документе способами

пациенту, который нуждается в этом, вводят радиоиммуноконъюгат, способный к связыванию мишени, экспрессируемой по меньшей мере некоторыми клетками в опухоли. В некоторых вариантах осуществления популяция CD8+ Т-клеток, которая проникает в опухоль, сохраняется у пациента и, следовательно, может предотвращать образование метастазов и/или снижать вероятность рецидивов.

[0006] В одном аспекте предложены способы индукции инфильтрации CD8+ Т-клеток в опухоль у субъекта, который нуждается в этом, включающие стадия введения субъекту радиоиммуноконъюгата или его фармацевтической композиции, где радиоиммуноконъюгат имеет следующую структуру:

A-L-B

Формула I-a,

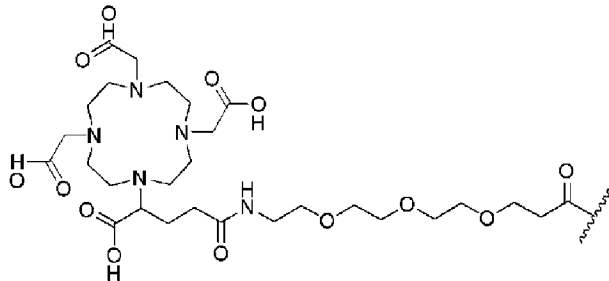
где

A представляет собой комплекс металла хелатообразующего фрагмента, где комплекс металла содержит актиний-225 (^{225}Ac) или его дочерние продукты,

L представляет собой линкер, и

B представляет собой направляющий фрагмент, способный к связыванию первого опухоли-ассоциированного антигена, экспрессируемого по меньшей мере некоторыми клетками в опухоли;

при условии, что, если A-L- представляет собой комплекс металла соединения 1, представленного ниже, то B не является AVE1642,



(Соединение 1);

где указанное введение указанного радиоиммуноконъюгата приводит к инфильтрации популяции CD8+ Т-клеток в сердцевину опухоли; где указанная популяция CD8+ Т-клеток содержит CD8+ Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор (TCR), специфический для второго опухоли-ассоциированного антигена, экспрессируемого по меньшей мере некоторыми клетками в опухоли; и где CD8+ Т-клетка способна к предпочтительному уничтожению клетки, экспрессирующей второй опухоли-ассоциированный антиген.

[0007] В некоторых вариантах осуществления популяцию CD8+ Т-клеток можно обнаруживать в сердцевине опухоли на уровне, превышающем эталонный уровень, например, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в пять раз превышающем эталонный уровень.

[0008] В некоторых вариантах осуществления популяция CD8+ Т-клеток

составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 7,5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12,5% или по меньшей мере 15% клеток (например, жизнеспособных клеток) в сердцевине опухоли.

[0009] В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65% или по меньшей мере 70% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

[0010] В некоторых вариантах осуществления CD8+Т-клетки можно обнаруживать у субъекта через по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 35 дней или по меньшей мере 40 дней после стадии введения.

[0011] В некоторых вариантах осуществления первый опухоль-ассоциированный антиген отличается от второго опухоль-ассоциированного антигена. В некоторых вариантах осуществления второй опухоль-ассоциированный антиген представляет собой неоантиген.

[0012] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой первичную опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой вторичную опухоль.

[0013] В некоторых вариантах осуществления опухоль не является высоко иммуногенной. Например, опухоль может быть умеренно иммуногенной или иммунологически холодной.

[0014] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет объем по меньшей мере 100 мм³, по меньшей мере 150 мм³ или по меньшей мере, или примерно, 175 мм³ в момент введения.

[0015] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль.

[0016] Например, солидная опухоль может представлять собой саркому, например, саркому, выбранную из группы, состоящей из ангиосаркомы или гемангиоэндотелиомы, астроцитомы, хондросаркомы, саркомы Юинга, фибросаркомы, глиомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы (ЗФГ), мезенхимной или смешанной мезодермальной опухоли, мезотелиальной саркомы или мезотелиомы, миксосаркомы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы и синовиальной саркомы. В некоторых вариантах осуществления саркома представляет собой остеосаркому.

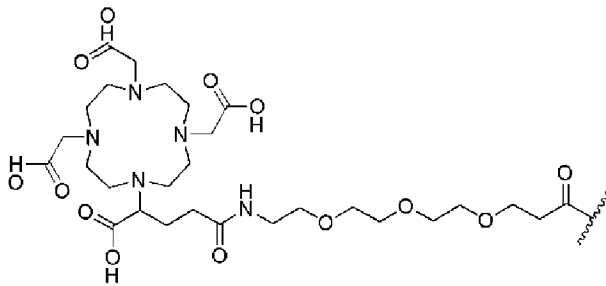
[0017] Например, солидная опухоль может представлять собой карциному, например, карциному, выбранную из группы, состоящей из аденоидно-кистозной карциномы, адренокортикальной карциномы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака эндометрия, рака желчного пузыря, рака желудка, рака головы и шеи, рака легкого (например, мелкоклеточного рака легкого или немелкоклеточного рака легкого, или аденокарциномы легкого),

нейробластомы, нейроэндокринного рака, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака почки, рака яичка. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой рак печени. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой рак головного мозга. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой нейробластому. В некоторых вариантах осуществления карцинома представляет собой меланому.

[0018] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой жидкую опухоль.

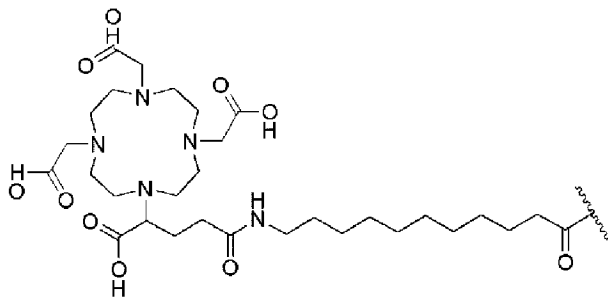
[0019] В некоторых вариантах осуществления стадия введения приводит к ингибированию пролиферации клеток в сердцевине опухоли. В некоторых вариантах осуществления стадия введения приводит к замедлению или ингибированию прогрессирования опухоли. В некоторых вариантах осуществления стадия введения приводит к регрессии опухоли. В некоторых вариантах осуществления стадия введения приводит к полной регрессии опухоли. В некоторых вариантах осуществления стадия введения предотвращает или ингибирует метастазирование опухолевых клеток.

[0020] В некоторых вариантах осуществления A-L- представляет собой комплекс металла соединения, выбранного из группы, состоящей из



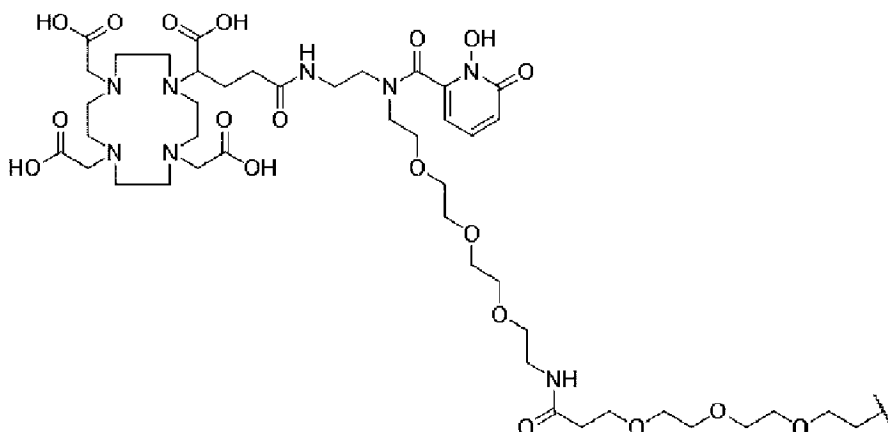
(i)

(Соединение 1),



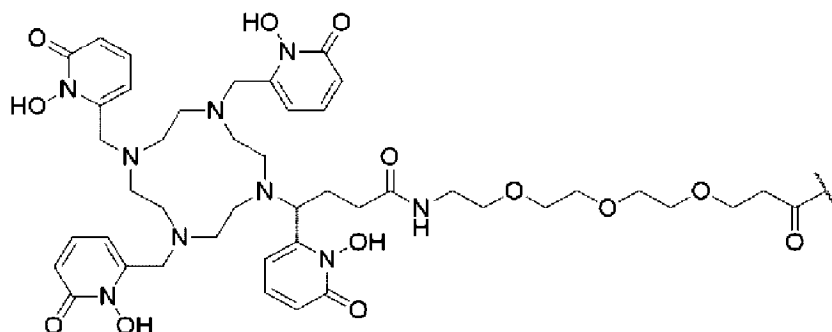
(ii)

(Соединение 2),



(iii)

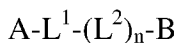
(Соединение 3), и



(iv)

(Соединение 4).

[0021] В некоторых вариантах осуществления L имеет структуру $-L^1-(L^2)_n-$, показанную в формуле I-b:

**Формула I-b,**

где

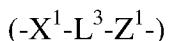
A представляет собой комплекс металла хелатообразующего фрагмента, где комплекс металла содержит актиний-225 (^{225}Ac) или его дочерние продукты;

B представляет собой направляющий фрагмент;

L^1 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, или необязательно замещенный арил или гетероарил;

n равно 1-5; и

каждый L^2 , независимо, имеет структуру:

**Формула III,**

где

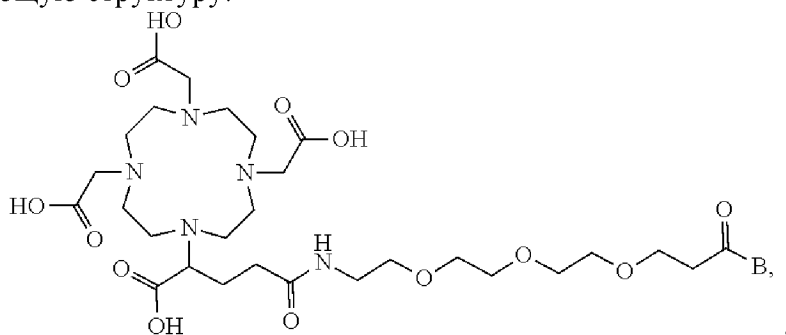
X^1 представляет собой $C=O(NR^1)$, $C=S(NR^1)$, $OC=O(NR^1)$, $NR^1C=O(O)$, $NR^1C=O(NR^1)$, $-CH_2PhC=O(NR^1)$, $-CH_2Ph(NH)C=S(NR^1)$, O или NR^1 ; и каждый R^1 независимо представляет собой H, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно

замещенный C₁-C₆ гетероалкил, или необязательно замещенный арил или гетероарил, в котором C₁-C₆ алкил может быть замещен оксо (=O), гетероарилом или их сочетанием;

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

Z¹ представляет собой CH₂, C=O, C=S, OC=O, NR¹C=O или NR¹, где R¹ представляет собой водород или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, или пирролидин-2,5-дион.

[0022] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат имеет следующую структуру:



где B представляет собой направляющий фрагмент.

[0023] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой полипептид.

[0024] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0025] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент имеет молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 100 кДа, по меньшей мере 125 кДа или по меньшей мере 150 кДа.

[0026] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой малую молекулу.

[0027] В некоторых вариантах осуществления первый опухоль-ассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), опухолевого эпителиального маркера 1 (TEM-1) и рецептора 3 фактора роста фибробластов (FGFR3).

[0028] В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, например, человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в лечении или предотвращении рака. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован рак. В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в лечении рефрактерного рака.

[0029] В некоторых вариантах осуществления стадия введения включает системное введение радиоиммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления системное введение включает парентеральное введение, например, внутривенное введение, внутриартериальное введение, внутривнутрибрюшинное введение, подкожное введение или внутрикожное введение. В некоторых вариантах осуществления системное введение

представляет собой энтеральное введение, например, трансгастроэнтеральное введение или пероральное введение.

[0030] В некоторых вариантах осуществления стадия введения включает местное введение радиоиммуноконъюгата. Например, местное введение может включать периопухолевую инъекцию и/или внутриопухолевую инъекцию.

[0031] В некоторых вариантах осуществления стадия введения включает создание контакта *ex vivo* радиоиммуноконъюгата с биологической жидкостью указанного субъекта, где указанная биологическая жидкость содержит по меньшей мере одну раковую клетку.

[0032] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат не вводят в сочетании с другим цитотоксическим средством.

[0033] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного лекарственного средства после стадии введения радиоиммуноконъюгата. Например, дополнительное лекарственное средство может представлять собой не цитотоксическое средство. В некоторых таких вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат вводят в более низкой эффективной дозе и/или дополнительное лекарственное средство вводят в более низкой эффективной дозе.

Определения

[0034] Используемый в настоящем документе термин «введение» средства субъекту означает создание контакта клетки указанного субъекта со средством. В некоторых вариантах осуществления «введение» средства включает создание контакта клетки указанного субъекта со средством *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления введение средства, например, введение радиоиммуноконъюгата, включает создание контакта биологической жидкости пациента, содержащей клетки (например, раковые клетки), со средством *ex vivo*.

[0035] Используемый в настоящем документе термин «антитело» означает полипептид, аминокислотная последовательность которого включает иммуноглобулины и их фрагменты, специфически связывающие определенный антиген или его фрагменты. Антитела по настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) или подтипа (например, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). Специалистам в данной области будет понятно, что характерная последовательность или часть антитела может включать аминокислоты, присутствующие в одной или более областях антитела (например, варибельной области, гиперварибельной области, константной области, тяжелой цепи, легкой цепи и их сочетании). Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что характерная последовательность или часть антитела может включать одну или более полипептидных цепей, и может включать элементы последовательности, встречающиеся в одной и той же полипептидной цепи или в разных полипептидных цепях.

[0036] Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части антитела, которая сохраняет специфичность характеристик

связывания исходного антитела.

[0037] Используемый в настоящем документе термин «связывает», или «связывание», например, применительно к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, означает по меньшей мере временное взаимодействие или ассоциацию с антигеном-мишенью. Например, «связывает», или «связывание», может относиться к процессу, в котором радиоиммуноконъюгат или CD8⁺ Т-клетка вступает во временный или постоянный контакт с раковой клеткой, экспрессирующей опухоль-ассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, направляющий фрагмент радиоиммуноконъюгата способен связывать опухоль-ассоциированный антиген. В таких вариантах осуществления связывание происходит путем взаимодействия между опухоль-ассоциированным антигеном и направляющим фрагментом радиоиммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, клетка популяции CD8⁺ Т-клеток способна связывать опухоль-ассоциированный антиген. Например, связывание включает процесс, в котором CD8⁺ Т-клетка вступает в устойчивый контакт с антигенпредставляющей клеткой путем взаимодействия между TCR, CD8 и антигеном, связанным с МНС.

[0038] В настоящем документе термины «бифункциональный хелат» или «бифункциональный конъюгат» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению радиоиммуноконъюгата, которое содержит хелатообразующую группу или ее комплекс металла, группу линкера и направляющий фрагмент (такой как антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает опухоль-специфический антиген или опухоль-ассоциированный антиген).

[0039] Термин «рак» относится к любому заболеванию, вызываемому пролиферацией злокачественных неопластических клеток, такому как опухоли, новообразования, карциномы, саркомы, лейкозы и лимфомы.

[0040] Используемый в настоящем документе термин «популяция CD8⁺ Т-клеток» означает группу из одной или более Т-клеток, которые экспрессируют клеточный поверхностный гликопротеин CD8 (кластер дифференцировки 8). CD8 представляет собой трансмембранный гликопротеин, который действует как корецептор для Т-клеточного рецептора (TCR) и связывает главный комплекс гистосовместимости. CD8 экспрессируется на поверхности цитотоксических Т-клеток, которые опосредуют уничтожение раковых клеток отчасти за счет узнавания специфического антигена, ассоциированного с раковой клеткой.

[0041] Термин «ингибитор контрольных точек», также известный как «ингибитор иммунных контрольных точек» (сокращенно «ИКТ»), означает средство, блокирующее действие белка иммунных контрольных точек, например, блокирующее связывание таких белков иммунных контрольных точек с их белками-партнерами. Известно, что некоторые раковые клетки экспрессируют белки иммунных контрольных точек, в результате чего Т-клетки не могут узнавать такие раковые клетки в качестве мишеней для уничтожения. Как правило, ингибиторы контрольных точек способствуют уничтожению раковых клеток Т-

клетками путем блокирования взаимодействий между специфическими белками иммунных контрольных точек на Т-клетках и клетками-мишенями, где такие взаимодействия в противном случае действовали бы как сигнал для ингибирования целевого разрушения клеток Т-клетками. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают средства, которые блокируют взаимодействие PD-1 и PD-L1, или которые блокируют взаимодействие CTLA-4 и B7-1/B7-2. Неограничивающие примеры специфических ингибиторов контрольных точек включают следующие лекарственные средства на основе антител: ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и цемиплимаб.

[0042] Используемый в настоящем документе термин «хелат» означает органическое соединение, или его фрагмент, которое может быть связано с центральным атомом металла или радиоактивного металла в двух или более точках.

[0043] Используемый в настоящем документе термин «конъюгат» означает молекулу, содержащую хелатообразующую группу или ее комплекс металла, группу линкера, и которая, необязательно, содержит направляющий фрагмент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

[0044] Используемый в настоящем документе термин «соединение» охватывает все стереоизомеры, геометрические изомеры и таутомеры представленных структур. Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть асимметричными (например, иметь один или более стереоцентров). Предусмотрены все стереоизомеры, такие как энантиомеры и диастереомеры, если нет иных указаний. Соединения по настоящему изобретению, которые содержат асимметрично замещенные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активных или рацемических формах. В данной области известны способы получения оптически активных форм из оптически активных исходных материалов, такие как разделение рацемических смесей или стереоселективный синтез.

[0045] Используемый в настоящем документе термин «холодные», или «иммунологически холодные», применительно к опухоли или раку означает опухоль, которая не отвечает на ингибирование контрольных точек (по меньшей мере в отсутствие лекарственного средства, отличного от ингибитора контрольных точек). Как правило, иммунологически холодная опухоль в отсутствие лекарственного средства характеризуется отсутствием, или незначительной степенью, инфильтрации опухолевых Т-клеток. Примеры иммунологически холодных опухолей включают, без ограничения, глиобластомы, рак яичников, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы и опухоли молочной железы, которые характеризуются отсутствием Т-клеточной инфильтрации.

[0046] Используемый в настоящем документе термин «сердцевина» применительно к опухоли означает область внутри опухоли, которая находится на расстоянии по меньшей мере примерно 250 мкм от краевой границы (также известной как «край» или «граница») опухоли.

[0047] Используемое в настоящем документе выражение «в сочетании с», когда его

используют в отношении методов лечения или терапевтических средств, относится к тем ситуациям, в которых субъект одновременно подвергается воздействию двух или более терапевтических средств или методов лечения. В некоторых вариантах осуществления методы лечения или терапевтические средства, которые применяют «в сочетании» друг с другом, вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления методы лечения или терапевтические средства, которые применяют «в сочетании» друг с другом, вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления методы лечения или терапевтические средства, которые применяют «в сочетании» друг с другом, вводят в перекрывающихся режимах дозирования.

[0048] Используемый в настоящем документе термин «цитотоксическое» применительно к средству или терапевтическому средству относится к средству или терапевтическому средству, которое вызывает прямую гибель клеток, например, путем непосредственной остановки деления и роста раковых клеток. Используемый в настоящем документе термин «цитотоксические» средства и терапевтические средства не относится к тем средствам и терапевтическим средствам, единственный вклад которых в уничтожение клеток является косвенным, например, за счет придания клеткам большей уязвимости для уничтожения иммунной системой (как это происходит при ингибировании иммунных контрольных точек) или за счет ингибирования репарации повреждений ДНК.

[0049] Используемое в настоящем документе выражение «обнаруживаемый у субъекта» означает, что объект поддается обнаружению в ткани или ее образце (например, образце опухоли, образце крови и так далее) у субъекта.

[0050] Используемые в настоящем документе термины «уменьшать», «уменьшение», «увеличивать», «увеличение», «сокращать», «сокращение» и другие относительные термины, такие как «больше», «выше», «меньше» и «ниже» (например, в отношении терапевтических результатов или эффектов) имеют значения относительно эталонного уровня, как описано в настоящем документе.

[0051] Используемый в настоящем документе термин «средство обнаружения» относится к молекуле или атому, которые полезны при диагностике заболевания путем обнаружения клеток, содержащих антиген. В данной области известны различные способы мечения полипептидов средствами обнаружения. Примеры средств обнаружения включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы и радионуклиды, красители (например, с комплексом биотин-стрептавидин), контрастные вещества, люминесцентные вещества (например, изотиоцианат флуоресцеина или FITC, родамин, люминофоры лантанидов, цианин и красители в ближней ИК-области спектра) и магнитные средства, такие как хелаты гадолиния.

[0052] Термин «ингибитор репарации повреждений ДНК» (иРПД) означает средство, которое предотвращает репарацию повреждений клеточной ДНК, вызываемых эндогенными или экзогенными хромосомными повреждениями, и которое действует путем ингибирования обычных механизмов репарации ДНК и связанных процессов, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток.

[0053] В настоящем документе термин «эффективное количество» при использовании применительно к средству (например, радиоиммуноконъюгату) означает количество, достаточное для достижения полезных или желаемых результатов, таких как клинические результаты. Термин «эффективное количество» зависит от контекста, в котором его используют.

[0054] Используемый в настоящем документе термин «иммуноконъюгат» означает конъюгат, включающий направляющий фрагмент, такой как антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), нанотело, аффитело или консенсусная последовательность домена фибронектина III типа. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит в среднем по меньшей мере 0,10 конъюгированного фрагмента на один направляющий фрагмент (например, в среднем по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 4, 5 или 8 конъюгированных фрагментов на один направляющий фрагмент).

[0055] В настоящем документе термин «иммуногенная» при использовании применительно к опухоли означает способность опухоли вызывать адаптивный иммунный ответ *in vivo*. Используемый в настоящем документе термин «высоко иммуногенная» опухоль относится к опухоли, которая в высокой степени реагирует на ингибирование иммунных контрольных точек, например, имеет место регрессия опухоли под воздействием ингибитора иммунных контрольных точек. Используемый в настоящем документе термин «умеренно иммуногенная» опухоль относится к опухоли, которая умеренно реагирует на ингибирование иммунных контрольных точек, например, имеет место в лучшем случае задержка прогрессирования опухоли, но не регрессия, в ответ на ингибирование иммунных контрольных точек.

[0056] В настоящем документе термин «инфильтрация» при использовании применительно к клеткам, например, иммунным клеткам, означает перемещение таких клеток из одной ткани в организме субъекта (например, крови или селезенки) в другую ткань в организме субъекта (например, опухоль). Таким образом, выражения «инфильтрация опухоли» или «инфильтрация в опухоль» означают перемещение клеток в опухоль из другого участка, и выражения «инфильтрация сердцевины опухоли» или «инфильтрация в сердцевину опухоли» означают перемещение клеток в сердцевину опухоли.

