

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043221**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.04.28**

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

(21) Номер заявки  
**201791350**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.12.15**

**(54) РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ**(31) **1422512.2**(32) **2014.12.17**(33) **GB**(43) **2017.12.29**(86) **PCT/EP2015/079773**(87) **WO 2016/096843 2016.06.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАЙЕР АС (NO)**

(72) Изобретатель:  
**Кутбертсон Алан (NO)**

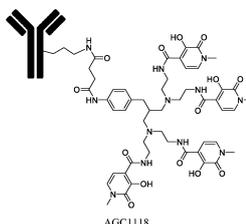
(74) Представитель:  
**Беляева Е.Н. (BY)**

(56) WO-A2-2011098611  
WO-A1-2013167754  
WO-A1-2013167755  
WO-A1-2013167756

Greg T. Hermanson: "Bioconjugate Techniques (3rd Edition) - Chapter 3: The Reactions of Bioconjugation", ProQuest ebrary. Web, 1 November 2013 (2013-11-01), XP55258103, Retrieved from the Internet: URL: [http:// site.ebrary.com/lib/epo/reader.action?docID=10738880&ppg=248](http://site.ebrary.com/lib/epo/reader.action?docID=10738880&ppg=248) [retrieved on 2016-03-14] table 3.1, page 229-240

MICHELLE T. MA ET AL.: "Tripodal tris(hydroxypyridinone) ligands for immunoconjugate PET imaging with  $^{89}\text{Zr}^{4+}$ : comparison with desferrioxamine-B", DALTON TRANSACTIONS: THE INTERNATIONAL JOURNAL FOR INORGANIC, ORGANOMETALLIC AND BIOINORGANIC CHEMISTRY, vol. 44, no. 11, 17 October 2014 (2014-10-17), pages 4884-4900, XP55255269, GB, ISSN: 1477-9226, DOI: 10.1039/C4DT02978J, abstract, chart 1, page 4896, section "Immunoconjugate preparation" page 4897, left column, paragraph 2

(57) Изобретение относится к комплексу тория, нацеленного на ткань, представляющему собой соединение, включающее соединение AGC1118, где указанный нацеленный на ткань фрагмент  $\Upsilon$  представляет собой моноклональное антитело, выбранное из hLL2 (эпратузумаб), NuM195 (линтузумаб), трастузумаба, BAY 1179470 и BAY 86-1903 (мезотелин); и 4+ ион радионуклида тория  $^{227}\text{Th}$ , излучающего альфа-частицы. Кроме того, изобретение относится к способу образования комплекса тория, фармацевтической препаративной форме, содержащей комплекс тория, применению комплекса тория и фармацевтической препаративной формы для производства лекарственного средства и способу лечения неопластического или гиперпластического заболевания, включающего введение комплекса тория, нацеленного на ткань, или фармацевтической препаративной формы.

**B1****043221****043221****B1**

### Область изобретения

Изобретение относится к комплексу тория-227, нацеленного на ткань, с определенным октадентатным лигандом, а также к способу образования данного комплекса тория, к фармацевтической препаративной форме, содержащей указанный комплекс тория, применению комплекса тория и фармацевтической препаративной формы для лечения гиперпластических или неопластических заболеваний и к способу лечения гиперпластических или неопластических заболеваний, включающему введение данного комплекса или указанной фармацевтической препаративной формы.

### Предпосылки к созданию изобретения

Для успешного лечения различных заболеваний у млекопитающих большое значение имеют способы специфического уничтожения клеток. Типичные примеры такого лечения - лечение злокачественных заболеваний, таких как саркомы и карциномы. Тем не менее, селективное удаление определенных типов клеток также может играть ключевую роль при лечении других заболеваний, в особенности, гиперпластических и неопластических заболеваний.

В настоящее время наиболее распространенными способами селективного лечения являются хирургическое вмешательство, химиотерапия и внешнее облучение. Направленная радионуклидная терапия является, тем не менее, развивающейся и перспективной областью, с помощью которой можно осуществлять доставку высокоцитотоксичного излучения в клетки, специфически связанные с определенным заболеванием. В наиболее распространенных формах радиофармацевтических средств, применение которых разрешено в настоящее время для лечения человека, используют радионуклиды, излучающие бета- или гамма-частицы. Тем не менее, в отношении использования при терапии также представляют интерес радионуклиды, излучающие альфа-частицы, из-за их потенциала специфического уничтожения клеток.