[0057] В настоящем документе термин «более низкая эффективная доза» при использовании применительно к средству (например, лекарственному средству) относится к ситуации, когда в протоколе лечения терапевтически эффективной является более низкая доза средства, чем доза, которая ранее была определена как терапевтически эффективная при использовании средства в качестве монотерапии в соответствующих экспериментах или в силу других терапевтических указаний.

[0058] В настоящем документе термин «краевая область» при использовании применительно к опухоли означает область, которая находится в пределах примерно 250 мкм с обеих сторон от краевой границы опухоли. Таким образом, «краевая область» при

упоминании в настоящем документе включает как область шириной 250 мкм внутри опухоли, так и область шириной 250 мкм за пределами опухоли.

[0059] Используемый в настоящем документе термин «неоантиген» означает вновь образовавшийся антиген, который ранее не распознавался иммунной системой. Неоантигены могут возникать различными способами, например, в результате изменения опухоли или белков (например, вследствие мутаций), из вирусных белков и так далее.

[0060]

[0061] Используемый в настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» означает композицию, содержащую соединение, описанное в настоящем документе, с фармацевтически приемлемым эксципиентом. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию производят или продают с одобрения государственного регулирующего органа как часть терапевтического режима лечения заболевания у млекопитающего. Фармацевтические композиции могут быть сформулированы, например, для перорального введения в стандартной лекарственной форме (например, таблетке, капсуле, каплете, гелевой капсуле или сиропе); для топического введения (например, в виде крема, геля, лосьона или мази); для внутривенного введения (например, в виде стерильного раствора, не содержащего частицы-эмболы, и в системе растворителя, подходящей для внутривенного использования); или в любом другом препарате, описанном в настоящем документе.

[0062] Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» означает любой ингредиент, отличный от соединений, описанных в настоящем документе (например, носитель, в котором может быть суспендировано или растворено активное соединение), не являющийся токсичным и не вызывающий воспаление у пациента. Эксципиенты могут включать, например: антиадгезионные средства, антиоксиданты, связывающие вещества, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, окрашивающие вещества (красители), смягчающие средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, ароматизаторы, отдушки, вещества, способствующие скольжению (усилители текучести), смазывающие вещества, консерванты, печатные краски, радиопротекторы, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители или гидратационные воды. Примеры эксципиентов включают, но не ограничиваются ими: аскорбиновую кислоту, гистидин, фосфатный буфер, бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, краскармеллозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, натриевую соль гликолята крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, стеариновую кислоту,

сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

[0063] Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к тем солям соединений, описанных в настоящем документе, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения или аллергической реакции. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, фармацевтически приемлемые соли описаны в: Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977 и в Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Соли могут быть получены *in situ* во время окончательного выделения и очистки соединений, описанных в настоящем документе, или отдельно путем проведения реакции группы свободного основания с подходящей органической кислотой.

[0064] Соединения по изобретению могут иметь ионизируемые группы, чтобы их можно было получать в виде фармацевтически приемлемых солей. Эти соли могут быть кислотнo-аддитивными солями, включающими неорганические или органические кислоты, или соли, в случае кислых форм соединений по изобретению, могут быть получены из неорганических или органических оснований. Часто соединения получают или используют в виде фармацевтически приемлемых солей, полученных в виде продуктов присоединения фармацевтически приемлемых кислот или оснований. Подходящие фармацевтически приемлемые кислоты и основания хорошо известны в данной области, например, соляная, серная, бромистоводородная, уксусная, молочная, лимонная или винная кислоты для образования кислотнo-аддитивных солей, а также гидроксид калия, гидроксид натрия, гидроксид аммония, кофеин, различные амины для образования основных солей. Способы получения соответствующих солей хорошо известны в данной области.

[0065] Типичные кислотнo-аддитивные соли включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валерат, в числе прочих. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция и магния, а также нетоксичных катионов аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь ими, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин и этиламин.

[0066] В настоящем документе термины «полипептид» и «пептид» используются взаимозаменяемо и относятся к цепи из по меньшей мере двух аминокислот, соединенных

друг с другом пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать по меньшей мере 3-5 аминокислот, каждая из которых присоединена к другим посредством по меньшей мере одной пептидной связи. Специалистам в данной области понятно, что полипептиды могут содержать одну или более «неприродных» аминокислот или других молекул, которые, тем не менее, способны интегрироваться в полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления полипептид может быть гликозилирован, например, полипептид может содержать один или более ковалентно связанных фрагментов сахара. В некоторых вариантах осуществления один «полипептид» (например, полипептид антитела) может содержать две или более отдельных полипептидных цепей, которые в некоторых случаях могут быть связаны друг с другом, например, одной или более дисульфидными связями или другими способами.

[0067] Используемое в настоящем документе выражение «предпочтительное уничтожение», или «предпочтительно уничтожают», относится к способности объекта (например, CD8+ Т-клетки или средства) уничтожать клетки одного типа в большей степени, чем клетки другого типа, например, уничтожать опухолевые клетки в большей степени, чем нормальные клетки, и/или уничтожать клетки, экспрессирующие антиген, в большей степени, чем клетки, не экспрессирующие антиген. В некоторых вариантах осуществления объект предпочтительно уничтожает клетки одного типа на уровнях, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз превышающих уровни для клеток другого типа.

[0068] Используемое в настоящем документе выражение «получение популяции CD8+ Т-клеток» относится к процессу получения и отбора цитотоксических Т-клеток, которые экспрессируют CD8 и подвергаются рекомбинации V(D)J и реаранжировке генов ДНК TCR, с образованием TCR, который узнает специфический антиген, например, клеточный поверхностный антиген, например, опухоль-ассоциированный антиген. Получение популяции CD8+ Т-клеток также может включать стадию размножения популяции CD8+ Т-клеток.

[0069] За получением популяции CD8+ Т-клеток может следовать активация популяции CD8+ Т-клеток. Используемый в настоящем документе термин «активация популяции CD8+ Т-клеток» относится к процессу, посредством которого клетки популяции CD8+ Т-клеток активируются для связывания опухоль-ассоциированного антигена и уничтожения раковой клетки. Активация CD8+ Т-клеток может включать взаимодействие с антигенпредставляющими клетками, например, зрелыми дендритными клетками. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, могут включать введение радиоиммуноконъюгата, например, пациенту, который нуждается в лечении, при этом введение приводит к активации популяции CD8+ Т-клеток.

[0070] Используемый в настоящем документе термин «радиоиммуноконъюгат» относится

к любому конъюгату, который содержит радиоизотоп или радионуклид, например, любой из радиоизотопов или радионуклидов, описанных в настоящем документе.

[0071] Используемый в настоящем документе термин «радиоиммуноконъюгат» относится к любому иммуноконъюгату, который содержит радиоизотоп или радионуклид, например, любой из радиоизотопов или радионуклидов, описанных в настоящем документе.

[0072] Термины «радиоиммунотерапия» или «иммунотерапия радиоконъюгатом» используют взаимозаменяемо. При использовании в настоящем документе эти термины относятся к способу достижения терапевтического эффекта при помощи радиоиммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления радиоиммунотерапия может включать введение радиоиммуноконъюгата субъекту, который нуждается в этом, при этом введение радиоиммуноконъюгата оказывает терапевтическое действие на субъекта. В некоторых вариантах осуществления радиоиммунотерапия может включать введение радиоиммуноконъюгата в клетку или биологическую жидкость пациента, которая содержит клетку, при этом введение радиоиммуноконъюгата приводит к уничтожению клетки. Когда радиоиммунотерапия включает избирательное уничтожение клетки, в некоторых вариантах осуществления клетка является раковой клеткой у субъекта, больного раком.

[0073] Используемый в настоящем документе термин «радионуклид» означает атом, способный к радиоактивному распаду (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{89}Zr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{229}Th , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{201}Tl). Для описания радионуклида также могут быть использованы термины «радиоактивный нуклид», «радиоизотоп» или «радиоактивный изотоп». Радиоактивные изотопы могут быть использованы в качестве средств обнаружения, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления радионуклид представляет собой излучающий альфа-частицы радионуклид.

[0074] Используемый в настоящем документе термин «эталонный уровень» означает уровень, наблюдаемый в соответствующих эталонных условиях. Например, в некоторых вариантах осуществления эталонный уровень представляет собой уровень, определяемый указанным способом для контроля в экспериментальной животной модели или клиническом испытании. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень представляет собой уровень у того же субъекта до, или в начале, лечения. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень представляет собой средний уровень в популяции, не подвергаемой воздействию указанным способом.

[0075] Используемый в настоящем документе термин «рефрактерный рак» относится к форме рака, которая не отвечает, или может не отвечать, на лечение используемым в настоящее время противораковым средством или современным режимом лечения рака. Термин «рефрактерный рак» охватывает те виды рака, которые устойчивы к

лечению в начале лечения, а также те виды рака, которые исходно демонстрируют ответ на лечение противораковым средством, а затем становятся невосприимчивыми к лечению. Например, рефрактерный рак может включать форму рака, при которой раковые клетки не перестают делиться в ответ на лечение или исходно прекращают деление в ответ на лечение, но возобновляют деление, несмотря на дальнейшее лечение противораковым средством. Кажущуюся регрессию с высокой частотой рецидивов также можно считать признаком рефрактерной формы рака. Рефрактерный рак может быть невосприимчивым к специфической противораковой терапии современными препаратами первой, второй или даже третьей линии. Пациент, страдающий от рефрактерного рака, в настоящем документе может быть назван «пациентом с рефрактерным раком».

[0076] В настоящем документе выражение «специфический для», используемое в контексте Т-клеточного рецептора (TCR), специфического для антигена, относится к способности TCR узнавать пептид после процессинга из антигена, когда этот пептид экспонируется на антигенпредставляющей клетке, например, когда пептид экспонируется в комплексе главного комплекса гистосовместимости (МНС)/ β -2 микроглобулин (β 2М).

[0077] В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» могут быть использованы взаимозаменяемо для обозначения человека или животного, отличного от человека (например, млекопитающего). В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, пациент нуждается в лечении рефрактерного рака. Такого пациента также можно называть «пациентом с рефрактерным раком».

[0078] Используемые в настоящем документе термины «существенная идентичность» или «по существу идентичная» относятся к последовательности полипептида, который имеет такую же полипептидную последовательность, соответственно, что и эталонная последовательность, или имеет определенный процент аминокислотных остатков, соответственно, которые являются такими же в соответствующем положении в исходной последовательности, когда две последовательности оптимально выровнены. Например, аминокислотная последовательность, которая «по существу идентична» эталонной последовательности, имеет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с эталонной аминокислотной последовательностью. Для полипептидов длина сравнительных последовательностей обычно составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 смежных аминокислот (например, полноразмерная последовательность). Идентичность последовательности может быть измерена с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей с настройками по умолчанию (например, пакет программного обеспечения для анализа последовательностей от Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Такое программное обеспечение может сопоставлять сходные последовательности, присваивая степени гомологии различным заменам, делециям и другим модификациям.

[0079] Используемый в настоящем документе термин «направляющий фрагмент» относится к любой молекуле или любой части молекулы, которая связывает конкретную мишень. В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой малую молекулу, белок или полипептид, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, нанотело, аффитело или консенсусная последовательность из домена фибронектина III типа.

[0080] При использовании в настоящем документе, и в соответствующей области, «лечить» состояние, или «лечение» состояния (например, состояний, описанных в настоящем документе, таких как рак), означает использование подхода для получения полезных или желаемых результатов, таких как клинические результаты. Полезные или желаемые результаты могут включать, но без ограничения, облегчение или ослабление одного или более симптомов или состояний; уменьшение степени тяжести существующего заболевания, нарушения или состояния; стабилизацию (то есть, отсутствие ухудшения) заболевания, нарушения или состояния; предотвращение распространения заболевания, нарушения или состояния; отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, нарушения или состояния; облегчение или временное облегчение заболевания, нарушения или состояния; а также ремиссию (частичную или полную), поддающуюся или не поддающуюся обнаружению. «Временное облегчение» заболевания, нарушения или состояния означает, что степень тяжести и/или нежелательные клинические проявления заболевания, нарушения или состояния уменьшаются, и/или динамика прогрессирования замедляется или продлевается, в сравнении со степенью тяжести или динамикой без лечения.

[0081] Используемый в настоящем документе термин «опухоль-ассоциированный антиген», или «ассоциированный с опухолью антиген», означает антиген, который присутствует на опухолевых клетках в значительно больших количествах, чем на нормальных клетках.

[0082] Опухоли

[0083] Используемый в настоящем документе термин «первичная опухоль» относится к исходной опухоли, растущей в первичном месте происхождения и не являющейся результатом метастазирования.

[0084] Используемый в настоящем документе термин «вторичная опухоль» означает опухоль, распространившуюся из первичного места происхождения к вторичному анатомическому участку, часто в процессе метастазирования. В контексте экспериментальной животной модели «вторичная опухоль» может также означать опухоль, которая образуется в эксперименте с повторной инициацией опухоли, в котором животному вновь вводят раковые клетки того же типа, что и те, которые вводили животному ранее.

[0085] «Солидная опухоль» представляет собой вид рака с аномальной массой ткани, например, саркомы, карциномы и лимфомы.

[0086] Используемый в настоящем документе термин «жидкая опухоль» означает

вид рака в биологической жидкости, например, лимфомы и лейкозы.

[0087] Используемый в настоящем документе термин «опухоль-специфический антиген», или «специфический для опухоли антиген», означает антиген, который эндогенно присутствует лишь на опухолевых клетках.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0088] На **ФИГ. 1А** проиллюстрирован эксперимент, описанный в примере 2 и проведенный с использованием сингенной мышшиной модели умеренно иммуногенной опухоли, модели мышшиного рака толстого кишечника СТ-26.

[0089] На **ФИГ. 1В** представлены кривые роста опухолей для мышей, получавших растворитель, ТАВ-199 (человеческое моноклональное анти-IGF-1R антитело) или [²²⁵Ac]-FPI-1792 («ТАТ») в дозе 100 нКи или 200 нКи. [²²⁵Ac]-FPI-1792 представляет собой радиоиммуноконъюгат, включающий ТАВ-199, конъюгированный с хелатообразующим фрагментом DOTA через линкер Fast-Clear™, где ²²⁵Ac находится в комплексе с фрагментом DOTA.

[0090] На **ФИГ. 1С** представлена серия панелей, показывающих репрезентативные окрашенные на Ki67 ткани опухоли СТ-26 от мышей, используемых в экспериментах, описанных в примере 2. Ki67 представляет собой маркер клеточной пролиферации. Срезы тканей получали из опухолей, иссеченных через 7 дней после введения контрольного растворителя (Д7-контроль-без лечения) или 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792 (Д7-200 нКи Ас-ТАВ-199). Верхние панели, увеличение 2X. Нижние панели, увеличение 20X.

[0091] На **ФИГ. 1D** представлена серия панелей, показывающих репрезентативные окрашенные на CD8 ткани опухоли СТ-26 от мышей, используемых в экспериментах, описанных в примере 2. CD8 представляет собой маркер Т-клеток. Срезы тканей получали из опухолей, иссеченных через 7 дней после введения контрольного растворителя (Д7-контроль-без лечения) или 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792 (Д7-200 нКи Ас-ТАВ-199). Верхние панели, увеличение 2X. Нижние панели, увеличение 20X.

[0092] На **ФИГ. 1E** представлена серия панелей, показывающих репрезентативные окрашенные на гранзим В ткани опухоли СТ-26 от мышей, используемых в экспериментах, описанных в примере 2. Гранзим В представляет собой сериновую протеазу, присутствующую в гранулах клеток - естественных киллеров и цитотоксических Т-клеток. Срезы тканей получали из опухолей, иссеченных через 7 дней после введения контрольного растворителя (Д7-контроль-без лечения) или 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792 (Д7-200 нКи Ас-ТАВ-199). Верхние панели, увеличение 2X. Нижние панели, увеличение 20X.

[0093] На **ФИГ. 2А** проиллюстрирован эксперимент, описанный в примере 3 и проведенный с использованием сингенной мышшиной модели умеренно иммуногенной опухоли, модели мышшиного рака толстого кишечника СТ-26.

[0094] На **ФИГ. 2В** представлен режим дозирования для экспериментов, описанных в примере 3. Цифры в верхней части **ФИГ. 3В** указывают дни.

[0095] На **ФИГ. 2С** представлены кривые роста опухолей для мышей, получавших растворитель, ТАВ-199 (человеческое моноклональное анти-IGF-1R антитело); 200 нКи

[²²⁵Ac]-FPI-1792 («ТАТ»); сочетание 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792 и анти-PD-1 антитела; сочетание 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792 и анти-CTLA-4 антитела; и сочетание 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, анти-PD-1 антитела и анти-CTLA-4 антитела. (Смотри пример 3.)

[0096] На **ФИГ. 2D** представлена серия панелей, показывающих репрезентативные окрашенные на Ki67 ткани опухоли СТ-26 от мышей, используемых в экспериментах, описанных в примере 3. Срезы тканей получали из опухолей, иссеченных через 12 дней после введения контрольного растворителя, ТАВ-199, [²²⁵Ac]-FPI-1792, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-PD-1.

[0097] На **ФИГ. 2E** представлена серия панелей, показывающих репрезентативные окрашенные на CD8 ткани опухоли СТ-26 от мышей, используемых в экспериментах, описанных в примере 3. Срезы тканей получали из опухолей, иссеченных через 12 дней после введения контрольного растворителя, ТАВ-199, [²²⁵Ac]-FPI-1792, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-PD-1.

[0098] На **ФИГ. 2F** представлена серия панелей, показывающих репрезентативные окрашенные на гранзим В ткани опухоли СТ-26 от мышей, используемых в экспериментах, описанных в примере 3. Срезы тканей получали из опухолей, иссеченных через 12 дней после введения контрольного растворителя, ТАВ-199, [²²⁵Ac]-FPI-1792, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-PD-1.

[0099] На **ФИГ. 2G** представлен график, показывающий количественную оценку Ki67-положительных клеток в опухолевых тканях из экспериментов, описанных в примере 3. Подсчет общего числа клеточных ядер и Ki67-положительных клеток проводили на пяти различных участках из сердцевины опухоли на срезах ткани, полученных из опухолей, иссеченных через 12 дней после введения контрольного растворителя, ТАВ-199, [²²⁵Ac]-FPI-1792, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-PD-1. Р-значения: *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

[0100] На **ФИГ. 2H** представлен график, показывающий количественную оценку CD8-положительных клеток в опухолевых тканях из экспериментов, описанных в примере 3. Подсчет общего числа клеточных ядер и CD8-положительных клеток проводили на пяти различных участках из сердцевины опухоли на срезах ткани, полученных из опухолей, иссеченных через 12 дней после введения контрольного растворителя, ТАВ-199, [²²⁵Ac]-FPI-1792, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-PD-1. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

[0101] На **ФИГ. 2I** представлен график, показывающий количественную оценку гранзим В-положительных клеток в опухолевых тканях из экспериментов, описанных в примере 3. Подсчет общего числа клеточных ядер и гранзим В-положительных клеток проводили на пяти различных участках из сердцевины опухоли на срезах ткани,

полученных из опухолей, иссеченных через 12 дней после введения контрольного растворителя, ТАВ-199, [²²⁵Ac]-FPI-1792, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-PD-1. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

[0102] На **ФИГ. 3А** проиллюстрирован эксперимент с повторным введением опухолевых клеток, описанный в примере 4 и проведенный с использованием сингенной мышшиной модели умеренно иммуногенной опухоли, модели мышшиного рака толстого кишечника СТ-26.

[0103] На **ФИГ. 3В** представлена серия панелей, показывающих результаты иммунологического окрашивания на CD8 имплантированного аллотрансплантата ткани опухоли СТ-26 через 11 дней после второго раунда имплантации аллотрансплантата клеток опухоли СТ-26 у мышшей, которые не получали лечение (контрольная опухоль), или у мышшей, которым исходно вводили 200 нКи радиоиммуноконъюгата в начале эксперимента (вторичная опухоль), как описано в примере 4.

[0104] На **ФИГ. 3С** представлены кривые роста вторичной опухоли у мышшей, получавших растворитель, [²²⁵Ac]-FPI-1792 («ТАТ»), [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD1, [²²⁵Ac]-FPI-1792+CTLA4 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD1+анти-CTLA4. Объем опухолей показан в зависимости от количества дней после повторной имплантации опухоли. Эксперименты описаны в примере 4.

[0105] На **ФИГ. 4А** проиллюстрирован эксперимент с повторным введением опухолевых клеток, проведенный на мышшах с использованием сингенной мышшиной модели умеренно иммуногенной опухоли, модели мышшиного рака толстого кишечника СТ-26. В примере 5 описан анализ Т-клеток у мышшей в эксперименте с повторным введением опухолевых клеток.

[0106] На **ФИГ. 4В** показана частота встречаемости CD8+ Т-клеток в селезенке и опухолях мышшей, не получавших лечение или получавших [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-PD-1, как описано в примере 5.

[0107] На **ФИГ. 4С** схематически представлены результаты тетрамерного анализа, используемого в экспериментах, описанных в примере 5. Тетрамерный анализ позволяет количественно определять антиген-специфические CD8+ Т-клетки, когда известна молекула МНС класса I и пептидная последовательность антигена. Пептидным антигеном, используемым в данном анализе, был АН1 (SPSYVYHGF (SEQ ID NO: 1)), иммунодоминантный эпитоп CD8+ Т-клеток из СТ-26 (используемая в сингенной мышшиной модели линия клеток рака толстого кишечника, из которой формировались опухоли).

[0108] На **ФИГ. 4D** показана частота встречаемости (СТ-26) антиген-специфических CD8+ Т-клеток (в виде процентной доли от всех CD8+ Т-клеток) в селезенке и опухолях мышшей, не получавших лечение или получавших [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD-1, [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4 или [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA-4+анти-

PD-1, как описано в примере 5. Частоту встречаемости CD8+ Т-клеток, специфических для пептида СТ26 (АН1), определяли с использованием тетрамерного анализа. (Смотри Фигуру 4С).

[0109] На **ФИГ. 5А** проиллюстрирован эксперимент, описанный в примере 6 и проведенный с использованием сингенной мышинной модели иммунологически холодной опухоли, модели трижды негативного рака молочной железы 4Т1.

[0110] На **ФИГ. 5В** представлены кривые роста опухоли 4Т1 для мышей, получавших растворитель, анти-CTLA-4 антитело, [²²⁵Ac]-FPI-1792 («ТАТ») или сочетание анти-CTLA-4 антитела и [²²⁵Ac]-FPI-1792, как описано в примере 6.

[0111] На **ФИГ. 5С** представлены кривые роста опухоли 4Т1 для мышей, получавших растворитель, RMP1-14 (анти-PD-1 антитело), [²²⁵Ac]-FPI-1792 («ТАТ») или сочетание RMP1-14 и [²²⁵Ac]-FPI-1792, как описано в примере 6.