Диапазон излучения типичных альфа-излучающих радионуклидов в физиологическом окружении составляет, как правило, менее 100 мкм, что равно лишь нескольким клеточным диаметрам. Из-за этого такие источники излучения являются пригодными для лечения опухолей, включая микрометастазы, так как диапазон из действия может достигать ближайших клеток в опухоли, однако лишь небольшое количество излучаемой энергии будет выходить за пределы клеток-мишеней, при условии соответствующего нацеливания. Таким образом, нет необходимости производить нацеливание в каждую клетку, однако при этом может быть минимизированы повреждения окружающих здоровых тканей (см. Feinendegen et al., *Radiat Res* 148:195-201 (1997)). Напротив, диапазон действия бета-частиц в водной среде составляет 1 мм или более (см. Wilbur, *Antibody Immunocon Radiopharm* 4: 85-96 (1991)).

Энергия альфа-излучения высока по сравнению с энергией бета-частиц, гамма-излучения и рентгеновского излучения, как правило, она составляет 5-8 МэВ, или в 5-10 раз выше, чем энергия бета-частиц и в 20 и более раз выше, чем энергия гамма-излучения. Таким образом, такое воздействие большим количеством энергии на очень малом расстоянии обеспечивает чрезвычайно высокую линейную передачу энергии (LET)  $\alpha$ -излучения, высокую относительную биологическую эффективность (RBE) и низкий коэффициент кислородного усиления (OER) по сравнению с гамма- и бета-излучением (см. Hall, "Radiobiology for the radiologist", пятое издание, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, США, 2000). Этим объясняется исключительная цитотоксичность альфа-излучающих радионуклидов, но также налагает строгие требования к биологическому нацеливанию таких изотопов, а также к обеспечению необходимого уровня контроля и глубины изучения распределения альфа-излучающих радионуклидов для предотвращения недопустимых побочных эффектов.

В табл. 1 ниже показаны свойства физического распада альфа-излучающих радионуклидов, которые на настоящий момент предлагаются в литературе в качестве радионуклидов, потенциально обладающих терапевтической эффективностью.

Таблица 1

Кандидатный нуклид	$T_{1/2}$ *	Клинические исследования в отношении
$^{225}\text{Ac}$	10.0 дней	лейкемии
$^{211}\text{At}$	7.2 часов	глиобластомы
$^{213}\text{Bi}$	46 минут	лейкемии
$^{223}\text{Ra}$	11.4 дней	скелетных метастаз
$^{224}\text{Ra}$	3.66 дня	анкилозирующего спондилита

\* Период полураспада.

До настоящего момента, в отношении радиоиммунотерапии, основное внимание уделялось  $^{211}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  и  $^{225}\text{Ac}$ , в клинических иммунотерапевтических исследованиях изучались именно эти три нуклида.

Некоторые из предлагаемых радионуклидов являются скоропортящимися, т.е. их период полураспада составляет менее 12 ч. Из-за такого короткого периода полураспада коммерческое производство и распространение этих радионуклидов затруднено. При введении нуклида с коротким периодом полураспада также увеличивается доза радиационного излучения, которую получает организм, до достижения лекарством целевого участка.

Энергия отдачи альфа-излучения во многих случаях приведет к высвобождению дочерних нукли-

дов из места распада материнского нуклида. Такой энергии отдачи достаточно для того, чтобы многие дочерние ядра вышли из химического окружения, в котором находился материнский нуклид, например, если материнский нуклид присутствовал комплекс с лигандом, таким как хелатирующий агент. Это будет происходить даже в том случае, если дочерний нуклид является химически совместимым, т.е. может образовывать комплексы с тем же лигандом. Аналогичным образом, в случае если дочерним нуклидом является газ, в частности, инертный газ, например, радон, или если дочерний нуклид химически несовместим с лигандом, такой эффект высвобождения будет еще больше. Если периоды полураспада дочерних нуклидов больше нескольких секунд, может происходить их диффузия и попадание в кровеносную систему, так как они не удерживаются веществом, входившим в состав комплекса, которое удерживало материнский нуклид. Эти свободные радиоактивные дочерние радионуклиды также могут вызывать нежелательную системную токсичность.

Несколько лет назад было выдвинуто предложение о применении тория-227 ( $T_{1/2} = 18,7$  дней) в условиях контроля дочернего изотопа  $^{223}\text{Ra}$  (см. WO 01/60417 и WO 02/05859). Такое применение было возможно в ситуации, когда использовалась система носителя, позволявшего удерживать дочерние нуклиды в замкнутой среде. В одном случае радионуклид располагается в липосоме, и значительный размер липосомы (по сравнению с расстоянием энергии отдачи) позволяет удерживать дочерние нуклиды в липосоме. Во втором случае используют остеотропные комплексы радионуклида, которые встраиваются в костный матрикс и ограничивают, таким образом, высвобождение дочерних нуклидов. Эти способы являются особенно предпочтительными, однако при некоторых обстоятельствах применение липосом нежелательно, и существует большое количество мягких тканей, в которых радионуклиды не могут быть окружены минерализованной матрицей для удерживания дочерних изотопов.

Относительно недавно было установлено, что токсичность дочерних ядер  $^{223}\text{Ra}$ , которые высвобождаются после распада  $^{227}\text{Th}$  переносится организмом млекопитающего лучше, чем предполагалось на основании результатов предшествующих исследований, где использовались аналогичные ядра. В отсутствии специфических средств для удержания дочернего радия, который образуется при распаде -227, в соответствии с описанием выше, из общедоступной информации о токсичности радия понятно, что применение тория-227 в качестве лекарственного агента невозможно, так как использование доз необходимых для достижения терапевтического эффекта от распада тория-227 приведет к получению высокотоксичной и, возможно, летальной дозы радиации в результате распада дочерних нуклидов радия, таким образом, отсутствует терапевтическое окно.

В документе WO 04/091668 описывается, что неожиданно было обнаружено, что существует терапевтическое окно, в котором терапевтически эффективное количество нацеленного радионуклида тория-227 может быть введено пациенту (как правило, млекопитающему) без образования такого количества радия-223, которого было бы достаточно для того, чтобы вызвать недопустимую миелотоксичность. Таким образом, это может использоваться для лечения и профилактики всех типов заболеваний как в участках организма с костными, так и с мягкими тканями.

Ввиду вышеуказанных разработок, в настоящее время возможно использовать излучающие альфа-частицы ядра тория-227 в эндорадионуклидной терапии без летальной миелотоксичности в результате образования  $^{223}\text{Ra}$ . Несмотря на это, терапевтическое окно является относительно узким, и при любых обстоятельствах нежелательно вводить пациенту большее количество излучающего альфа-частицы радиоизотопа, чем необходимо. Следовательно, польза от применения такого нового терапевтического окна значительно бы повысилась, если бы излучающий альфа-частицы торий-227 использовался в составе комплекса и нацеливался с высокой степенью надежности.

Так как постоянно происходит распад радионуклидов, чрезвычайно значение имеет время, которое затрачивается между выделением материала и введением лекарства пациенту. Кроме того, было бы чрезвычайно полезно, если бы ядра тория, излучающие альфа-частицы, входили в состав комплекса, были нацелены и/или применялись в форме, получение которой не занимало бы много времени и не было бы сложным, предпочтительно, осуществлялось бы с использованием малого количества этапов, коротких периодов инкубации с несколькими этапами и/или температур, которые не влияют необратимым образом на свойства нацеливаемого соединения. Кроме того, процессы, которые могут осуществляться в растворителях, не требующих удаления перед применением (в особенности, в водных растворах), обладают тем преимуществом, что в этом случае исключается этап испарения растворителя или этап диализа.

Кроме того, было бы чрезвычайно полезно, если бы было разработано лекарственное средство с меткой тория с повышенной стабильностью. Это имеет критическое значение для соблюдения стандартов качества в отношении устойчивости продукта, при этом обеспечивается логистический контур для доставки дозы лекарственного средства пациенту. Таким образом, предпочтительными являются препаративные формы с минимальным радиолизом в течение периода 1-4 дня.