[0112] Следует понимать, что фигуры не обязательно нарисованы в масштабе, равно как и объекты на фигурах не обязательно нарисованы в масштабе по отношению друг к другу. Фигуры представляют собой изображения, предназначенные для обеспечения ясности и понимания различных вариантов осуществления устройств, систем и способов, раскрытых в настоящем документе. Там, где это возможно, на чертежах будут использованы одни и те же ссылочные номера для обозначения одних и тех же или подобных деталей. Более того, следует понимать, что чертежи никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0113] В настоящем документе описаны способы индукции инфильтрации CD8+ Т-клеток в опухоль (например, в сердцевину опухоли) у пациента, который нуждается в этом. Раскрытые способы включают стадия введения пациенту радиоиммуноконъюгата, имеющего структуру, описанную далее в настоящем документе, или его фармацевтической композиции.

Радиоиммуноконъюгаты

[0114] Радиоиммуноконъюгаты, используемые по изобретению, как правило, имеют структуру формулы I-a:

A-L-B

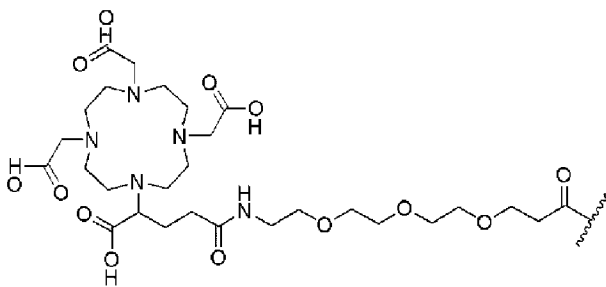
Формула I-a,

где

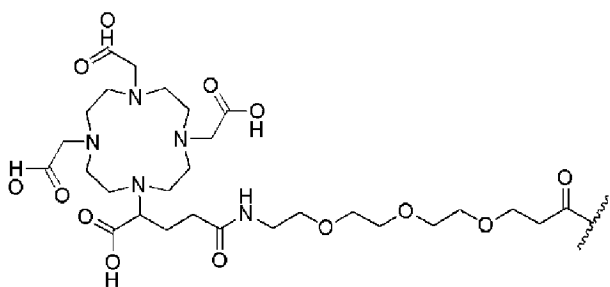
A представляет собой комплекс металла хелатообразующего фрагмента, где комплекс металла содержит актиний-225 (²²⁵Ac) или его дочерние продукты,

L представляет собой линкер, и

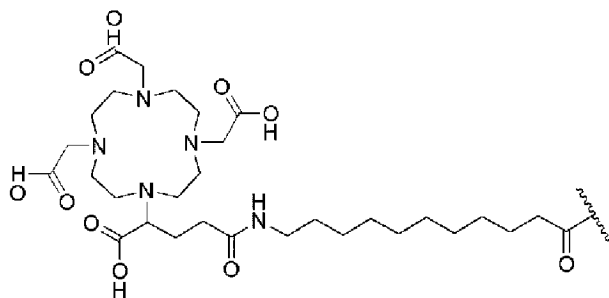
B представляет собой направляющий фрагмент, способный к связыванию первого опухоль-ассоциированного антигена, при условии, что если A-L- представляет собой комплекс металла соединения 1, показанного ниже, то B не является AVE1642.

**(Соединение 1)**

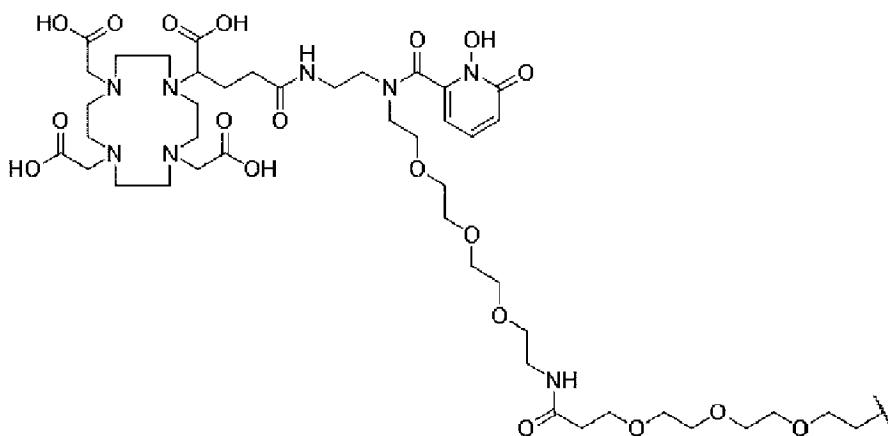
[0115] В некоторых вариантах осуществления А-Л- представляет собой комплекс металла соединения, выбранного из группы, состоящей из



(i)

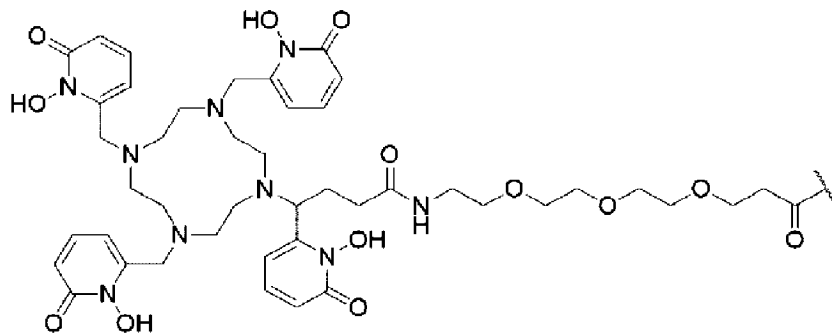
(Соединение 1),

(ii)

(Соединение 2),

(iii)

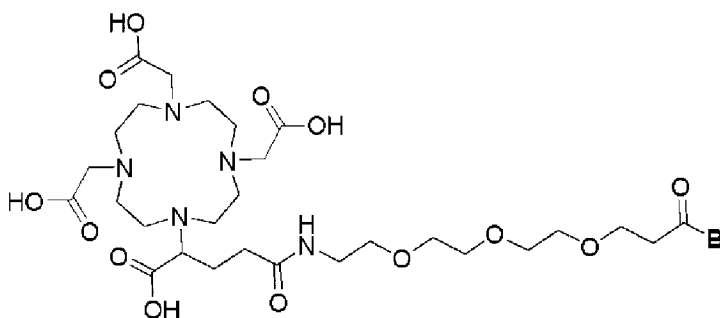
(Соединение 3), и



(iv)

(Соединение 4).

[0116] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат имеет или содержит структуру, представленную формулой II:

**Формула II,**

где B представляет собой направляющий фрагмент, и ^{225}Ac находится в комплексе с 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислотой (DOTA).

[0117] В некоторых вариантах осуществления среднее отношение или медианное отношение хелатообразующего фрагмента к направляющему фрагменту составляет восемь или менее, семь или менее, шесть или менее, пять или менее, четыре или менее, три или менее, два или менее или примерно единицу. В некоторых радиоиммуноконъюгатах среднее отношение или медианное отношение хелатообразующего фрагмента к направляющему фрагменту составляет примерно единицу.

[0118] В некоторых вариантах осуществления после введения радиоиммуноконъюгата млекопитающему доля радиации (от общего количества применяемой радиации), которая выводится кишечным путем, почечным путем, или обоими путями, превышает долю радиации, которая выводится у сопоставимого млекопитающего, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат. Под «эталонным иммуноконъюгатом» подразумевается известный радиоиммуноконъюгат, который отличается от радиоиммуноконъюгата, описанного в настоящем документе, по меньшей мере, (1) наличием другого линкера; (2) наличием направляющего фрагмента другого размера и/или (3) отсутствием направляющего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления эталонный радиоиммуноконъюгат выбран из группы, состоящей из [^{90}Y]-

ибритумомаб тиуксетана (зевалин (90Y)) и [¹¹¹In]-ибритумомаб тиуксетана (зевалин (In-111)).

[0119] В некоторых вариантах осуществления доля радиации, выводимой конкретным путем или совокупностью путей, превышает на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%.%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере 95% долю радиации, выводимой тем же путем (путями) у сопоставимого млекопитающего, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат. В некоторых вариантах осуществления доля выводимой радиации превышает по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз долю радиации, выводимой у сопоставимого млекопитающего, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат. Степень экскреции можно измерять способами, известными в данной области, например, путем измерения радиоактивности в моче и/или фекалиях, и/или путем измерения общей радиоактивности организма за определенный период времени. Смотри также, например, международную патентную публикацию WO 2018/024869.

[0120] В некоторых вариантах осуществления степень экскреции измеряют через период времени, составляющий по меньшей мере или примерно 12 часов после введения, по меньшей мере или примерно 24 часа после введения, по меньшей мере или примерно 2 дня после введения, по меньшей мере или примерно 3 дня после введения, по меньшей мере или примерно через 4 дня после введения, по меньшей мере или примерно через 5 дней после введения, по меньшей мере или примерно через 6 дней после введения, или по меньшей мере или примерно через 7 дней после введения.

[0121] В некоторых вариантах осуществления, когда радиоиммуноконъюгаты по настоящему изобретению вводят мышам, (a) менее 15% общей введенной радиации выводится в 1 день после введения и (b) по меньшей мере 15% общей введенной радиации выводится на 7 день после введения.

[0122] В некоторых вариантах осуществления, когда радиоиммуноконъюгаты по настоящему изобретению вводят мышам, менее 10% общей введенной радиации выводится почечным путем на 2 день после введения.

[0123] В некоторых вариантах осуществления, когда радиоиммуноконъюгаты по настоящему изобретению вводят мышам, (a) менее 15% общей введенной радиации выводится в 1 день после введения; (b) менее 10% общей введенной радиации выводится почечным путем на 2 день после введения; и (c) по меньшей мере 15% общей введенной радиации выводится на 7 день после введения.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, в которых направляющий фрагмент представляет собой малую молекулу и/или имеет молекулярную массу менее 50 кДа, когда радиоиммуноконъюгат вводят мыши, (а) менее 15% общей введенной радиации выводится в 1 день после введения; и (б) по меньшей мере 15% общей введенной радиации выводится на 7 день после введения.

[0125] В некоторых вариантах осуществления, в которых направляющий фрагмент представляет собой малую молекулу и/или имеет молекулярную массу менее 50 кДа, когда радиоиммуноконъюгат вводят мыши, (а) менее 15% общей введенной радиации выводится в 1 день после введения; (б) менее 10% общей введенной радиации выводится почечным путем на 2 день после введения; и (в) по меньшей мере 15% общей введенной радиации выводится на 7 день после введения.

[0126] В некоторых вариантах осуществления после введения радиоиммуноконъюгата млекопитающему радиоиммуноконъюгат проявляет сниженные эффекты нецелевого связывания (например, токсичность) в сравнении с эталонным конъюгатом (например, эталонным иммуноконъюгатом, таким как эталонный радиоиммуноконъюгат). В некоторых вариантах осуществления этот сниженный эффект нецелевого связывания является характерной особенностью радиоиммуноконъюгата, который также демонстрирует более высокую скорость выведения, как описано в настоящем документе.

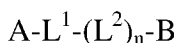
Хелатообразующие фрагменты

[0127] Примеры подходящих хелатообразующих фрагментов включают, но без ограничения, DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), DOTMA (1R,4R,7R,10R)- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота, DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан), DOTPA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрапропионовая кислота), DO3AM-уксусная кислота (2-(4,7,10-трис(2-амино-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)уксусная кислота), ангидрид DOTA-GA (2,2',2''-(10-(2,6-диоксотетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триил)триуксусная кислота, DOTP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфоновая кислота)), DOTMP (1,4,6,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраметиленфосфоновая кислота), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновая кислота), СВ-ТЕ2А (1,4,8,11-тетраазабицикло[6,6,2]гексадецен-4,11-диуксусная кислота), NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусная кислота), NOTP (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-три(метиленфосфоновая кислота), ТЕТРА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовая кислота), ТЕТА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота), НЕНА (1,4,7,10,13,16-гексаазациклогексадецен-1,4,7,10,13,16-гексауксусная кислота), РЕРА (1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан-N, N',N'',N''',N''''-пентауксусная кислота), H₄октапа(N, N'-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)этилендиамин-N, N'-диуксусная кислота), H₂дедпа(1,2-[[6-(карбокси)пиридин-2-ил]метиламино]этан),

Н₆фоспа(N, N'-(метиленфосфонат)-N, N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]метил-1,2-диаминоэтан), ТТНА (триэтилентетрамин-N, N,N',N'',N''',N''''-гексауксусная кислота), DO2P (тетраазациклододекандиметанфосфоновая кислота), HP-DO3A (гидроксипропилтетраазациклододекантриуксусная кислота), EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), дефероксамин, ДТРА (диэтилентриаминпентауксусная кислота), ДТРА-ВМА (диэтилентриаминпентауксусная кислота-бисметиламид), НОРО (октадентатгидроксипиридины) или порфирины.

Линкеры

[0128] В некоторых вариантах осуществления линкер является таким, как показано в составе структуры формулы I-b, в виде части формулы I-b без А и В:



Формула I-b

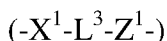
(А и В являются такими, как определено для формулы I-a).

[0129] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-L^1-(L^2)_n-$, где:

L^1 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, или необязательно замещенный арил или гетероарил;

n равно 1-5; и

каждый L^2 , независимо, имеет структуру:



Формула III,

где X^1 представляет собой $C=O(NR^1)$, $C=S(NR^1)$, $OC=O(NR^1)$, $NR^1C=O(O)$, $NR^1C=O(NR^1)$, $-CH_2PhC=O(NR^1)$, $-CH_2Ph(NH)C=S(NR^1)$, O или NR^1 ; и каждый R^1 независимо представляет собой H, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, или необязательно замещенный арил или гетероарил, в котором C_1-C_6 алкил может быть замещен оксо (=O), гетероарилом или их сочетанием;

L^3 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_{50} алкил или необязательно замещенный C_1-C_{50} гетероалкил (например, C_5-C_{20} полиэтиленгликоль);

Z^1 представляет собой CH_2 , $C=O$, $C=S$, $OC=O$, $NR^1C=O$ или NR^1 , где R^1 представляет собой водород или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, или пирролидин-2,5-дион.

[0130] В некоторых вариантах осуществления L^1 представляет собой замещенный C_1-C_6 алкил или замещенный C_1-C_6 гетероалкил, где заместитель представляет собой гетероарильную группу (например, шестичленный азотсодержащий гетероарил).

[0131] В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой замещенный C_1-C_{50} алкил или замещенный C_1-C_{50} гетероалкил, где заместитель представляет собой гетероарильную группу (например, шестичленный азотсодержащий гетероарил).

[0132] В некоторых вариантах осуществления А представляет собой макроциклический хелатообразующий фрагмент, содержащий одну или более гетероарильных групп (таких как шестичленный азотсодержащий гетероарил).

Сшивающие группы

[0133] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты содержат сшивающую группу вместо, или помимо, направляющего фрагмента (например, В в формуле I содержит сшивающую группу).

[0134] Сшивающая группа представляет собой реакционноспособную группу, которая способна соединять две или более молекул ковалентной связью. Сшивающие группы могут быть использованы для присоединения линкера и хелатообразующего фрагмента к терапевтическому или направляющему фрагменту. Сшивающие группы также могут быть использованы для присоединения линкера и хелатообразующего фрагмента к мишени *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления сшивающая группа представляет собой аминокислотную, метионин-реактивную или тиол-реактивную сшивающую группу, или имеет место опосредованное сортазой сшивание. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная или тиол-реактивная сшивающая группа содержит активированный сложный эфир, такой как сложный эфир гидроксисукцинимид, сложный эфир 2,3,5,6-тетрафторфенола, сложный эфир 4-нитрофенола или имидат, ангидрид, тиол, дисульфид, малеимид, азид, алкин, напряженный алкин, напряженный алкен, галоген, сульфонат, галоацетил, амин, гидразид, диазиридин, фосфин, тетразин, изотиоцианат или оксазиридин. В некоторых вариантах осуществления последовательность узнавания сортазой может включать концевую аминокислотную последовательность глицин-глицин-глицин (GGG) и/или LPTXG, где X представляет собой любую аминокислоту. Специалисту в данной области будет понятно, что использование сшивающих групп не ограничивается раскрытыми в настоящем документе конкретными конструкциями, а может включать и другие известные сшивающие группы.

Направляющие фрагменты

[0135] Направляющие фрагменты включают любую молекулу или любую часть молекулы, которая способна связывать конкретную мишень, например, опухоль-ассоциированный антиген или опухоль-специфический антиген. В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент способен связывать эпитоп в составе мишени. В контексте способа, включающего введение радиоиммуноконъюгата пациенту, имеющему опухоль, мишень может представлять собой, например, антиген (например, опухоль-ассоциированный антиген или опухоль-специфический антиген), экспрессируемый по меньшей мере некоторыми клетками в опухоли.

[0136] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент способен связывать антиген (например, опухоль-ассоциированный антиген или опухоль-специфический антиген), экспрессируемый по меньшей мере некоторыми клетками в опухоли. Примеры подходящих опухоль-ассоциированных антигенов включают, но без ограничения, IGF-1R, опухолевый эпителиальный маркер 1 (TEM-1, также известный как эндосиалин) и FGFR3. В вариантах осуществления, в которых опухоль-ассоциированный антиген представляет собой IGF-1R, направляющий фрагмент не является AVE1642

(гуманизированное моноклональное анти-IGF-1R антитело (Sanofi[®]-Aventis/Immunogen)).

[0137] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент имеет молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 50 кДа, по меньшей мере 75 кДа, по меньшей мере 100 кДа, по меньшей мере 125 кДа, по меньшей мере 150 кДа, по меньшей мере 175 кДа, по меньшей мере 200 кДа, по меньшей мере 225 кДа, по меньшей мере 250 кДа, по меньшей мере 275 кДа или по меньшей мере 300 кДа. В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент имеет молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 100 кДа, по меньшей мере 125 кДа или по меньшей мере 150 кДа.

[0138] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой малую молекулу. Например, малые молекулы, которые представляют собой направляющие лиганды (например, высокоаффинные направляющие лиганды) или их производные, могут быть использованы в качестве направляющего фрагмента. Примеры подходящих малых молекул включают, без ограничения, PSMA-617 (лиганд простатического специфического мембранного антигена) и ЗВР-227 (антагонист нейротензиновых рецепторов I типа).

[0139] В некоторых вариантах осуществления фрагмент является одновременно направляющим и терапевтическим фрагментом, то есть, фрагмент способен связывать конкретную мишень и приносить терапевтическую пользу.

[0140] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой белок или полипептид (например, модифицированный полипептид). В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, авимеров, нанотел, аффител и консенсусных последовательностей из доменов фибронектина III типа (например, центрины или аднектины) или молекул, содержащих любые из вышеперечисленных.

Антитела

[0141] В некоторых вариантах осуществления направляющий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела, как правило, содержат две идентичные легкие полипептидные цепи и две идентичные тяжелые полипептидные цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Первый домен, расположенный на амино-конце каждой цепи, имеет переменную аминокислотную последовательность, обеспечивающую специфичность связывания каждого отдельного антитела. Они известны как переменные области тяжелой цепи (VH) и переменные области легкой цепи (VL). Другие домены каждой цепи относительно инвариантны в аминокислотной последовательности и известны как константные области тяжелой цепи (CH) и константные области легкой цепи (CL). Легкие цепи обычно содержат одну переменную область (VL) и одну константную область (CL). Тяжелая цепь IgG включает переменную область (VH), первую константную область (CH1), шарнирную область, вторую константную область (CH2) и третью

константную область (СН3). В антителах IgE и IgM тяжелая цепь включает дополнительную константную область (СН4).

[0142] Антитела, подходящие для использования по настоящему изобретению, могут включать, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, верблюжьи антитела, химерные антитела, одноцепочечные Fv (scFv), дисульфид-связанные Fv (sdFv) и антиидиотипические (анти-Id) антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, является химерным. Антитела могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу.

[0143] Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связывать антиген. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, scFv-фрагмент, dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546) и выделенную определяющую комплементарность область (CDR). В некоторых вариантах осуществления «антигенсвязывающий фрагмент» содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

[0144] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть получены любым способом, известным в данной области для синтеза антител (смотри, например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2-е издание, 1988); Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Химерные антитела могут быть получены способами, описанными, например, в Morrison, 1985, *Science* 229:1202, а гуманизированные антитела способами, описанными, например, в патенте США № 6180370.

[0145] Дополнительные антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой биспецифические антитела и поливалентные антитела, описанные, например, в Segal et al., *J. Immunol. Methods* 248:1-6 (2001); и Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991), или любую из молекул, описанных в настоящем документе.

[0146] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены варианты аминокислотной последовательности антител или их антигенсвязывающих фрагментов; например, варианты, которые сохраняют способность связывать предполагаемую мишень.

Например, может быть желательно улучшать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Варианты аминокислотной последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Любое сочетание делеций, вставок и замен может быть использовано для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, такими как связывание антигена.

[0147] В некоторых вариантах осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, представляет собой ингибирующее антитело (также называемое «антагонистическим антителом»), или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по меньшей мере частично ингибируют одну или более функций мишени.

[0148] В некоторых вариантах осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет константу диссоциации (K_d) от 1 нМ до 10 нМ (включая конечные точки) или от 0,1 нМ до 1 нМ (включая конечные точки).

[0149] В некоторых вариантах осуществления K_d измеряют с помощью анализа связывания антигена с радиоактивной меткой (радиоиммуноанализ, РИА), проводимого с использованием Fab-варианта интересующего антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, и его антигена.

[0150] В некоторых вариантах осуществления K_d измеряют с использованием анализов поверхностного плазмонного резонанса с иммобилизованным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, представляют собой моноклональные антитела человека, направленные против эпитопа мишени (например, опухоль-ассоциированного антигена или опухоль-специфического антигена).

[0151] Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, может представлять собой любое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, природного и/или синтетического происхождения, например антитело млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления константный домен, в случае его наличия, представляет собой константный домен человека. В некоторых вариантах осуществления переменный домен представляет собой переменный домен млекопитающего, например, гуманизированный или человеческий переменный домен.

[0152] В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые по настоящему изобретению, представляют собой моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой рекомбинантные мышинные

антитела, химерные, гуманизированные или полностью человеческие антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) или их антигенсвязывающие фрагменты.

[0153] В некоторых вариантах осуществления они дополнительно связаны с другими фрагментами, например, для нацеливания лекарственного средства и приложений визуализации.

[0154] В некоторых вариантах осуществления, например, для диагностических целей, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент метят, то есть связывают с маркирующей группой. Неограничивающие примеры подходящих меток включают радиоактивные метки, флуоресцентные метки, подходящие красящие группы, ферментные метки, хромогены, хемилюминесцентные группы, биотинильные группы, заданные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером, и так далее. В некоторых вариантах осуществления одна или более меток ковалентно связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0155] Эти меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (также называемые «конъюгатами антител») можно, в частности, использовать в иммуногистохимических анализах или для молекулярной визуализации *in vivo*.

[0156] В некоторых вариантах осуществления, например, для терапевтических целей, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно конъюгируют с эффекторной группой, в частности, с терапевтической эффекторной группой, такой как цитотоксическое средство или радиоактивная группа.

Полипептиды

[0157] Полипептиды включают, например, любое из множества гематологических средств (включая, например, эритропоэтин, факторы свертывания крови и так далее), интерфероны, колониестимулирующие факторы, антитела, ферменты и гормоны. Характер конкретного полипептида не должен быть ограничен по настоящему изобретению, и любой интересующий полипептид может быть полипептидом в настоящих способах.

[0158] Полипептид, описанный в настоящем документе, может включать мишень-связывающий домен, который способен связывать интересующую мишень (например, опухоль-ассоциированный антиген или опухоль-специфический антиген). Например, полипептид может быть способен связывать трансмембранный полипептид (например, рецептор) или лиганд (например, фактор роста).

[0159] В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой синтетический полипептид, например, аналог встречающегося в природе полипептида (например, соматостатина).

[0160] Неограничивающие примеры подходящих полипептидов включают циклические октапептиды, такие как октреотат и октреотид. Например, октреотат и октреотид могут быть конъюгированы с бифункциональными хелатообразующими фрагментами DOTA, с образованием DOTA-TATE и DOTA-TOC, соответственно,

которые часто используют при раке с высоким уровнем экспрессии SSTR2.

Модифицированные полипептиды

[0161] Полипептиды, подходящие для использования с композициями и способами по настоящему изобретению, могут иметь модифицированную аминокислотную последовательность. Модифицированные полипептиды могут быть по существу идентичны соответствующему эталонному полипептиду (например, аминокислотная последовательность модифицированного полипептида может иметь по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью эталонного полипептида). В некоторых вариантах осуществления модификация не нарушает в значительной степени желаемую биологическую активность. Модификация может уменьшать (например, по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 25%, 35%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95%), может не влиять на, или может повышать (например, по меньшей мере на 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200%, 500% или 1000%) биологическую активность исходного полипептида. Модифицированный полипептид может иметь такую же, или оптимизированную, характеристику полипептида, например, стабильность *in vivo*, биодоступность, токсичность, иммунологическую активность, иммунологическую идентичность и свойства конъюгации.

[0162] Модификации включают модификации в результате естественных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или в результате использования методов химической модификации, известных в данной области. Модификации могут иметь место в любом участке полипептида, включая каркас полипептида, боковые цепи аминокислот и amino- или карбоксильный конец. Модификации одного и того же типа могут присутствовать в той же, или различной, степени в нескольких сайтах конкретного полипептида, и полипептид может содержать модификации более чем одного типа. Полипептиды могут быть разветвленными в результате убиквитинирования, и они могут быть циклическими, с разветвлениями или без них. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические полипептиды могут быть результатом посттрансляционных естественных процессов или могут быть получены синтетическим путем. Другие модификации включают пегилирование, ацетилирование, ацилирование, добавление ацетомидометильной (Acм) группы, АДФ-рибозилирование, алкилирование, амидирование, биотинилирование, карбамоилирование, карбоксиэтилирование, этерификацию, ковалентное присоединение к флавину, ковалентное присоединение к фрагменту гема, ковалентное присоединение к нуклеотиду или нуклеотидному производному, ковалентное присоединение лекарственного средства, ковалентное присоединение маркера (например, флуоресцентного или радиоактивного), ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование,

гликозилирование, образование якоря GPI, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование, и убиквитинирование.

[0163] Модифицированный полипептид может также иметь аминокислотную вставку, делецию или замену, как консервативную, так и неконсервативную (например, D-аминокислоты, дезаминокислоты) в полипептидной последовательности (например, если такие изменения существенно не изменяют биологическую активность полипептида). В частности, добавление одного или более остатков цистеина к амино- или карбоксильному концу полипептида по настоящему изобретению может облегчать конъюгацию этих полипептидов, например, посредством дисульфидной связи. Например, полипептид можно модифицировать, включая один остаток цистеина на амино-конце или один остаток цистеина на карбоксильном конце. Аминокислотные замены могут быть консервативными (то есть, когда остаток заменяется другим остатком того же общего типа или группы) или неконсервативными (то есть, когда остаток заменяется аминокислотой другого типа). Кроме того, природная аминокислота может быть заменена не встречающейся в природе аминокислотой (то есть, неприродная консервативная аминокислотная замена или неприродная неконсервативная аминокислотная замена).

[0164] Полипептиды, полученные синтетическим путем, могут иметь замены аминокислот, которые в природе не кодируются ДНК (например, неприродная или не встречающаяся в природе аминокислота). Примеры неприродных аминокислот включают D-аминокислоты, N-защищенные аминокислоты, аминокислоту, имеющую ацетиламинометильную группу, присоединенную к атому серы цистеина, пегилированную аминокислоту, омега-аминокислоты формулы $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, где n равно 2-6, нейтральные неполярные аминокислоты, такие как саркозин, трет-бутилаланин, трет-бутилглицин, N-метилизолейцин и норлейцин. Фенилглицин может заменять Trp, Tyr или Phe; цитруллин и метионин сульфоксид являются нейтральными неполярными, цистеиновая кислота является кислотой, а орнитин является основной аминокислотой. Пролин может быть заменен гидроксипролином и сохранять свойства, придающие конформацию.

[0165] Аналоги могут быть получены путем заместительного мутагенеза и сохранять биологическую активность исходного полипептида. Примеры замен, определяемых как «консервативные замены», приведены в Таблице 1. Если такие замены приводят к нежелательным изменениям, тогда вводят замены других типов, обозначенные как «иллюстративные замены» в Таблице 1, или описанные далее в настоящем документе в отношении классов аминокислот, и продукты подвергают скринингу.

[0166] Таблица 1: Аминокислотные замены

Исходный остаток	Иллюстративная замена	Консервативная замена
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val

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

[0167] Существенные модификации функции или иммунологической характеристики осуществляют путем выбора замен, которые значительно отличаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного каркаса в области замены, например, конформации листа или спирали, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте и/или (с) объема боковой цепи.

Фармацевтические композиции

[0168] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение фармацевтической композиции радиоиммуноконъюгата, описанного в настоящем документе. Такие фармацевтические композиции могут быть сформулированы для использования в различных системах доставки лекарственных средств. Один или более физиологически приемлемых эксципиентов или носителей также могут быть включены в фармацевтическую композицию для получения надлежащего препарата. Неограничивающие примеры подходящих препаратов, совместимых с настоящим изобретением, включают препараты, описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences,

Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17-е издание, 1985. Для краткого обзора способов доставки лекарственных средств смотри, например, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[0169] Фармацевтические композиции могут быть сформулированы для любого из множества путей введения, описанных в настоящем документе (смотри, например, подраздел «Введение и дозировка» в настоящем документе). Замедленное высвобождение при введении предусмотрено за счет использования таких способов, как депо-инъекции или распадающиеся имплантаты или компоненты. Таким образом, в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, которые включают средства, раскрытые в настоящем документе (например, радиоиммуноконъюгаты), растворенные или суспендированные в приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе, например, воде, буферизованной воде, физиологическом растворе или PBS, в числе прочего. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для аппроксимации физиологических условий, такие как средства, регулирующие pH, и буферные средства, средства, регулирующие тоничность, смачивающие средства или детергенты, в числе прочих. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции сформулированы для перорального введения и могут, необязательно, содержать инертные ингредиенты, такие как связывающие вещества или наполнители, для приготовления стандартной лекарственной формы, такой как таблетка или капсула. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции сформулированы для местного введения и могут, необязательно, содержать инертные ингредиенты, такие как растворители или эмульгаторы, для приготовления крема, мази, геля, пасты или глазных капель.

[0170] В некоторых вариантах осуществления предложенные фармацевтические композиции стерилизуют обычными способами стерилизации, например, могут подвергаться стерилизации фильтрованием. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования как есть, или лиофилизированы. Лيوфилизированные препараты могут быть, например, объединены со стерильным водным носителем перед введением. Значение pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8, и наиболее предпочтительно от 6 до 7, например от 6 до 6,5. Полученные в результате композиции в твердой форме могут быть упакованы, например, в виде множества одиночных стандартных доз, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого средства или средств, например, в запечатанной упаковке таблеток или капсул. Фармацевтические композиции в твердой форме также могут быть упакованы в контейнер для гибкого количества, например, в выдавливаемый тубик, предназначенный для крема или мази местного применения.

Функциональные эффекты

[0171] Во многих вариантах осуществления введение радиоиммуноконъюгатов в соответствии с предложенными способами приводит к инфильтрации популяции

лимфоцитов в опухоль (например, в сердцевину опухоли). В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов включает Т-клетки (например, CD8⁺ Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов включает цитотоксические лимфоциты, например, активированные CD8⁺ Т-клетки и/или клетки - естественные киллеры. В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов включает клетки, положительные по одному или более маркерам (маркерам клеточной поверхности и/или внутриклеточным маркерам) цитотоксических и/или активированных лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов включает клетки, положительные по маркерам, выбранным из группы, состоящей из CD3, CD8, CD16, CD25, CD27, CD44, CD45, CD46, CD53, CD56, CD57, CD69, CD137, гранзима В или их сочетания.

[0172] В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов включает популяцию CD8⁺ Т-клеток, которая включает CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор, специфический (например, распознающий) для опухоль-ассоциированного антигена. В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированный антиген отличается от опухоль-ассоциированного антигена, с которым способен связываться направляющий фрагмент в составе радиоиммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ Т-клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор, специфический для опухоль-ассоциированного антигена, который представляет собой неоантиген.

[0173] В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов включает клетки (например, CD8⁺ Т-клетки), способные предпочтительно уничтожать клетки, экспрессирующие опухоль-ассоциированный антиген.

[0174] В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов (например, популяция CD8⁺ Т-клеток) может быть обнаружена в опухоли (например, в области опухоли, такой как сердцевина опухоли) на уровне, превышающем эталонный уровень, например, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза или по меньшей мере в пять превышающем эталонный уровень.

[0175] В некоторых вариантах осуществления популяция лимфоцитов (например, популяция CD8⁺ Т-клеток) составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 7,5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 12,5% или по меньшей мере 15% клеток в опухоли или области опухоли (например, в сердцевине опухоли).

[0176] В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор, специфический (например, узнающий) для опухоль-ассоциированного антигена, составляют по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65% или по меньшей мере 70% популяции CD8⁺ Т-клеток, инфильтрированных в опухоль или область опухоли (например, сердцевину опухоли).

[0177] В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки (например, CD8⁺

клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор, специфический для опухоль-ассоциированного антигена, могут быть обнаружены у субъекта (например, могут быть обнаружены в ткани или ее образце от субъекта) через по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 35 дней или по меньшей мере 40 дней после стадии введения.

[0178] В конкретных вариантах осуществления введение радиоиммуноконъюгатов в соответствии с предложенными способами приводит к ингибированию клеточной пролиферации в опухоли, например, в сердцевине опухоли. Например, в некоторых вариантах осуществления клеточная пролиферация в опухолевых тканях от субъектов после введения уменьшается по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 12,5 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 17,5 раз или по меньшей мере в 20 раз относительно эталонного уровня. Клеточную пролиферацию можно оценивать с использованием различных способов, известных в данной области, включая оценку маркеров (например, Ki67) в, или на, клетках.

[0179] Количество и/или относительное содержание клеток, которые являются положительными по определенному маркеру (например, маркеру CD8 Т-клеток, маркеру клеточной пролиферации, маркеру апоптоза и так далее), в опухоли можно оценивать с использованием любого из различных известных методов. Например, в некоторых методах количество клеток, которые окрашиваются положительно на маркер на поперечном срезе опухоли, рассчитывают в виде процента от всех клеточных ядер (например, ядер, окрашивающихся положительно на маркер жизнеспособных клеток) в области в поперечном срезе опухоли. В некоторых вариантах осуществления подсчет проводят в нескольких областях в поперечном сечении (например, по меньшей мере в трех, по меньшей мере в четырех или по меньшей мере в пяти областях) и рассчитывают процентное содержание в виде среднего значения от количеств в различных областях.

[0180] В некоторых вариантах осуществления гипоксические области внутри опухолей (например, области, обычно находящиеся в центре опухолей) исключают при выполнении подсчета клеток. Эти гипоксические области имеют тенденцию к некрозу без какого-либо терапевтического средства. Например, при оценке гибели опухолевых клеток (например, в результате апоптоза и/или некроза), которая происходит в результате введения средства субъекту с опухолью, для выполнения подсчета клеток могут быть выбраны области, отличные от таких гипоксических областей.

[0181] В некоторых способах клетки количественно определяют путем получения или приготовления суспензий одиночных клеток из представляющей интерес ткани, окрашивания клеток на один или более маркеров и выполнения сортировки или количественного определения окрашенных клеток, например, с использованием метода проточной цитометрии.

[0182] В некоторых вариантах осуществления введение радиоиммуноконъюгатов в соответствии с предложенными способами приводит к замедлению или ингибированию прогрессирования опухоли. В некоторых вариантах осуществления стадия введения приводит к регрессии опухоли. В некоторых вариантах осуществления стадия введения приводит к полной регрессии опухоли.

[0183] В некоторых вариантах осуществления введение радиоиммуноконъюгатов в соответствии с предложенными способами приводит к ингибированию метастазирования опухолевых клеток. Такое ингибирование может включать, например, уменьшение количества метастазов, уменьшение агрессивности метастазов и/или задержку развития метастазов.

Опухоли

[0184] Пациент, который нуждается в лечении, может иметь одну или более опухолей. Одна или более опухолей могут включать первичную опухоль, вторичную опухоль, или как первичную опухоль, так и вторичную опухоль.

[0185] В некоторых вариантах осуществления опухоль не является высоко иммуногенной, например, опухоль является умеренно иммуногенной или иммунологически холодной. В некоторых вариантах осуществления опухоль не реагирует, или реагирует лишь частично, на терапию ингибитором контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления опухоль (в отсутствие лечения) характеризуется отсутствием, или низкой степенью, инфильтрации лимфоцитами (например, Т-клетками, такими как CD8⁺ Т-клетки), например, на уровнях менее 10%, менее 7,5%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, менее 1% или менее 0,5% от общего количества жизнеспособных клеток или клеточных ядер.

[0186] В некоторых вариантах осуществления опухоль имеет объем по меньшей мере 50 мм³, по меньшей мере 75 мм³, по меньшей мере 100 мм³, по меньшей мере 125 мм³, по меньшей мере 150 мм³, по меньшей мере 175 мм³ или по меньшей мере 200 мм³ в момент введения радиоиммуноконъюгата.

[0187] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, например, карциному, саркому, меланому или лимфому.

[0188] В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой карциному, например, аденокарциному, плоскоклеточную карциному или аденосквамозную карциному. Неограничивающие примеры карцином включают аденоидно-кистозную карциному, адренокортикальную карциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, карциному желчного пузыря, рак желудка, рак головы и шеи, рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого, или аденокарциному легкого), нейробластому, нейроэндокринный рак, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак яичка.

[0189] В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой саркому. Неограничивающие примеры сарком включают ангиосаркому или

гемангиоэндотелиому, астроцитому, хондросаркому, саркому Юинга, фибросаркому, глиому, лейомиосаркому, липосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому (ЗФГ), мезенхимную или смешанную мезодермальную опухоль, мезотелиальную саркому или мезотелиому, миксомасаркому, остеосаркому, рабдомиосаркому и синовиальную саркому.

[0190] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой нейробластому.

[0191] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль головного мозга. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой глиому.

[0192] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой меланому.

[0193] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой несolidную опухоль, например, жидкую опухоль или гематологическую опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой миелому, например, множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой лейкоз, например, острый миелоидный лейкоз.

[0194] В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль смешанного типа, например, смешанную мезодермальную опухоль, карциносаркому или тератокарциному.

Субъекты

[0195] В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, например, человеком.

[0196] В некоторых вариантах осуществления субъект болен раком или подвержен риску развития рака. Например, у субъекта может быть диагностирован рак. Например, рак может быть первичным раком или вторичным (например, метастатическим) раком. Субъекты могут иметь любую стадию рака, например, стадию I, стадию II, стадию III или стадию IV с вовлечением или без вовлечения лимфатических узлов, а также с метастазами или без них. Предоставление радиоиммуноконъюгатов и композиций может предотвращать или уменьшать дальнейший рост рака и/или иным образом замедлять течение рака (например, предотвращать или уменьшать метастазирование). В некоторых вариантах осуществления у субъекта нет рака, но установлено, что он подвержен риску развития рака, например, вследствие наличия одного или более факторов риска, таких как воздействие окружающей среды, наличие одной или более генетических мутаций или вариантов, семейный анамнез и так далее. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не диагностирован рак.

[0197] В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в лечении рефрактерного рака.

Введение и дозировка

[0198] Радиоиммуноконъюгаты, описанные в настоящем документе, и их

фармацевтические композиции можно вводить любым из множества путей введения, включая системные и местные пути введения.

[0199] Системные пути введения включают парентеральные пути и энтеральные пути. В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты или их фармацевтические композиции вводят парентеральным путем, например, внутривенно, внутриаартериально, внутривентриально, подкожно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты или их фармацевтические композиции вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты или их фармацевтические композиции вводят энтеральным путем введения, например, через желудочно-кишечный тракт или перорально.

[0200] Местные пути введения включают, но не ограничиваются ими, периопухолевые инъекции и внутриопухолевые инъекции.

[0201] Фармацевтические композиции можно вводить для планирования лучевой терапии, диагностики и/или терапевтического лечения. При введении для планирования лучевой терапии или в диагностических целях радиоиммуноконъюгатов можно вводить субъекту в диагностически эффективной дозе и/или в количестве, эффективном для определения терапевтически эффективной дозы. В терапевтических целях фармацевтические композиции можно вводить субъекту (например, человеку), уже страдающему от состояния (например, рака), в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного купирования симптомов заболевания и его осложнений. Количество, достаточное для достижения этой цели, определяют как «терапевтически эффективное количество», количество соединения, достаточное для существенного уменьшения по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или состоянием здоровья. Например, при лечении рака терапевтически эффективным будет средство или соединение, которое уменьшает, предотвращает, задерживает, подавляет или останавливает любой симптом заболевания или состояния. Терапевтически эффективное количество средства или соединения не обязательно должно излечивать заболевание или состояние, но может, например, обеспечивать лечение заболевания или состояния таким образом, что начало заболевания или состояния отсрочивается, затрудняется или предотвращается, например, что симптомы заболевания или состояния облегчаются, или что продолжительность заболевания или состояния изменяется. Например, заболевание или состояние может становиться менее тяжелым и/или выздоровление индивидуума может ускоряться. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят первую дозу радиоиммуноконъюгата или композиции в количестве, эффективном для планирования лучевой терапии, затем вводят вторую дозу или набор доз радиоиммуноконъюгата или композиции в терапевтически эффективном количестве.

[0202] Эффективные количества могут зависеть от тяжести заболевания или состояния и других характеристик субъекта (например, массы тела). Терапевтически эффективные количества раскрытых радиоиммуноконъюгатов и композиций для субъектов (например, млекопитающих, таких как люди) могут быть определены

специалистом в данной области с учетом индивидуальных различий (например, различий в возрасте, массе тела и состоянии субъекта).

[0203] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты проявляют повышенную способность к направленности на раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество раскрытых радиоиммуноконъюгатов ниже (например, меньше или равно примерно 90%, 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1%) эквивалентной дозы для терапевтического эффекта не конъюгированного и/или не меченого радиоактивным изотопом направляющего фрагмента.

[0204] Однократное или многократное введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению, содержащих эффективное количество, можно осуществлять с использованием уровней доз и режимов, выбранных лечащим врачом. Дозу и режим введения можно определять и корректировать на основании тяжести заболевания или состояния субъекта, которое можно контролировать на протяжении всего курса лечения способами, обычно практикуемыми клиницистами, или способами, описанными в настоящем документе.

Терапевтические режимы

[0205] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат является единственным цитотоксическим средством, вводимым в виде части терапевтического режима. Например, в некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат не вводят в сочетании (одновременно, последовательно или в перекрывающихся режимах дозирования) с другим цитотоксическим средством. Таким образом, в этих вариантах осуществления единственным цитотоксическим средством, воздействию которого подвергается субъект в ходе терапевтического режима, включающего использование радиоиммуноконъюгата, является сам радиоиммуноконъюгат.

[0206] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат вводят в сочетании с другим средством, например, терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления другое терапевтическое средство представляет собой не цитотоксическое средство, например, ингибитор репарации повреждений ДНК (иРПД), ингибитор контрольных точек или любое их сочетание.

Ингибиторы контрольных точек

[0207] В некоторых вариантах осуществления в сочетании с радиоиммуноконъюгатом вводят ингибитор контрольных точек. Как правило, подходящие ингибиторы контрольных точек ингибируют иммуносупрессорный белок контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек ингибирует белок, выбранный из группы, состоящей из ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA-4), белка 1 программируемой гибели клеток (PD-1), лиганда 1 программируемой гибели клеток (PD-L1), LAG-3, белка 3, содержащего домены Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), и иммуноглобулин-подобных рецепторов клеток-киллеров (KIR).

[0208] Например, в некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек способен связываться с CTLA-4, PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек препятствует взаимодействию (например, препятствует связыванию) между PD-1 и PD-L1.

[0209] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой малую молекулу.

[0210] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, например, моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой человеческое или гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой мышинное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0211] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой анти-CTLA-4 антитело. Неограничивающие примеры анти-CTLA-4 антител включают BMS-986218, BMS-986249, ипилимумаб, тремелиумаб (ранее тицилимумаб, CP-675,206), MK-1308 и REGN-4659. Дополнительным примером анти-CTLA-4 антитела является 4F10-11, мышинное моноклональное антитело.

[0212] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой анти-PD-1 антитело. Неограничивающие примеры анти-PD-1 антител включают камрелизумаб, цемиплумаб, ниволумаб, пембролизумаб, синтилимаб, тислелизумаб и торипалимаб. Дополнительным примером анти-PD-1 антитела является RMP1-14, мышинное моноклональное антитело.

[0213] В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой анти-PD-L1 антитело. Неограничивающие примеры анти-PD-L1 антител включают атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб.

[0214] В некоторых вариантах осуществления используют сочетание из более чем одного ингибитора контрольных точек. Например, в некоторых вариантах осуществления используют как ингибитор CTLA-4, так и ингибитор PD-1 или PD-L1.