Ране было доказано, что октадентатные хелатирующие агенты, содержащие группы гидроксипиридинона могут использоваться для координирования излучающего альфа-частицы тория-227, для последующего прикреплении к нацеливаемому фрагменту (WO 2011098611). Были описаны октадентатные хелаторы, содержащие четыре группы 3,2-гидроксипиридинона, с присоединенными линкерными группами к скаффолду на основе аминов с отдельной реактивной группой, используемой для конъюгации с

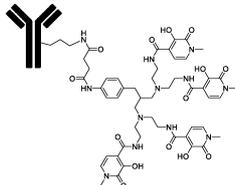
нацеленной молекулой. В предпочтительных структурах по предыдущему изобретению содержались группы 3,2-гидроксипиридинона и использовался изотиоцианатный фрагмент в качестве предпочтительной химической структуры для соединения с компонентом антитела, как показано в соединении ALG-DD-NCS. Изотиоцианат широко используется для присоединения метки к белкам через аминные группы. Группа изотиоцианата реагирует с амино-концом и первичными аминами в белках, она может использоваться для мечения многих белков, включая антитела. Несмотря на то, что тиомочевинная связь, образующаяся в этих конъюгатах является достаточно стабильной, было описано, что конъюгаты антител, полученные из флуоресцентных изотиоцианатов со временем разрушаются. [Banks P.R., Paquette D.M., *Bioconjug Chem* (1995) 6:447-458]. Тиомочевина, образующаяся путем реакции флуоресцинизотиоцианата с аминами при основных условиях также подвержена конверсии в гуанидин [Dubey I, Pratiel G, Meunier V *Journal: Bioconjug Chem* (1998) 9:627-632]. Из-за долгого периода полураспада тория-227 (18,7 дней), соединенного с моноклональным антителом с долгим биологическим периодом полураспада, желательно использовать более стабильные связывающие фрагменты для получения конъюгатов, которые более химически стабильны *in vivo* и при хранении.

Самая близкая по тематике предыдущая работа в отношении конъюгации лигандов гидроксипиридинона была опубликована в WO 2013/167754. В ней описаны лиганды, имеющие водорастворимый фрагмент с гидроксилалкильной функциональностью. Из-за высокой реактивной способности гидроксильных групп этого класса хелатов, активация в виде активированного сложного эфира невозможна, так как в этом случае возникает множество параллельных реакций, в результате чего посредством реакций эстерификации получают смесь продуктов. Таким образом, в соответствии с WO 2013/167754 лиганды должны быть связаны с нацеленным на ткань белком через альтернативные химические структуры, такие как изотиоцианат, с получением менее стабильного конъюгата тиомочевины в соответствии с описанием выше. Кроме того, в документах WO 2013167755 и WO 2013167756 описаны конъюгаты гидроксилалкил/изотиоцианат, применяемые для нацеленных антител CD33 и CD22, соответственно.

Авторами настоящего изобретения было установлено, что при формировании нацеленного на ткань комплекса путем связывания специфического хелатора с соответствующими нацеливающими фрагментами, а затем путем добавления излучающего альфа-частицы 4+ иона тория <sup>227</sup>Th оперативно, при нежестких условиях может быть получен комплекс с помощью связывающего фрагмента, который остается более стабильным при хранении комплекса и при его введении его пациенту.

#### Краткое изложение сущности изобретения

Таким образом, в соответствии с первым аспектом настоящим изобретением предоставляется комплекс тория, нацеленный на ткань, представляющий собой соединение, включающее



причем указанный нацеленный на ткань фрагмент Y представляет собой моноклональное антитело, выбранное из hLL2 (эпратузумаб), HuM195 (линтузумаб), трастузумаба, BAY 1179470 и BAY 86-1903 (мезотелин); и 4+ ион радионуклида тория <sup>227</sup>Th, излучающего альфа-частицы.

В предпочтительной форме выполнения комплекса тория, нацеленного на ткань, указанное моноклональное антитело, нацеленное на ткань, включает, по меньшей мере, одну пептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере с 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере, с одной из следующих последовательностей:

Легкая цепь:

DIQLTQSPSSLAVSAGENVMTSCSSQSVLYSANHKNYLAWYQQKPGQ  
SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISRQVEDLAIYCHQYLSWTF  
GGGTKLEIKR (SeqID1)

DIQLTQSPSSLASA AVEDRTMCSKSSQSVLYSANHKNYLAWYQQKPGQ  
KAKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTFITISLQPEDIAITYCHQYLSWTF  
GGGTKLEIKR (SeqID2)

Тяжелая цепь:

QVQLQESGAELSKPGASVKMCSKASGYTFTSYWLHWIKRPGQGLEW  
GYINPRNDYTEYNQNFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRDI  
TFYWGQGTITLVSS (SeqID3)

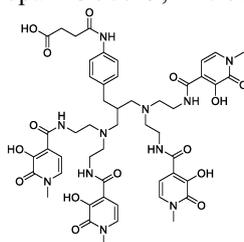
QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEW  
IGYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDIT  
TFYWGQGTITLVSS (SeqID4)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEW  
IGYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDIT  
TFYWGQGTITLVSS (SeqID5)

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предоставляется способ образования

комплекса тория, нацеленного на ткань, при этом указанный способ включает следующие этапы:

а) образование октадентатного хелатора AGC0019, имеющего следующую структуру:



б) соединение указанного октадентатного хелатора, по меньшей мере, с одним нацеленным на ткань фрагментом, содержащим, по меньшей мере, один аминный фрагмент, с помощью, по меньшей мере, одного реагента, связывающего амиды, выбранного из N-гидроксималеимида, карбодиимида и/или азодикарбоксилат-активирующих реагентов, причем получают нацеленный на ткань хелатор, причем указанный нацеленный на ткань фрагмент представляет собой моноклональное антитело, выбранное из hLL2 (эпратузумаб), HuM195 (линтузумаб), трастузумаба, BAY 1179470 и BAY 86-1903 (мезотелин); и

с) приведение в контакт указанного нацеленного на ткань хелатора с водным раствором, содержащим 4+ ион радионуклида тория  $^{227}\text{Th}$ , излучающего альфа-частицы.

В таких комплексах (и во всех аспектах настоящего изобретения) комплекс иона тория, как правило, образуется с помощью содержащего соответствующий октадентатный гидроксипиридинон лиганда, который в свою очередь прикрепляется к нацеленному на ткань фрагменту посредством амидной связи.

Указанный способ является способом синтеза октадентатного хелата на основе 3,2-гидроксипиридинона, включающего функцию реактивного карбоксилата, которая может активироваться в виде активного сложного эфира (такого как сложный эфир N-гидроксисукцинимида (NHS-сложный эфир)) либо в ситуации *in situ* или путем синтеза и выделения самого активного сложного эфира.

Полученный NHS-сложный эфир может использоваться на этапе простой конъюгации для получения широкого спектра форм белка, модифицированного хелатом. В дополнение, высокостабильные конъюгаты антитела уже маркированы торием-227. Это может происходить при обычной температуре или при температуре близкой обычной температуре, как правило, с высоким радиохимическим выходом и чистотой.

Способ по изобретению предпочтительно осуществляют в водном растворе, а в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения он может осуществляться при отсутствии или практически в отсутствии (при содержании менее 1% по объему) какого-либо органического растворителя.

Нацеленные на ткань фрагменты представляют собой моноклональное антитело, выбранное из hLL2 (эпратузумаб), HuM195 (линтузумаб), трастузумаба, BAY 1179470 и BAY 86-1903 (мезотелин).

Нацеленные на ткань комплексы по настоящему изобретению могут входить в состав лекарственных средств, пригодных для введения пациентам: человеку и нечеловекообразному животному.

Таким образом, в соответствии со следующим аспектом изобретением предоставляются способы получения фармацевтической препаративной формы, включающие получение нацеленного на ткань комплекса в соответствии с описанием в настоящем документе путем добавления, по меньшей мере, одного фармацевтического носителя и/или вспомогательного вещества. Соответствующие носители и вспомогательные вещества включают буферы, хелатирующие агенты, стабилизирующие агенты прочие соответствующие компоненты, известные специалистам и описанные в соответствии с любым аспектом в настоящем документе.

В соответствии с первым аспектом изобретением предоставляется нацеленный на ткань комплекс тория. Такой комплекс будет иметь характеристики, описанные по тексту настоящего документа, в частности, предпочтительные характеристики, описанные в настоящем документе. Указанный комплекс может быть получен с использованием любых способов, описанных в настоящем документе. Таким образом, с помощью таких способов можно получить, по меньшей мере, один нацеленный на ткань комплекс тория в соответствии с любым аспектом или вариантом осуществления изобретения, которые описаны в настоящем документе.