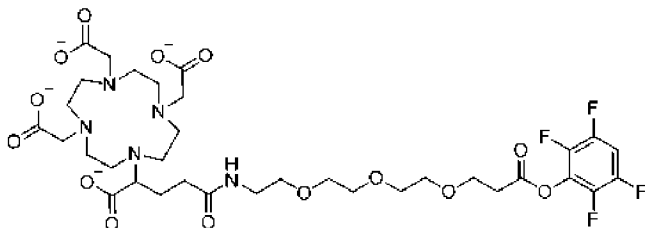
[0215] Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области может, основываясь на вышеприведенном описании, использовать настоящее изобретение в наиболее полной степени. Поэтому следующие далее конкретные примеры следует рассматривать лишь как иллюстративные и никоим образом не ограничивающие остальную часть изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Синтез $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792, IGF-1R-направленного радиоиммуноконъюгата

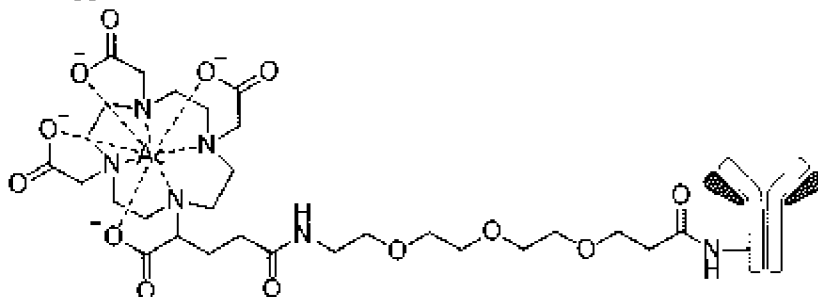
[0216] ТАВ-199 (человеческое моноклональное анти-IGF-1R антитело, которое также узнает мышинный IGF-1R с аффинностью в субнаномолярном диапазоне, коммерчески доступное от компании Creative Biolabs) конъюгировали с FPI-1397 (Fusion

Pharmaceuticals), бифункциональным хелатом, содержащим хелатообразующий фрагмент 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA) и линкер FastClear™ (Fusion Pharmaceuticals). Структура FPI-1397 представлена ниже:



FPI-1397

[0217] Полученный конъюгат очищали, переформулировали и радиоактивно метили [^{225}Ac]. Конечный конъюгат, называемый [^{225}Ac]-FPI-1792, имеет следующую структуру, с ТАВ-199 в качестве антитела с правой стороны. [^{225}Ac] находится в комплексе с фрагментом DOTA.



[^{225}Ac]-FPI-1792

Пример 2. Инфильтрация сердцевины опухоли в умеренно иммуногенных линейных клетках рака толстого кишечника CD8+ Т-клетками после введения [^{225}Ac]-FPI-1792

[0218] [^{225}Ac]-FPI-1792 представляет собой радиоиммуноконъюгат, содержащий ТАВ-199, конъюгированное с хелатообразующим фрагментом 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислотой (DOTA) через линкер Fast-Clear™, с ^{225}Ac в комплексе с фрагментом DOTA.

[0219] Эффекты от введения [^{225}Ac]-FPI-1792 на пролиферацию опухолевых клеток и рост опухоли оценивали в сингенной мышинной модели умеренно иммуногенной опухоли, модели мышинного рака толстого кишечника СТ-26. Клетки СТ-26 экспрессируют мышинный IGF-1R и являются чувствительными к анти-CTLA-4 антителам, но лишь частично чувствительными к анти-PD-1 антителам.

[0220] На ФИГ. 1А представлена схема данных экспериментов. Клетки СТ-26 имплантировали иммунокомпетентным мышам. Имплантированным клеткам СТ-26 давали возможность пролиферировать *in situ* в течение 4 дней или пока из них не образовывались опухоли объемом примерно 100-150 мм³. Затем животным вводили растворитель (контроль), ТАВ-199 («голое» антитело) или [^{225}Ac]-FPI-1792 (100 нКи или 200 нКи).

[0221] Объем опухоли СТ-26 контролировали после начала лечения.

Относительный объем опухолей СТ-26 у животных, которым вводили контрольный растворитель или «голоое» антитело, увеличивался в период от 0 до 20 дня после введения (ФИГ. 1В). Введение 100 нКи ТАТ приводило к относительно более медленному увеличению роста опухоли и небольшому относительному размеру опухоли в период от 7 до 20 дня в сравнении с введением контрольного растворителя или «голоого» антитела (ФИГ. 1В). Введение 100 нКи [225Ac]-FPI-1792 приводило к стабилизации относительного объема опухоли примерно на 18-й день после введения (ФИГ. 1В). Введение 200 нКи [225Ac]-FPI-1792 приводило к меньшему относительному размеру опухоли в период от 7 до 20 дня в сравнении с введением контрольного растворителя, «голоого» антитела или 100 нКи [225Ac]-FPI-1792 (ФИГ. 1В). Кроме того, введение 200 нКи [225Ac]-FPI-1792 приводило к относительному уменьшению объема опухоли в сравнении с исходным уровнем (ФИГ. 1В). В частности, примерно через 9 дней после введения опухоли СТ-26 у животных, получавших ТАТ в дозе 200 нКи, начинали уменьшаться в размере в сравнении с размером опухолей СТ-26 в начале лечения. Уменьшение объема опухоли СТ-26 у животных, получавших ТАТ в дозе 200 нКи, по-видимому, продолжалось примерно до 25 дня после введения, после чего объем опухоли оставался относительно неизменным (ФИГ. 1В).

[0222] Опухоли СТ-26 собирали у животных через 7 дней после введения для оценки пролиферации опухолевых клеток и инфильтрации CD8⁺ Т-клеток в сердцевину опухоли иммуногистохимическими методами. Вкратце, ткань, фиксированную формалином и залитую парафином (FFPE), готовили для иммуногистохимического анализа следующим образом: опухоли вырезали, фиксировали в формальдегиде, заливали парафином и делали срезы.

[0223] В поперечных срезах оценивали области из сердцевины опухоли (>250 мкм от краевой границы) и вдали от областей гипоксии/некроза.

[0224] Пролиферацию опухолевых клеток оценивали путем иммунного окрашивания на маркер клеточной пролиферации Ki67. Окрашивание на Ki67 опухолевой ткани от СТ-26-инъецированных животных, которым вводили 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, показало более низкие уровни окрашивания Ki67 в сравнении с опухолевой тканью у СТ-26-инъецированных животных, которым вводили растворитель (ФИГ. 1С), это указывало на то, что введение [²²⁵Ac]-FPI-1792 приводило к уменьшению пролиферации опухолевых клеток.

[0225] Инфильтрацию CD8⁺ Т-клеток в сердцевину опухоли СТ-26 оценивали путем иммунного окрашивания на CD8. Окрашивание на CD8 опухолевой ткани от СТ-26-инъецированных животных, которым вводили 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, показало относительно более высокие уровни окрашивания CD8 в сравнении с опухолевой тканью у СТ-26-инъецированных животных, которым вводили растворитель (ФИГ. 1D). Функциональность цитотоксических Т-клеток и клеток - естественных киллеров в опухолях СТ-26 оценивали путем иммунного окрашивания на гранзим В, сериновую протеазу, экспрессируемую в цитотоксических Т-клетках и клетках - естественных

киллерах. Окрашивание на гранзим В опухолевой ткани от СТ-26-инъецированных животных, которым вводили 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792, показало относительно более высокие уровни окрашивания гранзима В в сравнении с опухолевой тканью у СТ-26-инъецированных животных, которым вводили растворитель (ФИГ. 1Е). Эти результаты свидетельствуют о значительной инфильтрации сердцевины опухоли CD8⁺ Т-клетками, включая активированные CD8⁺ Т-клетки и/или клетки - естественные киллеры.

[0226] Эти результаты показывают, что введение $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792, излучающего альфа-частицы радиоиммуноконъюгата, способного узнавать IGF-1R, приводило к инфильтрации CD8⁺ Т-клеток и других гранзим В-экспрессирующих иммунных клеток в сердцевину опухолей на заметно более высоких уровнях в сравнении с уровнями, полученными при введении контрольного растворителя. Введение $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792 также приводило к уменьшению пролиферации IGF-1R-экспрессирующих опухолевых клеток, снижению относительного роста опухоли (в сравнении с введением контрольного растворителя или «холодного» антитела) и в целом обращению вспять роста опухоли.

Пример 3. Количественное определение CD8⁺ Т-клеток в сердцевине опухолей из умеренно иммуногенных линейных клеток рака толстого кишечника после введения $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792

[0227] Для дальнейшей оценки клеточной пролиферации и инфильтрации CD8⁺ Т-клеток в сердцевину опухоли проводили инокуляцию клеток опухоли СТ-26 и введение препаратов животным в каждой из пяти групп лечения (показано ниже), как описано в примере 2, за исключением того, что опухолям СТ-26 позволяли развиваться до более поздней стадии, чем в примере 2. Опухолям позволяли развиваться в течение примерно 6 дней (или до достижения опухолями размера примерно 175 мм³) до начала лечения.

- Растворитель
- ТАВ-199 («холодное» антитело)
- 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792
- 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792+анти-PD1
- 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792+анти-CTLA4
- 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792+анти-PD1+анти-CTLA4

[0228] На ФИГ. 2А представлена схема данных экспериментов. На ФИГ. 2В представлено расписание дозирования (в днях) для различных лекарственных средств (в случае их введения). В группах комбинированного лечения сначала вводили 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792, начиная введение любых дополнительных лекарственных средств на следующий день.

[0229] Как видно на ФИГ. 2С (показывающей относительный объем опухолей), во всех группах лечения, в которых вводили 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792 (включая группу, в которой 200 нКи $[^{225}\text{Ac}]$ -FPI-1792 вводили без сопутствующей терапии), наблюдали значительно замедленный рост опухолей в сравнении с ростом опухолей в группах введения растворителя и «холодного» антитела.

[0230] Опухоли собирали для иммуногистохимического анализа в день 12 после

начала лечения, и готовили ткань FFPE, как описано в примере 2. Срезы опухолей окрашивали на различные маркеры клеточной пролиферации (Ki67), Т-клеток (CD8), а также цитотоксических Т-клеток или клеток - естественных киллеров (гранзим В). Репрезентативные не некротические области из сердцевины опухолей (например, >250 мкм от краевой границы) показаны на ФИГ. 2D, 2E и 2F.

[0231] На ФИГ. 2D представлены репрезентативные результаты для срезов, окрашенных на Ki67. Значительно сниженные уровни Ki67 (и, следовательно, сниженную клеточную пролиферацию) наблюдали в срезах от животных во всех группах лечения, где использовали введение 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, в сравнении с группами введения контрольного растворителя и «холодного» антитела.

[0232] На ФИГ. 2E представлены репрезентативные результаты для срезов, окрашенных на CD8. Значительно более высокий уровень окрашивания CD8 наблюдали в срезах от животных во всех группах лечения, где использовали введение 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, в сравнении с группами введения контрольного растворителя и «холодного» антитела. На ФИГ. 2F представлены репрезентативные результаты для срезов, окрашенных на гранзим В. Значительно более высокий уровень окрашивания гранзима В наблюдали в срезах от животных во всех группах лечения, где использовали введение 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, в сравнении с группами введения контрольного растворителя и «холодного» антитела. Эти результаты указывают на значительную инфильтрацию сердцевины опухолей CD8+ Т-клетками, включая активированные CD8+ Т-клетки и/или клетки - естественные киллеры.

[0233] Для количественного определения результатов иммуногистохимического анализа подсчитывали количество клеток, которые представляли собой Ki67-, CD8- и гранзим В-положительные клетки, в пяти отдельных областях и усредняли для каждой группы лечения. Процент положительных клеток рассчитывали в виде процента от всех жизнеспособных клеток.

[0234] На ФИГ. 2G представлены результаты количественной оценки для определения % Ki67-положительных клеток. Во всех группах лечения, где использовали 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, было обнаружено значительное снижение уровня окрашивания Ki67 (и, следовательно, сниженную клеточную пролиферацию) в сравнении с контрольными группами использования растворителя и ТАВ-199 («холодного» антитела). Значимые различия между группами лечения, где использовали 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, отсутствовали.

[0235] На ФИГ. 2H представлены результаты количественной оценки для определения % CD8-положительных клеток. Во всех группах лечения, где использовали 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, было обнаружено значительное увеличение процентного содержания CD8+ клеток в сравнении с контрольными группами использования растворителя и ТАВ-199 («холодного» антитела). Значимые различия между группами лечения, где использовали 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, отсутствовали.

[0236] На ФИГ. 2I представлены результаты количественной оценки для

определения % гранзим В-положительных клеток. Во всех группах лечения, где использовали 200 нКи [^{225}Ac]-FPI-1792, было обнаружено значительное увеличение процентного содержания гранзим В+ клеток в сравнении с контрольными группами использования растворителя и ТАВ-199 («холодного» антитела). Значимые различия между группами лечения, где использовали 200 нКи [^{225}Ac]-FPI-1792, отсутствовали.

[0237] Эти результаты показывают, что введение [^{225}Ac]-FPI-1792 в более поздний момент времени (когда опухоли имеют больший размер) в сравнении с моментом введения в экспериментах, описанных в примере 2, также приводит к инфильтрации CD8⁺ Т-клеток и других гранзим В-экспрессирующих иммунных клеток в сердцевину опухоли, уменьшению пролиферации опухолевых клеток, снижению относительного роста опухоли (в сравнении с введением контрольного растворителя или «холодного» антитела) и в целом обращению вспять роста опухоли.

[0238] Кроме того, количественный анализ клеток показал, что различия в инфильтрации (на основании оценки присутствия CD8⁺ и гранзим В⁺ клеток в сердцевине опухоли) и клеточной пролиферации были статистически значимыми между контрольными группами (растворитель и «холодное» антитело) и группами введения ([^{225}Ac]-FPI-1792 отдельно или в сочетании с одним или более ингибиторами контрольных точек) через 12 дней после введения. Более того, в оцениваемый момент времени никакое введение отдельно [^{225}Ac]-FPI-1792 не приводило к результатам по инфильтрации CD8⁺ Т-клеток и клеточной пролиферации, сопоставимым с результатами введения [^{225}Ac]-FPI-1792 в сочетании с одним или более ингибиторами контрольных точек.

Пример 4. Пролонгированные эффекты введения [^{225}Ac]-FPI-1792, продемонстрированные в эксперименте с повторной имплантацией опухолевых клеток в модели колоректального рака

[0239] Персистенцию опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов оценивали путем оценки роста опухолей и присутствия CD8⁺ Т-клеток в сердцевине вторичных опухолей у мышей, которым инокулировали клетки СТ-26 рака толстого кишечника, вводили [^{225}Ac]-FPI-1792, а затем повторно инокулировали опухолевые клетки той же самой линии (СТ-26).

[0240] На ФИГ. 3А представлена схема данного эксперимента с повторной инокуляцией опухолевых клеток.

[0241] Инокуляцию клеток опухоли СТ-26 и введение [^{225}Ac]-FPI-1792 выполняли, как описано в примере 2. Мышам в дополнительных группах вводили: 1) [^{225}Ac]-FPI-1792+анти-PD1; 2) [^{225}Ac]-FPI-1792+анти-CTLA4; или 3)) [^{225}Ac]-FPI-1792+анти-PD1+анти-CTLA4. Через тридцать дней после введения препаратов животным повторно проводили имплантацию аллотрансплантата клеток СТ-26 в контралатеральный бок. После повторной имплантации лечение не проводили. Нелеченых мышей использовали в качестве контроля.

[0242] Через одиннадцать дней после повторной инокуляции получали ткань из вторичных опухолей. Ткань FFPE готовили, как описано в примере 2. Области из

сердцевины опухолей оценивали на способность реагировать с анти-CD8 антителом. Относительно контролей была обнаружена более высокая частота встречаемости CD8+ Т-клеток в ткани вторичных опухолей от животных, которые исходно получали отдельно 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792 и которым впоследствии были повторно инокулированы клетки СТ-26 (ФИГ. 3В). Эти результаты свидетельствуют о том, что однократное введение [²²⁵Ac]-FPI-1792 индуцирует популяцию CD8+ Т-клеток, способных инфильтрировать сердцевину вторичных опухолей. Более того, эта популяция CD8+ Т-клеток сохраняется на более высоких уровнях в сравнении с контролем.

[0243] Рост опухоли после повторной инокуляции оценивали во всех группах лечения и контроле. Как показано на ФИГ. 3С, во всех группах лечения имело место значительное снижение роста опухоли относительно контролей. У тринадцати из 15 животных в различных группах лечения (получавших [²²⁵Ac]-FPI-1792 отдельно или в сочетании с одним или более ингибиторами контрольных точек) отсутствовал рост вторичной опухоли.

[0244] Эти результаты демонстрируют «эффект вакцины», опосредуемый однократным введением [²²⁵Ac]-FPI-1792 отдельно или в сочетании с ингибиторами контрольных точек. Таким образом, введение отдельно [²²⁵Ac]-FPI-1792 оказывает пролонгированный и полезный эффект за счет CD8+ Т-клеток, которые сохраняются и в итоге инфильтрируют сердцевину вторичной опухоли.

[0245] Эти результаты свидетельствуют о том, что введение [²²⁵Ac]-FPI-1792 может способствовать облегчению заболевания или предотвращению рецидивов опухоли или вторичных метастазов.

Пример 5. [²²⁵Ac]-FPI-1792-опосредованный рекрутинг специфических для опухолевого антигена CD8+ Т-клеток из селезенки в опухоли

[0246] Рекрутинг Т-клеток из селезенки во вторичные опухоли оценивали у мышей, которым повторно инокулировали клетки опухоли СТ-26 в эксперименте, описанном в примере 4.

[0247] Как упомянуто в примере 4, мышей не лечили после повторной инокуляции опухоли. В день 14 после повторной инокуляции извлекали вторичные опухоли и селезенки у мышей в следующих группах лечения:

- без лечения (растворитель)
- [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD1
- [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA4
- [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-PD1+анти-CTLA4.

[0248] Ткани расщепляли коллагеназой и ДНК-азой, получая суспензию отдельных клеток. Гемопозитические CD45+ клетки выделяли из суспензии одиночных клеток методом магнитной селекции, затем клетки окрашивали и анализировали на экспрессию CD8.

[0249] На ФИГ. 4В показана частота встречаемости Т-клеток (по оценке на основании экспрессии CD8 в очищенных CD45+ клетках) в клетках селезенки (левая

панель) и опухоли (правая панель) в анализируемых группах лечения. Относительно соответствующих образцов от контрольных животных, получавших растворитель, образцы селезенки в группах животных, получавших комбинированную терапию с [²²⁵Ac]-FPI-1792, имели сниженные уровни CD8+ Т-клеток, тогда как образцы опухоли в группах животных, получавших комбинированную терапию с [²²⁵Ac]-FPI-1792, имели повышенные уровни CD8+ Т-клеток. Эти результаты указывают на интенсивный рекрутинг CD8+ Т-клеток во вторичные опухоли после повторной инокуляции опухоли.

[0250] Для оценки относительного содержания CD8+ Т-клеток, специфических для опухолевых клеток, проводили анализ на основе тетрамера МНС I с использованием АН1 (SPSYVYHGF (SEQ ID NO: 1)), иммунодоминантного эпитопа CD8+ Т-клеток из СТ26. На ФИГ. 4С представлена схема, иллюстрирующая этот тетрамерный метод. Тетрамерный реагент собран из четырех идентичных биотинилированных единиц МНС класса I/β2М, нагруженных пептидным антигеном АН1 и удерживаемых вместе флуоресцентно-меченым стрептавидином, что позволяет обнаруживать антиген-специфические Т-клетки методом проточной цитометрии. Таким образом, тетрамер-положительные Т-клетки представляют собой Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор, специфический для эпитопа СТ26.

[0251] На ФИГ. 4D представлены результаты тетрамерного анализа для клеток из селезенки (левая панель) и опухоли (правая панель) животных в анализируемых группах лечения. Уровни тетрамер-положительных клеток представлены в виде процентной доли от CD8+ Т-клеток. В селезенке повышенные уровни специфических для эпитопа СТ26 Т-клеток были обнаружены у получавших лечение мышей (примерно 11-17%) в сравнении с не получавшими лечение контрольными животными (2-3%). В опухоли очень высокая частота встречаемости специфических для эпитопа СТ26 Т-клеток была обнаружена в опухолях получавших лечение мышей (примерно 30-70%) в сравнении с не получавшими лечение контрольными животными (1-2%).

[0252] Эти результаты указывают на масштабное накопление опухоль-специфических CD8+ Т-клеток во вторичных опухолях. Более того, эти результаты показывают, что введение [²²⁵Ac]-FPI-1792 приводит к продуцированию и инфильтрации CD8+ Т-клеток с Т-клеточными рецепторами, специфическими для опухоль-ассоциированного антигена, экспрессируемого опухолевыми клетками.

Пример 6. Супрессия опухоли из линии клеток иммунологически холодного метастатического рака молочной железы

[0253] [²²⁵Ac]-FPI-1792 оценивали для иммунологически холодной опухоли с использованием сингенной мышинной модели трижды негативного рака молочной железы 4Т1. Клетки 4Т1 экспрессируют мышинный IGF-1R и формируют опухоли, отличающиеся быстрым прогрессированием. Клетки 4Т1 обладают высоким метастатическим потенциалом, являются слабо иммуногенными и устойчивыми к ингибированию иммунных контрольных точек (например, блокаде PD1 или CTLA4).

[0254] На ФИГ. 5А представлена схема данных экспериментов. Клетки 4Т1

имплантировали иммунокомпетентным мышам линии Balb/c. Имплантированным клеткам 4T1 позволяли пролиферировать *in situ* в течение 4 дней или до образования из них опухолей объемом примерно 50 мм³. Затем животным вводили растворитель (контроль), отдельно 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792, 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792+5 мг/кг 4F10-11 (анти-CTLA4) или 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792+5 мг/кг RMP1-14 (анти-PD1).

[0255] Объем опухоли 4T1 оценивали после начала лечения. На ФИГ. 5B и 5C показаны относительные объемы опухолей при введении 200 нКи [²²⁵Ac]-FPI-1792 в сравнении с введением его сочетания с анти-CTLA4 (ФИГ. 5B) или в сравнении с введением его сочетания с анти-PD1 (ФИГ. 5C). При том, что введение только анти-CTLA4 не оказывало заметного влияния на рост опухоли, значительное подавление опухоли наблюдалось в группе введения [²²⁵Ac]-FPI-1792+анти-CTLA4 (ФИГ. 5B).

[0256] Эти результаты свидетельствуют о том, что [²²⁵Ac]-FPI-1792 может придавать иммунологически холодной опухоли восприимчивость к ингибированию иммунных контрольных точек.

Пример 7. Клиническое испытание фазы I для оценки эффективности и безопасности введения радиоиммуноконъюгатов

[0257] Клиническое испытание фазы I было проведено для оценки безопасности и переносимости радиоиммуноконъюгатов при введении пациентам-людям. [²²⁵Ac]-FPI-1434 представляет собой радиоиммуноконъюгат, включающий гуманизированное моноклональное антитело, которое связывает IGF-1R (AVE1642), связанное через линкер FastClear™ с фрагментом DOTA; таким образом, [²²⁵Ac]-FPI-1434 имеет сходство с [²²⁵Ac]-FPI-1792 по линкеру и хелатообразующему фрагменту, но отличается используемым анти-IGF-1R антителом.