В соответствии с еще одним аспектом настоящим изобретением предоставляется фармацевтическая препаративная форма, содержащая любой из комплексов, описанных в настоящем документе. Указанная препаративная форма может быть получена с использованием любых способов, описанных в настоящем документе, и может содержать, по меньшей мере, один буфер, стабилизатор и/или вспомогательное вещество. Буфер и стабилизатор могут быть подобраны таким образом, чтобы они способствовали защите нацеленного на ткань комплекса от радиолитического распада. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения радиолитический распад комплекса в препаративной форме является минимальным даже через несколько дней после производства препаративной формы. Это является существенным преимуществом, так как в этом случае устраняются возможные проблемы, связанные с качеством продукта и логистикой при поставках лекарственных средств, что играет ключевое значение для осуществления и практического применения

этой технологии.

Была доказана практическая ценность настоящего изобретения при получении множества конъюгатов антител, меченных торием, для нацеливания в участки организма, представляющие биологический интерес, такие как рецепторы, связанные с опухолями.

#### **Подробное описание изобретения**

В контексте настоящего изобретения термин "нацеленность на ткань" при использовании по тексту настоящего документа означает, что соответствующее вещество (в частности, в форме нацеленного на ткань комплекса в соответствии с описанием в настоящем документе) предназначено для локализации (и, в частности, для локализации взаимосвязанного комплекса тория) предпочтительно, по меньшей мере, в один участок ткани, где его присутствие является желательным (например, для доставки радиоактивного распада). Таким образом, нацеленные на ткань группы или фрагменты служат для лучшей локализации соответствующего вещества, по меньшей мере, в одном участке организма пациента после его введения такому пациенту по сравнению с концентрацией аналогичного комплекса без такого нацеленного фрагмента. В данном случае такой нацеленный фрагмент предпочтительно выбран таким образом, чтобы специфически связываться с рецепторами клеточной поверхности, связанными с раковыми клетками, или с другими рецепторами, связанными с микроокружением опухоли.

Известно несколько целей, связанных с гиперпластическими и неопластическими заболеваниями. Такие цели включают определенные рецепторы, белки клеточной поверхности, трансмембранные белки и белки/пептиды, которые находятся во внеклеточной матрице поблизости от пораженных клеток. Примеры рецепторов клеточной поверхности и антигенов, которые могут ассоциироваться с неопластическими заболеваниями, включают CD22, CD33, FGFR2 (CD332), PSMA, HER2, мезотелин, и т.д. Нацеленный на ткань фрагмент (например, пептид или белок) имеет специфичность в отношении, по меньшей мере, одного антигена или рецептора, выбранного из CD22, CD33, FGFR2 (CD332), PSMA, HER2 и мезотелина.

CD22 или кластер дифференцировки 22 - это молекула, принадлежащая семейству лектинов SIGLEC (SIGLEC = иммуноглобулин-подобные лектины, связывающие сиаловую кислоту).

CD33 или Siglec-3 - это трансмембранный рецептор, экспрессированный на клетках миелоидной линии.

FGFR2 - это рецептор для фактора роста фибробластов. Это белок, который кодируется в человеке геном FGFR2, который расположен на хромосоме 10.

HER2 - это член семейства рецепторов эпидермального фактора роста (HER/EGFR/ERBB) человека.

Простатический специфический мембранный антиген (PSMA) - это фермент, который кодируется в человеке геном FOLH1 (фолатгидролаза 1).

Мезотелин, также известный как MSLN, - это белок, который кодируется в человеке геном MSLN.

В данном случае особенно предпочтительные нацеленные на ткань связывающие фрагменты выбраны из фрагментов, связывающихся специфически с рецептором CD22. Это может выражаться в том, что, например, такой фрагмент имеет более высокую аффинность связывания (в 50 и более раз) для клеток, экспрессирующих CD22 по сравнению с клетками, не экспрессирующими CD22 (например, по меньшей мере, в 100 раз более высокую аффинность связывания, предпочтительно, по меньшей мере, в 300 раз более высокую аффинность связывания). Есть основания полагать, что экспрессия и/или сверхэкспрессия CD22 происходит в клетках с определенными стадиями заболевания (как указывается в настоящем документе); таким образом, связывающий фрагмент специфический по отношению к CD22 может выступать для нацеливания комплекса в такие клетки. Аналогичным образом, нацеленный на ткань фрагмент может связываться с маркерами клеточной поверхности (например, с рецепторами CD22), которые присутствуют в клетке вблизи от пораженных заболеванием клеток. По сравнению с поверхностью здоровых клеток экспрессия маркеров клеточной поверхности CD22 может быть более сильной на поверхности пораженных клеток или более сильной на поверхности клеток в течение периодов роста или репликации по сравнению с "дремлющей" фазой. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, нацеленный на ткань связывающий фрагмент специфический по отношению к CD22 может использоваться в комбинации с другим связывающим фрагментом для маркера клеточной поверхности специфического по отношению к заболеванию, в результате чего получают двойной связывающий комплекс. Нацеленными на ткань связывающими фрагментами для CD-22, как правило, являются пептиды или белки.