[0258] [¹¹¹In]-FPI-1547 представляет собой аналог [²²⁵Ac]-FPI-1434 с индием-111, который содержит такой же линкер и антитело, что и [²²⁵Ac]-FPI-1434. [¹¹¹In]-FPI-1547 используют для отбора пациентов и количественного определения IGF-1R-экспрессирующих мишеней перед лечением с использованием [²²⁵Ac]-FPI-1434.

[0259] 185 МБк [¹¹¹In]-FPI-1547 внутривенно вводили пациентам, после чего оценивали поглощенную дозу радиации. Серийные передние/задние скинтиграфические изображения пациентов получали в течение 6-8 дней. Количественные данные извлекали из сканов всего тела, а объемы на основании КТ использовали для оценки поглощенной дозы радиации в нормальных органах и тканях в соответствии со схемой MIRD. Затем проводили оценку доз радиации для запланированных терапевтических введений [²²⁵Ac]-FPI-1434 каждому пациенту с использованием программного обеспечения OLINDA/EXM (версия 2.0) и проверяли на соответствие указанным в протоколе пределам доз радиации для почек (18 Гр), печени (31 Гр) и легких (16,5 Гр). Запланированные терапевтические введения [²²⁵Ac]-FPI-1434 выполняли в соответствии с модифицированной схемой повышения дозы 3+3, состоящей из 5 начальных групп по 10, 20, 40, 80 и 120 кБк/кг массы тела до максимально переносимой дозы.

[0260] Каждому из 8 пациентам вводили 185 МБк [¹¹¹In]-FPI-1547 и проводили

последующую дозиметрическую оценку. У всех 8 пациентов наблюдалась avidность опухоли, и все имели возможность получить вплоть до 120 кБк/кг на основании результатов дозиметрии. Расчетные средние дозы радиации (\pm SD) на единицу введенной активности для следующих органов составляли: почки - 966 ± 179 мГр-экв/МБк; печень, 803 ± 260 мГр-экв/МБк; легкие - 672 ± 185 мГр-экв/МБк. Средняя общая доза радиации для тела (\pm SD) у всех пациентов составляла 146 ± 19 мГр-экв/МБк (диапазон 117-170 мГр-экв/МБк). Семь (88%) пациентов получили одно терапевтическое введение в диапазоне от 0,80 до 2,3 МБк [225Ac]-FPI-1434. [225Ac]-FPI-1434 в целом хорошо переносился, неожиданные клинически значимые нежелательные явления отсутствовали.

[0261] Эти результаты показали, что введение индивидуальной дозы радиоиммуноконъюгата актиния-225 пациентам-людям также хорошо переносилось и не приводило к неожиданным клинически значимым нежелательным явлениям. Кроме того, введение радиоиммуноконъюгата индия-111 хорошо переносилось пациентами-людьми и приводило к приемлемым уровням радиации в организме пациента в целом и в критических органах, таких как почки, печень и легкие.

[0262] Таким образом, радиоиммуноконъюгаты индия-111 и актиния-225 были безопасно введены пациентам без возникновения неожиданных клинически значимых нежелательных явлений. Эти результаты дополнительно показали, что введение радиоиммуноконъюгата индия-111 было успешно использовано для оценки потенциального риска для пациентов и разработки индивидуальных планов лечения для введения радиоиммуноконъюгатов актиния-225.

ЭКВИВАЛЕНТЫ/ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0263] Специалисты в данной области знают или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем следующей далее формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции инфильтрации CD8⁺ Т-клеток в опухоль у субъекта, который нуждается в этом, включающий стадию введения субъекту радиоиммуноконъюгата или его фармацевтической композиции, где радиоиммуноконъюгат имеет следующую структуру:

A-L-B

Формула I-a,

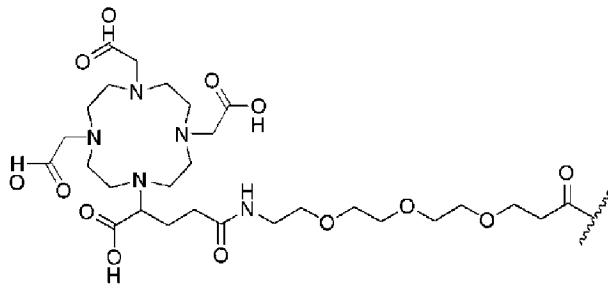
где

A представляет собой комплекс металла хелатообразующего фрагмента, где комплекс металла содержит актиний-225 (²²⁵Ac) или его дочерние продукты,

L представляет собой линкер, и

B представляет собой направляющий фрагмент, способный к связыванию первого опухоль-ассоциированного антигена, экспрессируемого по меньшей мере некоторыми клетками в опухоли;

при условии, что, если A-L- представляет собой комплекс металла соединения 1, представленного ниже, то B не является AVE1642,



(Соединение 1);

где указанное введение указанного радиоиммуноконъюгата приводит к инфильтрации популяции CD8⁺ Т-клеток в сердцевину опухоли;

где указанная популяция CD8⁺ Т-клеток содержит CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор (TCR), специфический для второго опухоль-ассоциированного антигена, экспрессируемого по меньшей мере некоторыми клетками в опухоли; и

где CD8⁺ Т-клетка способна к предпочтительному уничтожению клетки, экспрессирующей второй опухоль-ассоциированный антиген.

2. Способ по п. 1, где указанную популяцию CD8⁺ Т-клеток можно обнаруживать в сердцевине опухоли на уровне, превышающем эталонный уровень.

3. Способ по п. 2, где указанную популяцию CD8⁺ Т-клеток можно обнаруживать на уровне, по меньшей мере в два раза превышающем эталонный уровень.

4. Способ по п. 3, где указанную популяцию CD8⁺ Т-клеток можно обнаруживать на уровне, по меньшей мере в три раза превышающем эталонный уровень.

5. Способ по п. 4, где указанную популяцию CD8⁺ Т-клеток можно обнаруживать на уровне, по меньшей мере в четыре раза превышающем эталонный уровень.

6. Способ по п. 5, где указанную популяцию CD8+ Т-клеток можно обнаруживать на уровне, по меньшей мере в пять раз превышающем эталонный уровень.

7. Способ по п. 1, где указанная популяция CD8+ Т-клеток составляет по меньшей мере 5% клеток в сердцевине опухоли.

8. Способ по п. 7, где указанная популяция CD8+ Т-клеток составляет по меньшей мере 7,5% клеток в сердцевине опухоли.

9. Способ по п. 8, где указанная популяция CD8+ Т-клеток составляет по меньшей мере 10% клеток в сердцевине опухоли.

10. Способ по п. 9, где указанная популяция CD8+ Т-клеток составляет по меньшей мере 12,5% клеток в сердцевине опухоли.

11. Способ по п. 10, где указанная популяция CD8+ Т-клеток составляет по меньшей мере 15% клеток в сердцевине опухоли.

12. Способ по п. 1, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 15% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

13. Способ по п. 12, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 20% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

14. Способ по п. 13, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 25% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

15. Способ по п. 14, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 30% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

16. Способ по п. 15, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 35% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

17. Способ по п. 16, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 40% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

18. Способ по п. 17, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 45% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

19. Способ по п. 18, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 50% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

20. Способ по п. 19, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 55% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

21. Способ по п. 20, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 60% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

22. Способ по п. 21, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 65% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

23. Способ по п. 22, где указанные CD8+ Т-клетки составляют по меньшей мере 70% указанной популяции CD8+ Т-клеток.

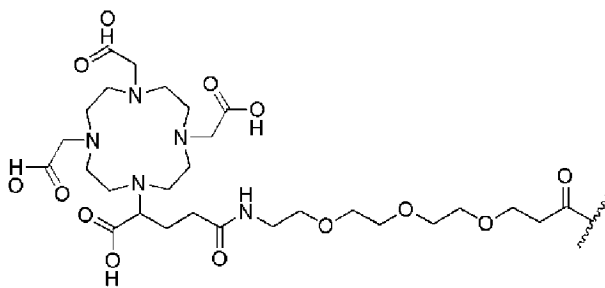
24. Способ по любому из пунктов 1-23, где указанные CD8+ Т-клетки можно обнаруживать у субъекта по меньшей мере через 10 дней после стадии введения.

25. Способ по п. 24, где указанные CD8+ Т-клетки можно обнаруживать у субъекта по меньшей мере через 15 дней после стадии введения.

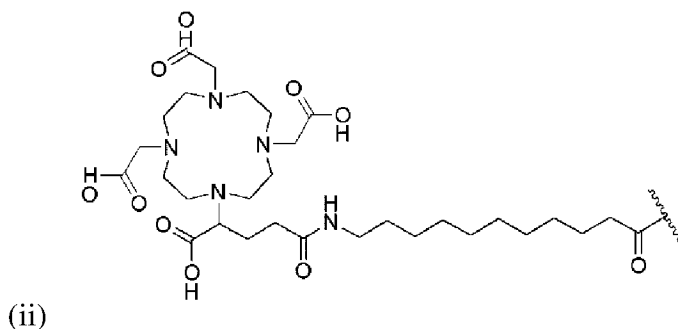
26. Способ по п. 25, где указанные CD8+ Т-клетки можно обнаруживать у субъекта по меньшей мере через 20 дней после стадии введения.
27. Способ по п. 26, где указанные CD8+ Т-клетки можно обнаруживать у субъекта по меньшей мере через 25 дней после стадии введения.
28. Способ по п. 27, где указанные CD8+ Т-клетки можно обнаруживать у субъекта по меньшей мере через 30 дней после стадии введения.
29. Способ по п. 28, где указанные CD8+ Т-клетки можно обнаруживать у субъекта по меньшей мере через 40 дней после стадии введения.
30. Способ по любому из пунктов 1-29, где первый опухоль-ассоциированный антиген отличается от второго опухоль-ассоциированного антигена.
31. Способ по п. 30, где второй опухоль-ассоциированный антиген представляет собой неоантиген.
32. Способ по любому из пунктов 1-31, где опухоль представляет собой первичную опухоль.
33. Способ по любому из пунктов 1-31, где опухоль представляет собой вторичную опухоль.
34. Способ по любому из пунктов 1-33, где опухоль не является высоко иммуногенной.
35. Способ по п. 34, где опухоль является иммунологически холодной.
36. Способ по любому из пунктов 1-35, где опухоль имеет объем по меньшей мере 100 мм^3 в момент введения.
37. Способ по п. 36, где опухоль имеет объем по меньшей мере 150 мм^3 в момент введения.
38. Способ по п. 37, где опухоль имеет объем по меньшей мере или примерно 175 мм^3 в момент введения.
39. Способ по любому из пунктов 1-38, где опухоль представляет собой солидную опухоль.
40. Способ по п. 39, где солидная опухоль представляет собой саркому.
41. Способ по п. 40, где саркома выбрана из группы, состоящей из ангиосаркомы или гемангиоэндотелиомы, астроцитомы, хондросаркомы, саркомы Юинга, фибросаркомы, глиомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы (ЗФГ), мезенхимной или смешанной мезодермальной опухоли, мезотелиальной саркомы или мезотелиомы, миксомосаркомы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы и синовиальной саркомы.
42. Способ по п. 41, где саркома представляет собой остеосаркому.
43. Способ по п. 39, где солидная опухоль представляет собой карциному.
44. Способ по п. 43, где карцинома выбрана из группы, состоящей из аденоиднокистозной карциномы, адренокортикальной карциномы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака эндометрия, карциномы желчного пузыря, рака желудка, рака головы и шеи, рака легкого (например,

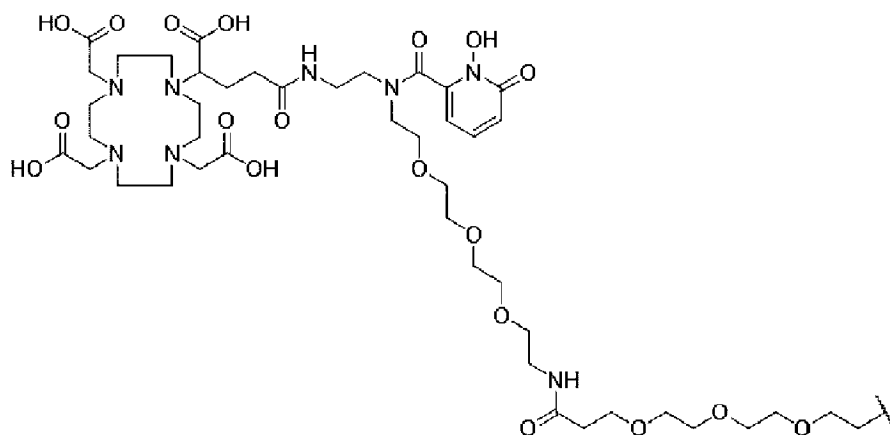
мелкоклеточного рака легкого или немелкоклеточного рака легкого, или аденокарциномы легкого), нейробластомы, нейроэндокринного рака, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака почки, рака яичка.

45. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой рак мочевого пузыря.
46. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой рак поджелудочной железы.
47. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой рак молочной железы.
48. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой рак головы и шеи.
49. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой рак печени.
50. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой рак легкого.
51. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой рак головного мозга.
52. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой нейробластому.
53. Способ по п. 44, где карцинома представляет собой меланому.
54. Способ по любому из пунктов 1-38, где опухоль представляет собой жидкую опухоль.
55. Способ по любому из пунктов 1-54, где указанный стадия введения приводит к ингибированию клеточной пролиферации в сердцевине опухоли.
56. Способ по любому из пунктов 1-55, где указанный стадия введения приводит к замедлению или ингибированию прогрессирования опухоли.
57. Способ по п. 56, где указанный стадия введения приводит к регрессии опухоли.
58. Способ по п. 57, где указанный стадия введения приводит к полной регрессии опухоли.
59. Способ по любому из пунктов 1-58, где указанный стадия введения приводит к предотвращению или ингибированию метастазирования опухолевых клеток.
60. Способ по любому из пунктов 1-59, где A-L- представляет собой комплекс металла соединения, выбранного из группы, состоящей из

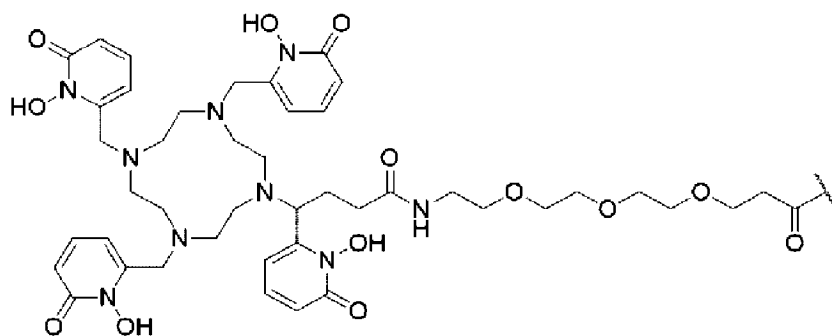


(Соединение 1),



(Соединение 2),

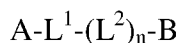
(iii)

(Соединение 3), и

(iv)

(Соединение 4).

61. Способ по любому из пунктов 1-60, где L имеет структуру $-L^1-(L^2)_n-$, показанную в формуле I-b:

**Формула I-b,**

где

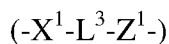
A представляет собой комплекс металла хелатообразующего фрагмента, где комплекс металла содержит актиний-225 (^{225}Ac) или его дочерние продукты;

B представляет собой направляющий фрагмент;

L^1 представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, или необязательно замещенный арил или гетероарил;

n равно 1-5; и

каждый L^2 , независимо, имеет структуру:

**Формула III,**

где

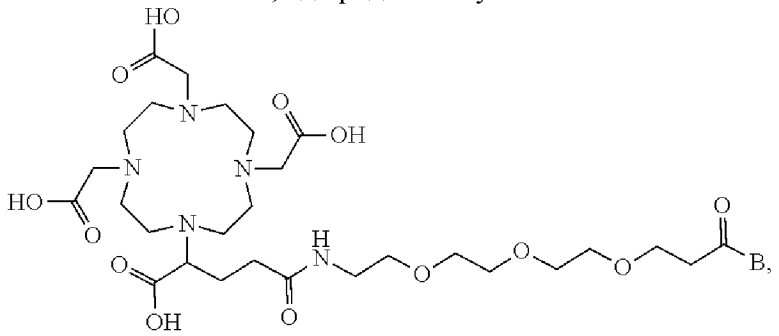
X^1 представляет собой $C=O(NR^1)$, $C=S(NR^1)$, $OC=O(NR^1)$, $NR^1C=O(O)$, $NR^1C=O(NR^1)$, $-CH_2PhC=O(NR^1)$, $-CH_2Ph(NH)C=S(NR^1)$, O или NR^1 ; и каждый R^1

независимо представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, или необязательно замещенный арил или гетероарил, в котором C₁-C₆ алкил может быть замещен оксо (=O), гетероарилом или их сочетанием;

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

Z¹ представляет собой CH₂, C=O, C=S, OC=O, NR¹C=O или NR¹, где R¹ представляет собой водород или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил или пирролидин-2,5-дион.

62. Способ по п. 61, где радиоиммуноконъюгат имеет следующую структуру:



где B представляет собой направляющий фрагмент.

63. Способ по любому из пунктов 1-62, где направляющий фрагмент представляет собой полипептид.

64. Способ по любому из пунктов 1-63, где направляющий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

65. Способ по любому из пунктов 1-64, где направляющий фрагмент имеет молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 100 кДа.

66. Способ по п. 65, где направляющий фрагмент имеет молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 125 кДа.

67. Способ по п. 66, где направляющий фрагмент имеет молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 150 кДа.

68. Способ по любому из пунктов 1-62, где направляющий фрагмент представляет собой малую молекулу.

69. Способ по любому из пунктов 1-68, где первый опухоль-ассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), опухолевого эпителиального маркера 1 (TEM-1) и рецептора 3 фактора роста фибробластов (FGFR3).

70. Способ по любому из пунктов 1-69, где субъект является млекопитающим.

71. Способ по п. 70, где субъект является человеком.

72. Способ по любому из пунктов 1-71, где субъект нуждается в лечении или предотвращении рака.

73. Способ по п. 72, где у субъекта диагностирован рак.

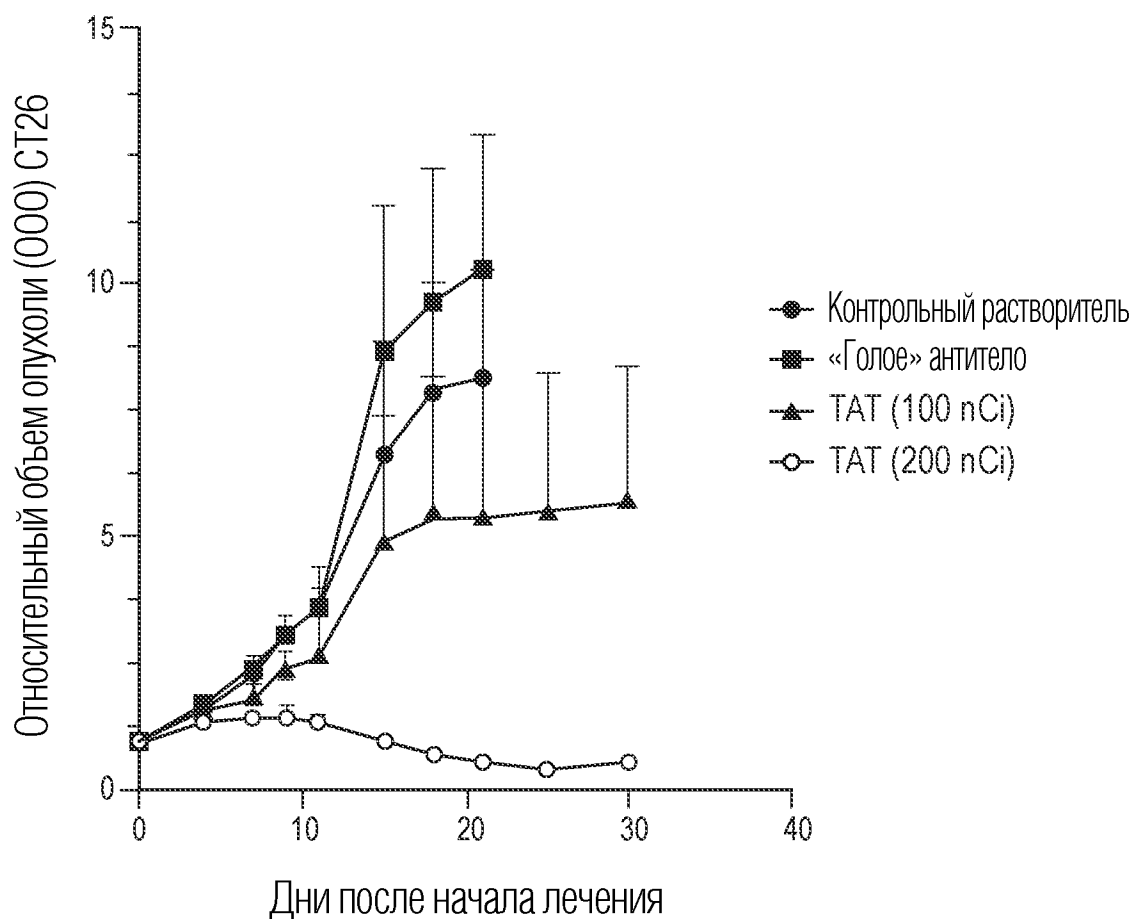
74. Способ по любому из пунктов 1-73, где субъект нуждается в лечении рефрактерного рака.

75. Способ по любому из пунктов 1-74, где стадия введения включает системное введение радиоиммуноконъюгата.
76. Способ по п. 75, где системное введение включает парентеральное введение.
77. Способ по п. 76, где парентеральное введение представляет собой внутривенное введение.
78. Способ по п. 76, где парентеральное введение представляет собой внутриартериальное введение.
79. Способ по п. 76, где парентеральное введение представляет собой внутрибрюшинное введение.
80. Способ по п. 76, где парентеральное введение представляет собой подкожное введение.
81. Способ по п. 76, где парентеральное введение представляет собой внутрикожное введение.
82. Способ по п. 75, где системное введение включает энтеральное введение.
83. Способ по п. 82, где энтеральное введение представляет собой трансгастроэнтеральное введение.
84. Способ по п. 82, где энтеральное введение представляет собой пероральное введение.
85. Способ по любому из пунктов 1-84, где стадия введения включает местное введение радиоиммуноконъюгата.
86. Способ по п. 85, где местное введение представляет собой периопухолевую инъекцию.
87. Способ по п. 85, где местное введение представляет собой внутриопухолевую инъекцию.
88. Способ по любому из пунктов 1-87, где стадия введения включает создание контакта *ex vivo* радиоиммуноконъюгата с биологической жидкостью указанного субъекта, где указанная биологическая жидкость содержит по меньшей мере одну раковую клетку.
89. Способ по любому из пунктов 1-88, где радиоиммуноконъюгат не вводят в сочетании с другим цитотоксическим средством.
90. Способ по любому из пунктов 1-89, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного лекарственного средства после стадии введения радиоиммуноконъюгата.
91. Способ по п. 90, где дополнительное лекарственное средство представляет собой не цитотоксическое средство.
92. Способ по п. 90 или 91, где радиоиммуноконъюгат вводят в более низкой эффективной дозе.
93. Способ по п. 90, 91 или 92, где дополнительное лекарственное средство вводят в более низкой эффективной дозе.

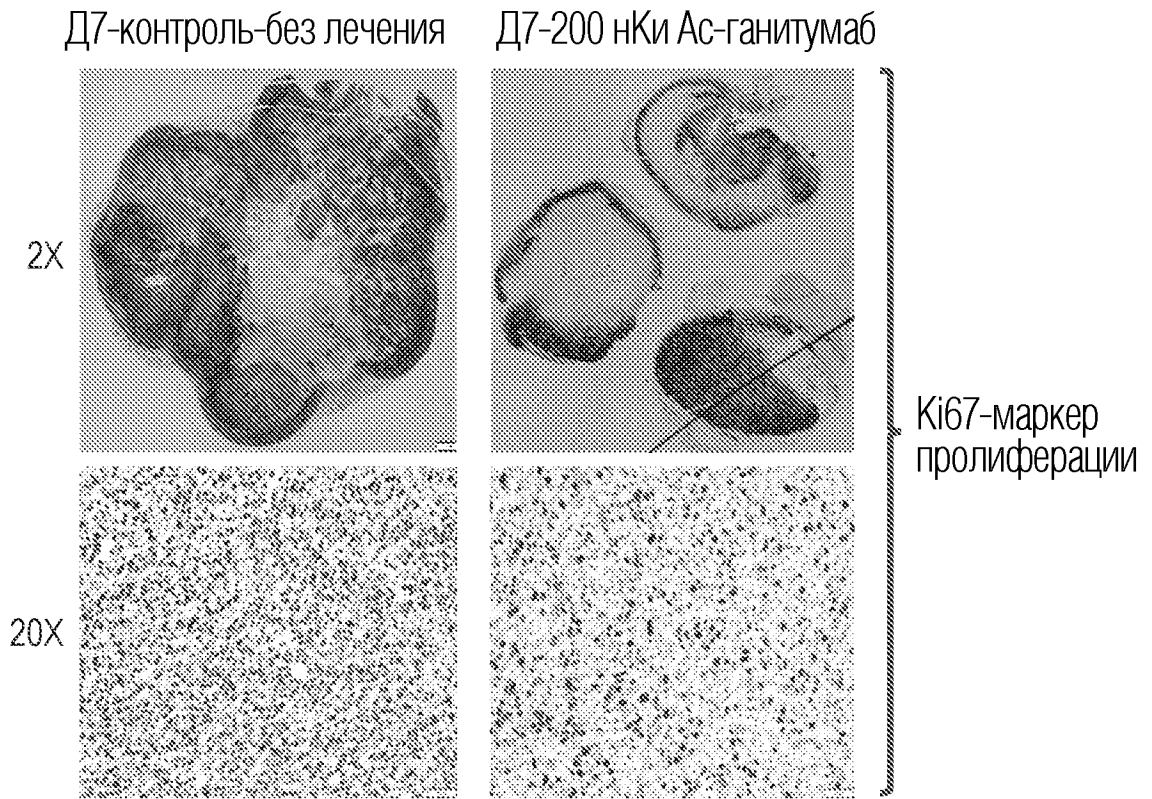
По доверенности



ФИГ. 1А



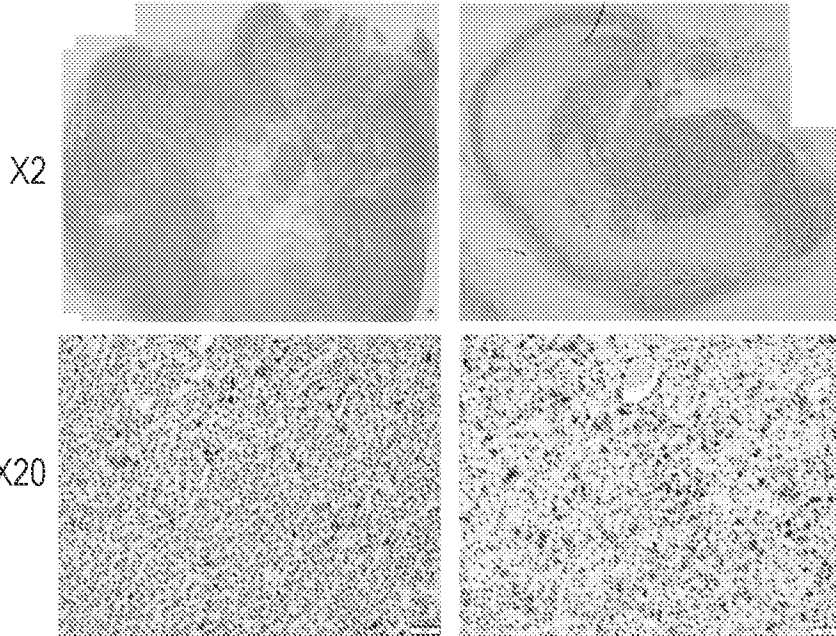
ФИГ. 1В



ФИГ. 1С

CD8 Т-клетки>

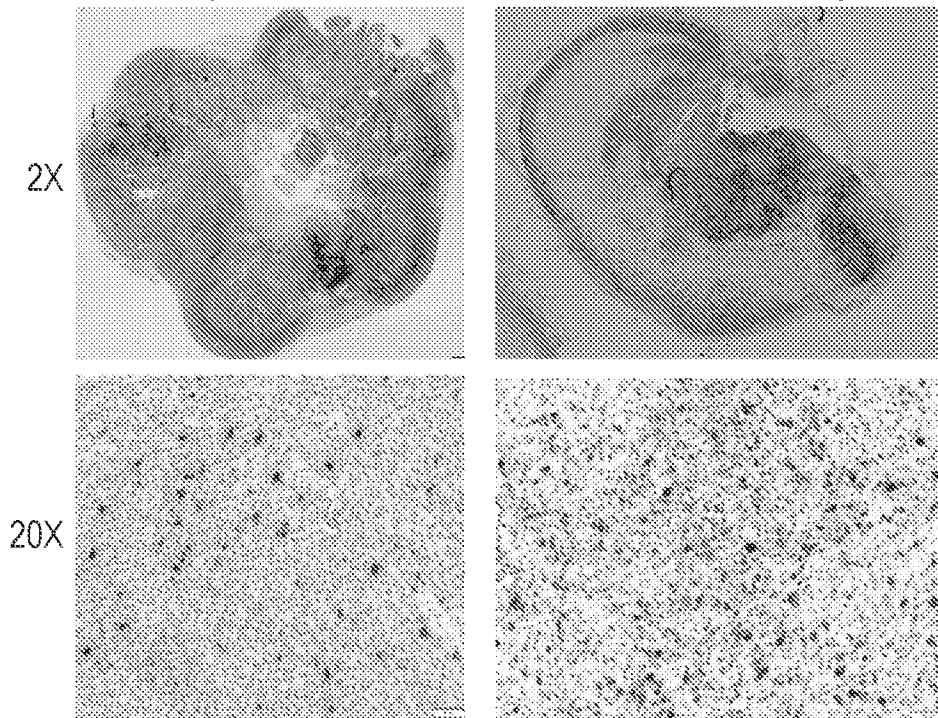
Д7-контроль-без лечения Д7-200 нКи Ас-ганитумаб



ФИГ. 1D

Гранзим В>

Д7-контроль-без лечения Д7-200 нКи Ас-ганитумаб



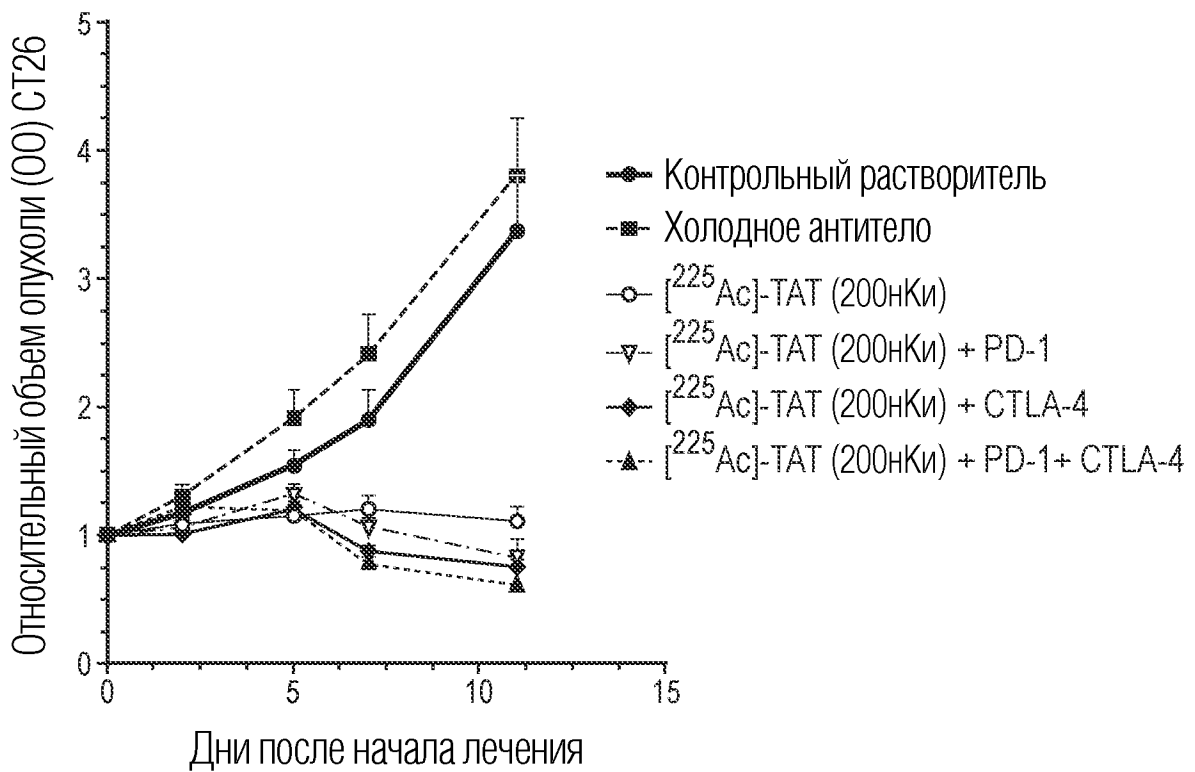
ФИГ. 1E



ФИГ. 2А

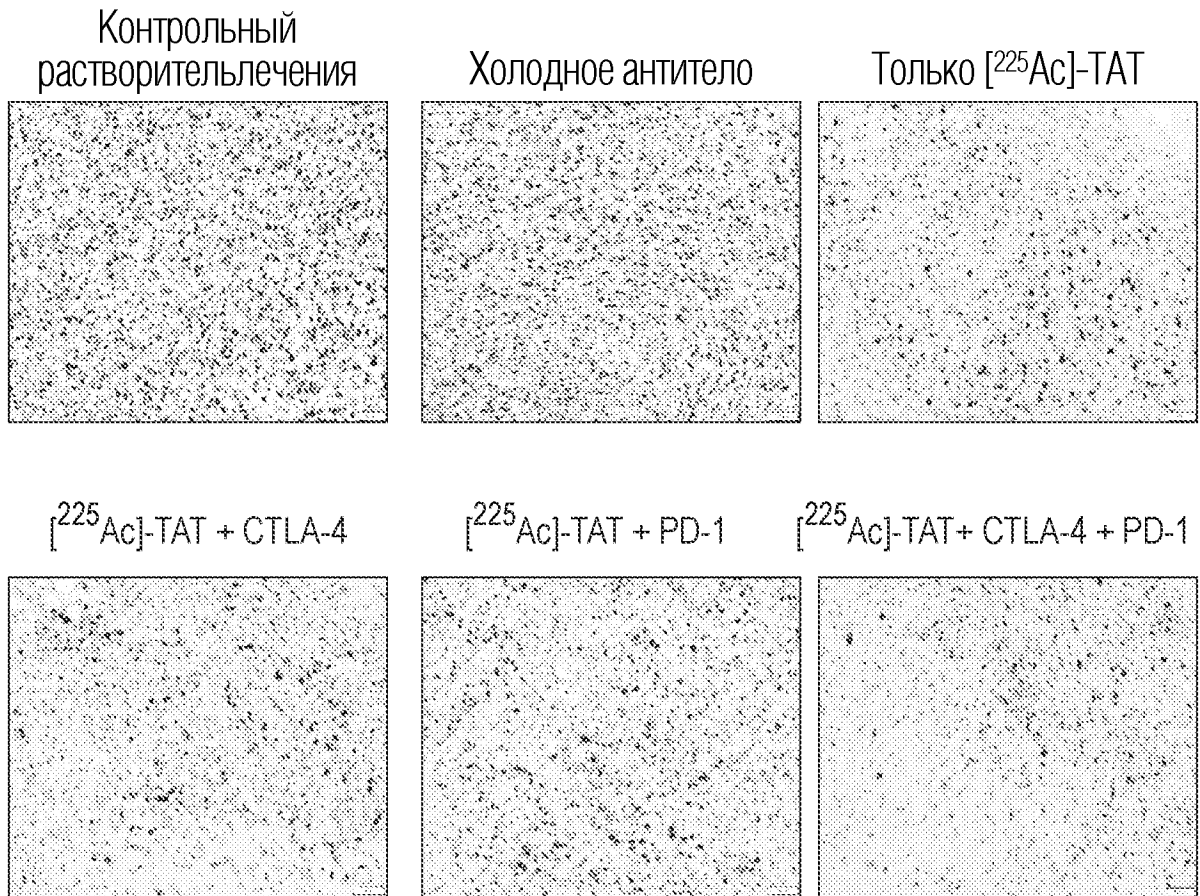
	0	1	4	7	10
$[^{225}\text{Ac}]\text{-TAT}$	X				
Анти-PD-1		X	X	X	X
Анти-CTLA-4		X	X	X	

ФИГ. 2В



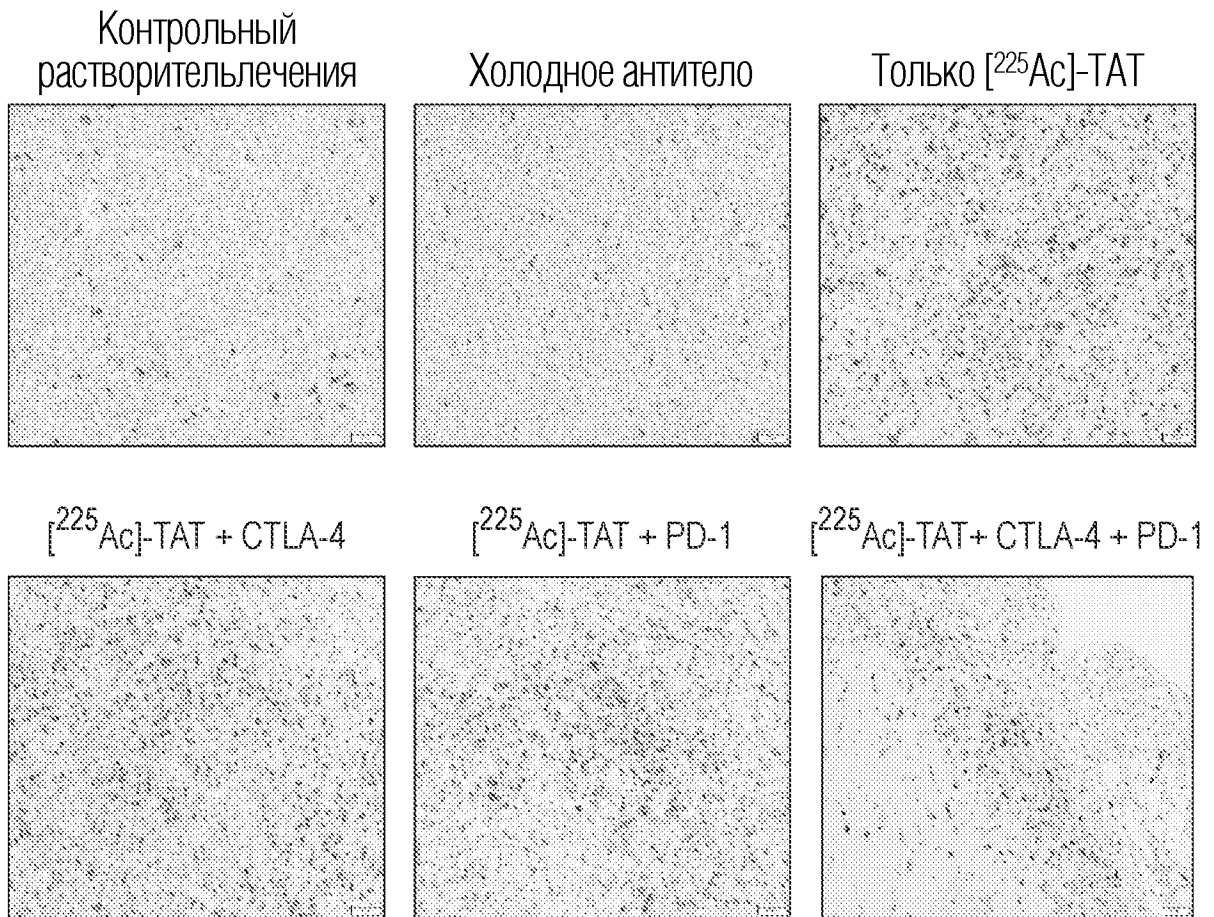
ФИГ. 2С

Окрашивание на Ki67



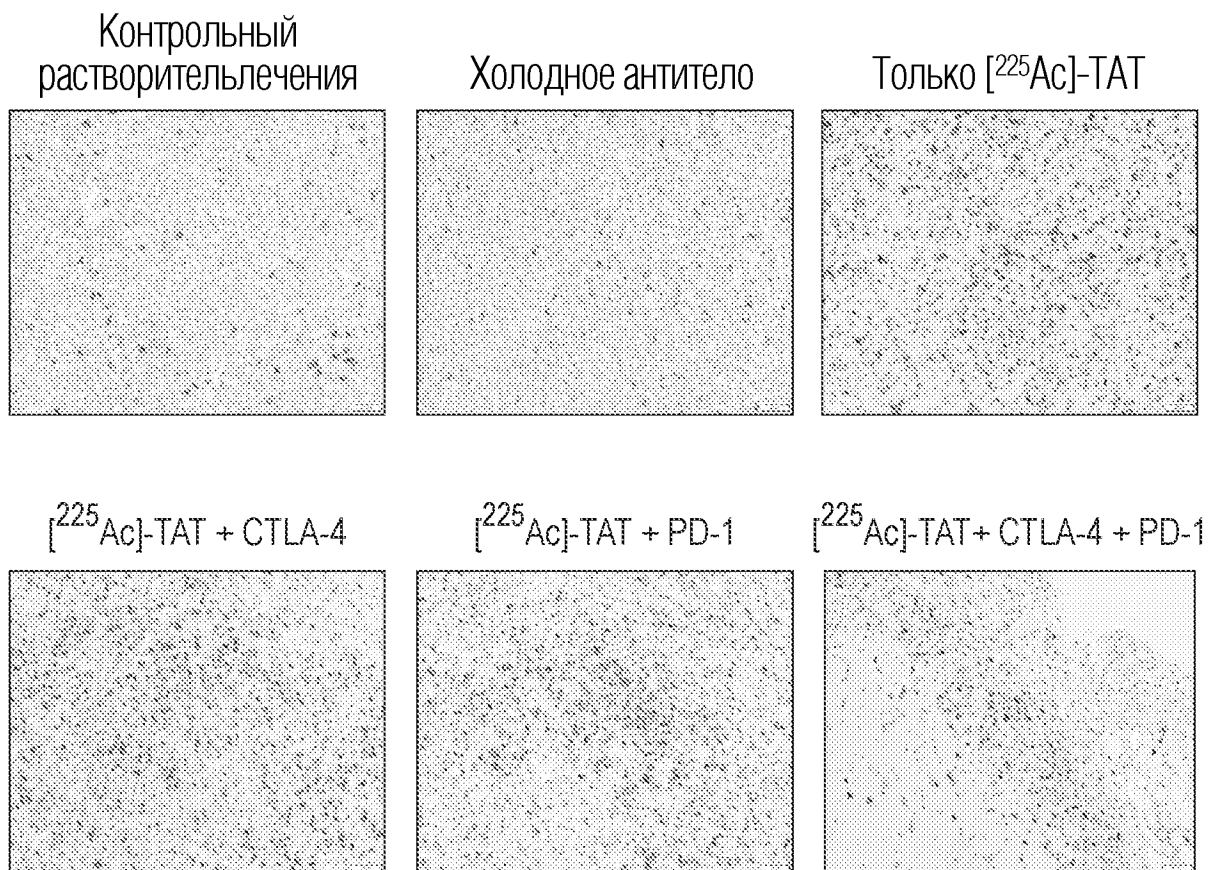
ФИГ. 2D

Окрашивание на CD8

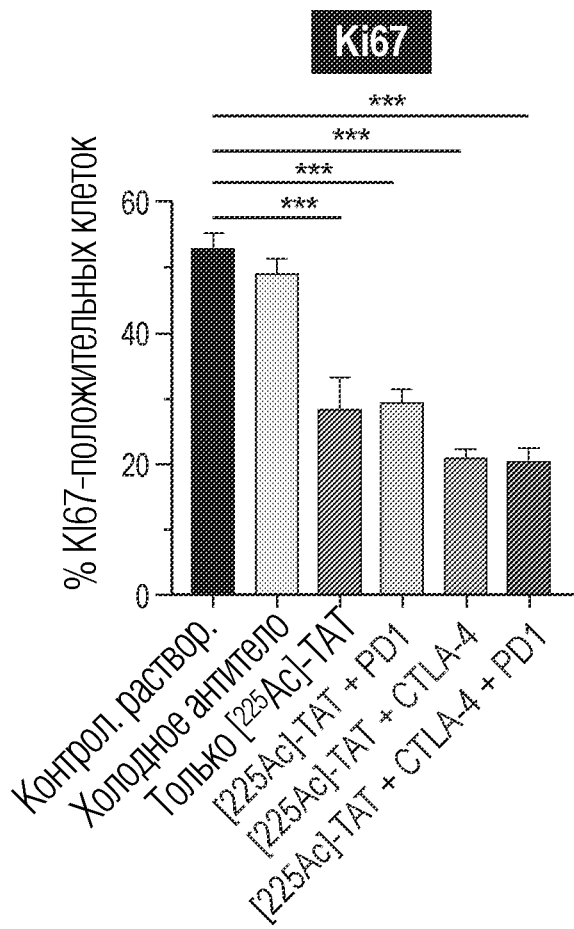


ФИГ. 2E

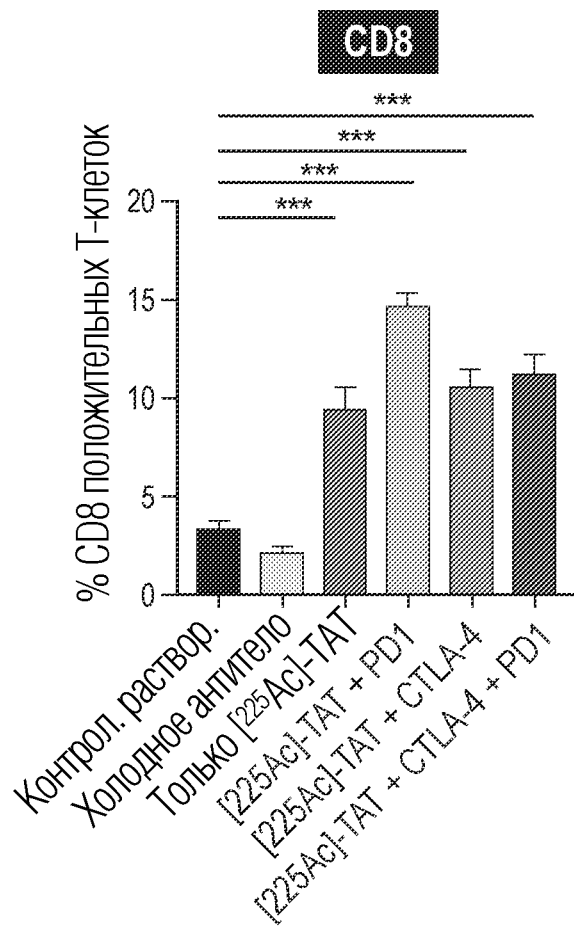
Окрашивание на гранзим В



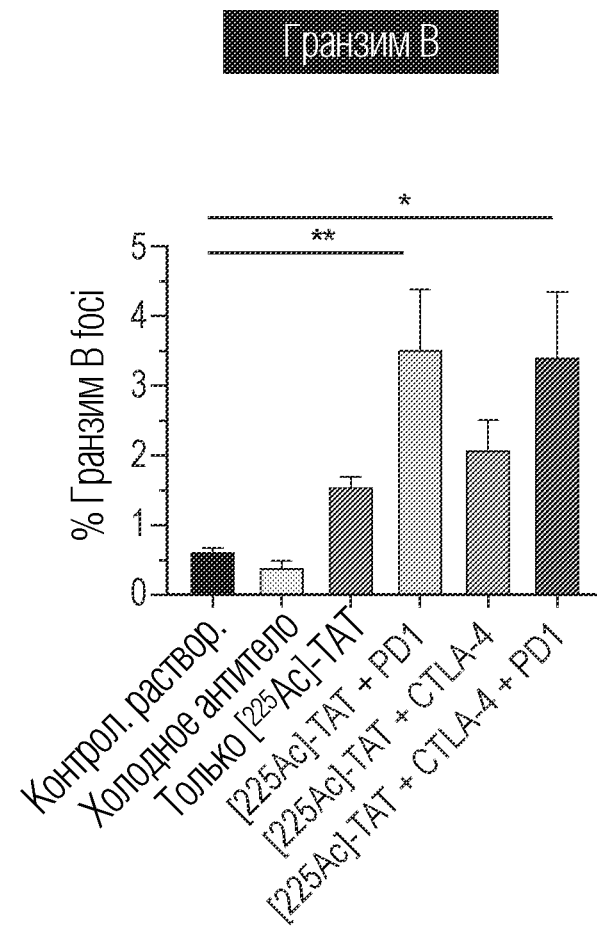
ФИГ. 2F



ФИГ. 2G



ФИГ. 2H



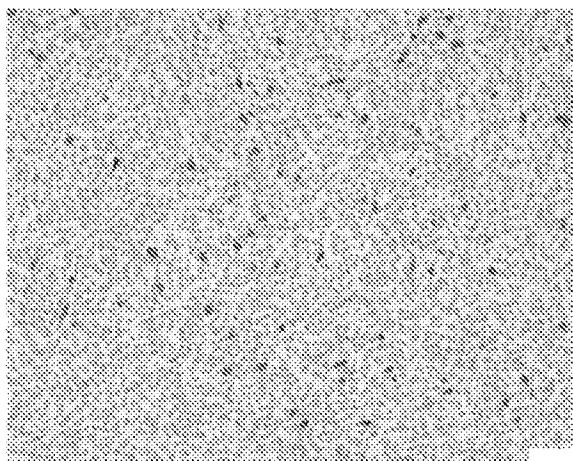
ФИГ. 2I



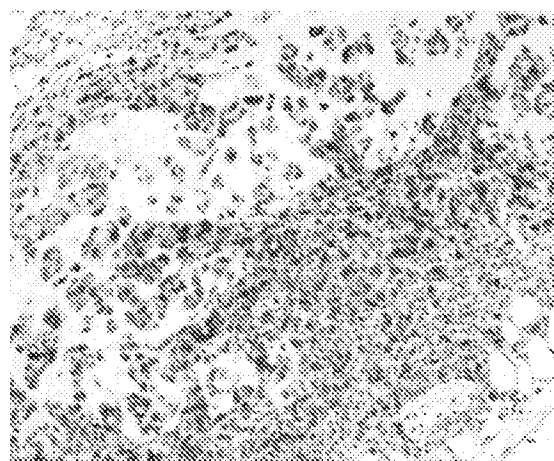
ФИГ. 3А

CD8 Т-клетки

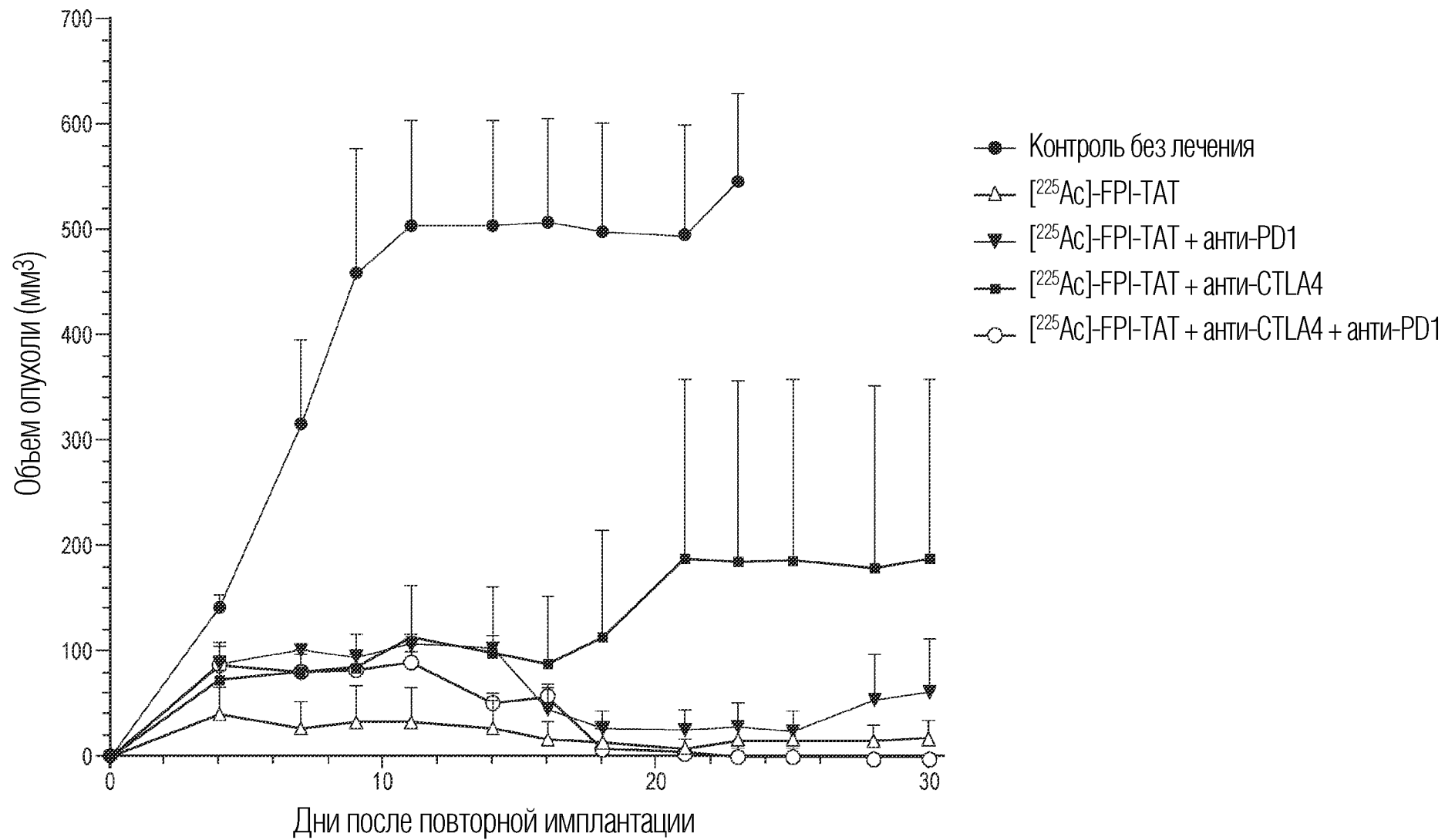
Контрольная опухоль



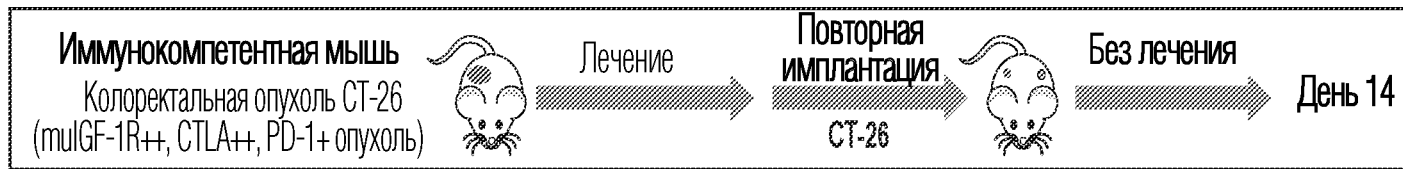
Вторичная опухоль



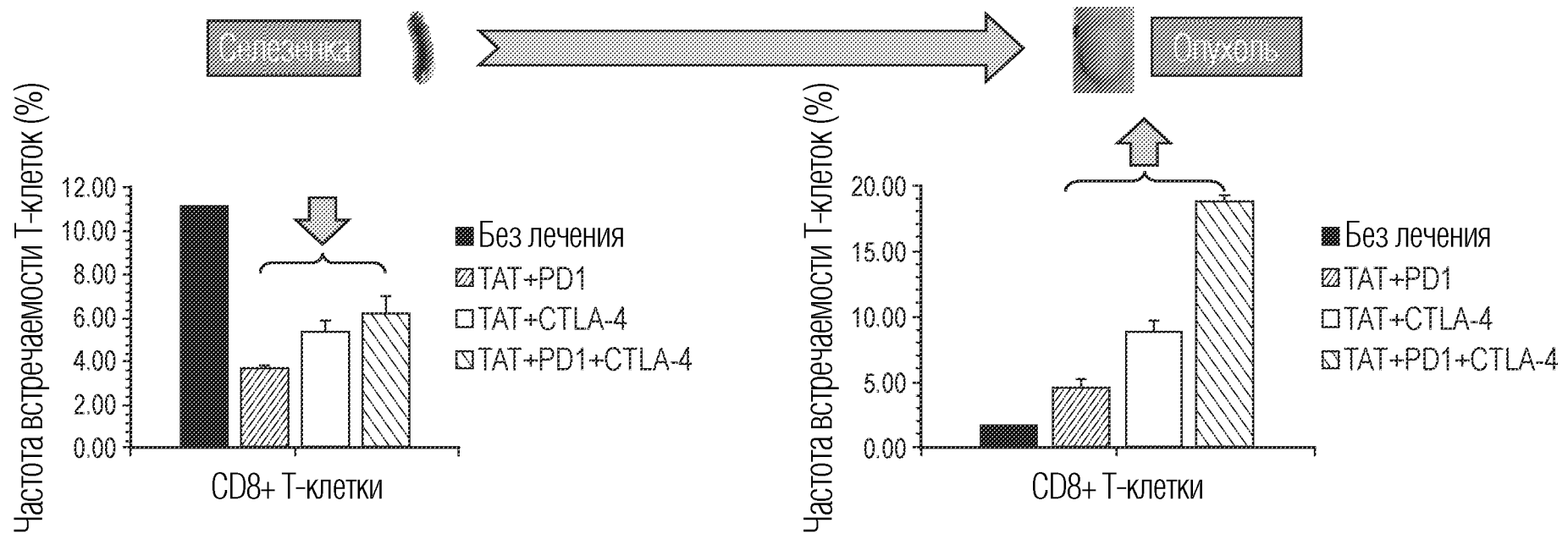
ФИГ. 3В



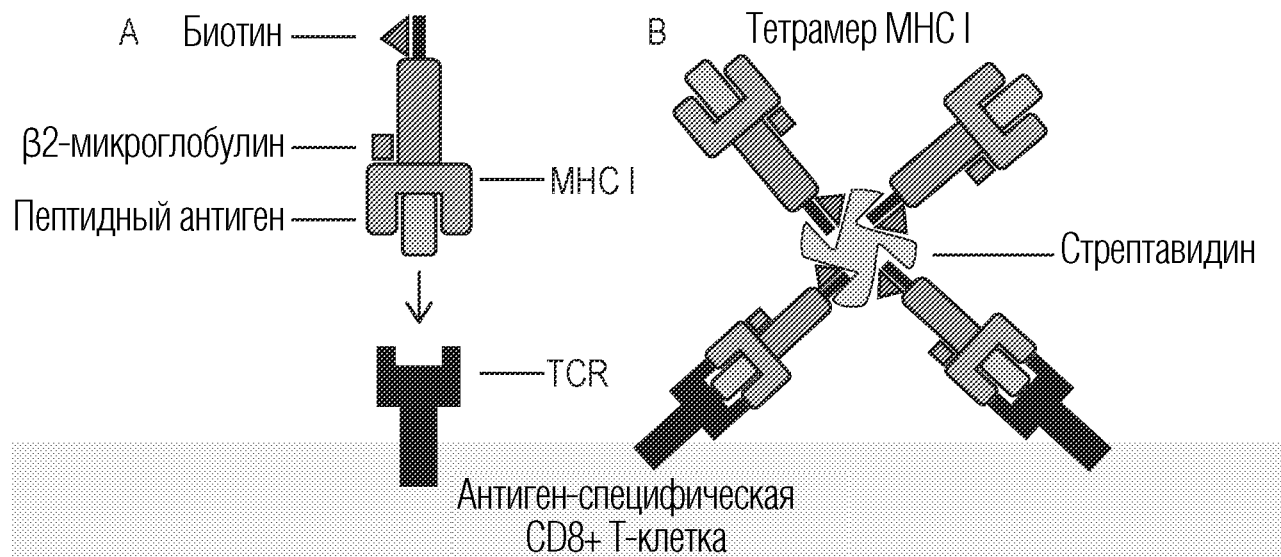
ФИГ. 3С



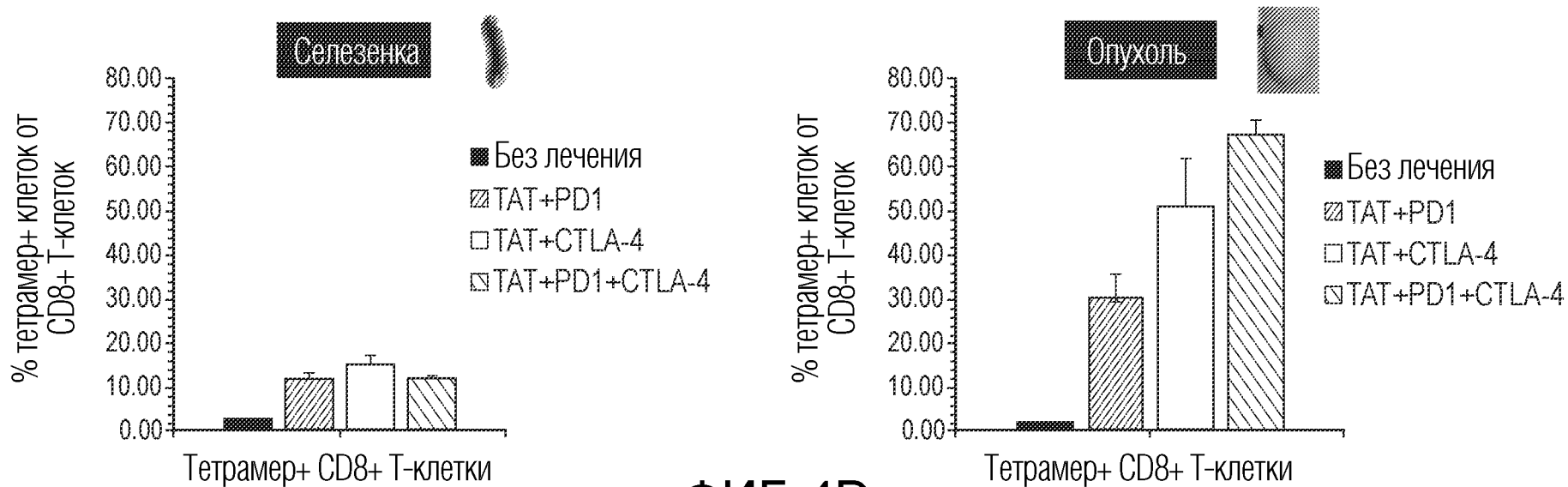
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



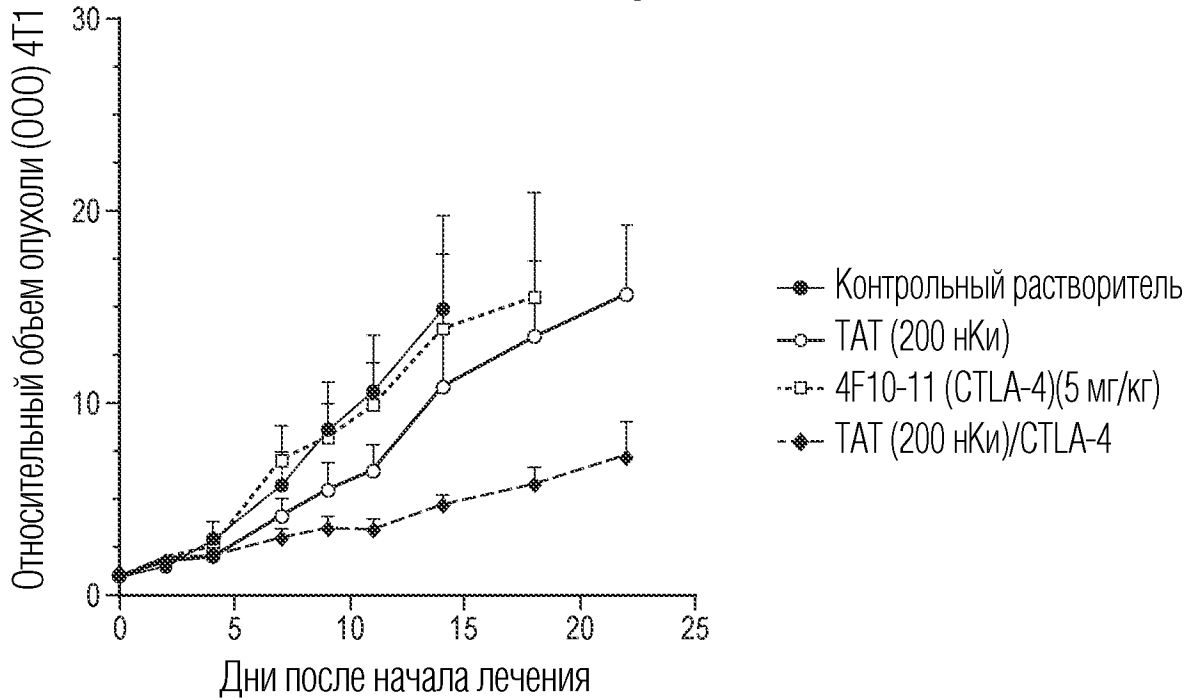
ФИГ. 4С



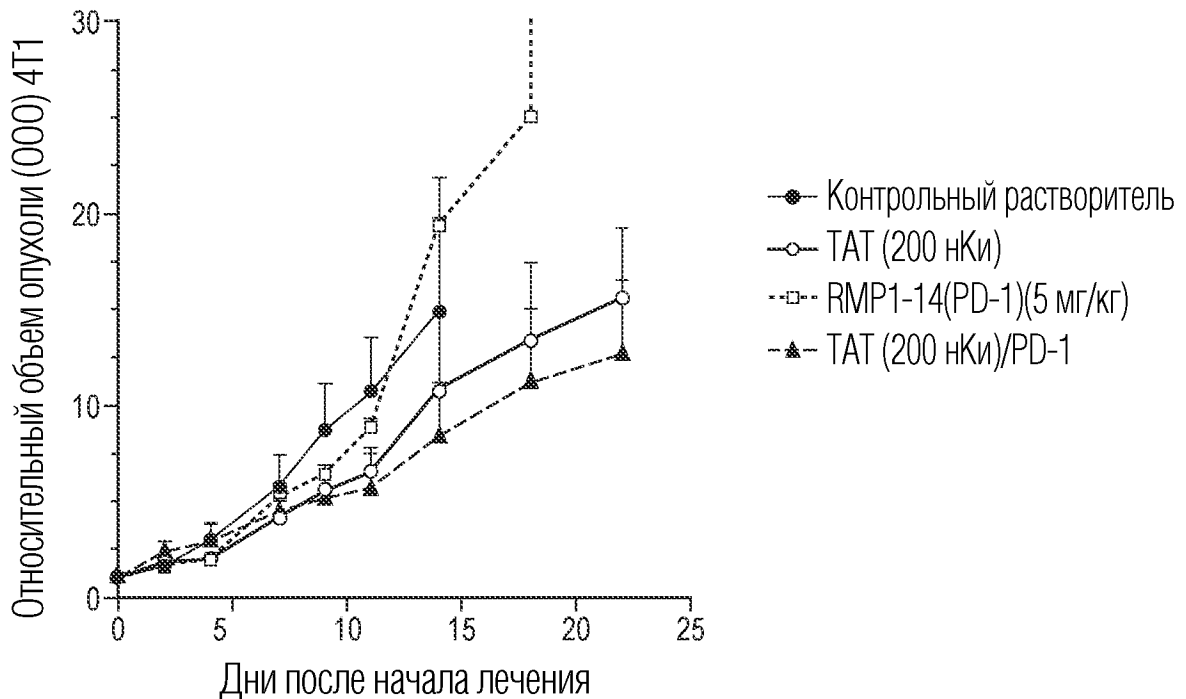
ФИГ. 4D



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 5С