Различные аспекты изобретения в соответствии с описанием в настоящем документе относятся к лечению заболеваний, в частности, они предназначаются для селективного нацеливания в пораженную ткань, а также могут относиться к комплексам, конъюгатам, лекарственным средствам, препаративным формам, лекарственным наборам, которые используют для осуществления способов в соответствии с изобретением. В соответствии со всеми аспектами пораженная ткань может находиться в одном участке организма (например, в случае локализованной плотной опухоли) или может находиться в различных участках (например, когда при артрите поражены несколько суставов, или в случае рассредоточенных злокачественных опухолей или метастазирующего рака).

Пораженная ткань, в которую осуществляют нацеливание, может находиться в мягких тканях, в

кальцифицированных тканях или в нескольких участках, которые могут все находиться в мягких тканях, в кальцифицированных тканях или могут включать, по меньшей мере, один участок мягких тканей и/или, по меньшей мере, один участок кальцифицированных тканей. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения нацеливание осуществляют, по меньшей мере, в один участок мягких тканей. Участки, в которые осуществляют нацеливание, и участки возникновения заболевания могут быть одинаковыми или же могут быть различными (например, в случае специфического нацеливания в метастазы). В случае нацеливания в несколько участков нацеливание может осуществляться в участок возникновения заболевания или в несколько вторичных участков.

При использовании в настоящем документе термин "мягкая ткань" означает ткани, не имеющие "твердой", минерализованной матрицы. В частности, при использовании по тексту настоящего документа термин "мягкая ткань" может означать любые ткани, не являющиеся тканями скелета. Соответственно, при использовании по тексту настоящего документа термин "заболевание в мягких тканях" означает заболевание, возникшее в "мягких тканях" в соответствии с определением в настоящем документе. В частности, настоящее изобретение может применяться для лечения различных видов рака, таким образом, термин "заболевание в мягких тканях" включает карциномы, саркомы, миеломы, лейкемии, лимфомы и раки смешанного типа, которые возникают в любых мягких (т.е. неминерализованных) тканях, а также другие нераковые заболевания таких тканей. Злокачественные "заболевания в мягких тканях" включают плотные опухоли, возникающие в мягких тканях, а также метастатические и микрометастатические опухоли. В самом деле, заболевания в мягких тканях могут включать первичную плотную опухоль мягкой ткани и, по меньшей мере, одну метастатическую опухоль мягкой ткани у одного и того же пациента. В качестве альтернативы, "заболевание в мягких тканях" может представлять собой лишь первичную опухоль или лишь метастазы, когда первичная опухоль находится в тканях скелета. В частности, заболеваниями, лечение которых может осуществляться в соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения, или при которых осуществляют нацеливание на ткань комплекса тория в соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения, являются гематологические опухоли, в особенности, неопластические заболевания лимфоцитов, например, лимфомы и лимфоидные лейкозы, включая неходжкинскую лимфому, В-клеточные неоплазмы или В-клеточные лимфомы. Аналогичным образом, заболеваниями, лечение которых может осуществляться в соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения, или при которых осуществляют нацеливание на ткань комплекса тория в соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения, являются любые неопластические заболевания костного мозга, позвоночника (в особенности, спинного мозга), лимфатических узлов и/или клеток крови.

Некоторые примеры В-клеточных опухолей, лечение которых может осуществляться в соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения, или при которых осуществляют нацеливание на ткань комплекса тория в соответствии с аспектами настоящего изобретения, включают следующие заболевания: хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарная лимфома (например, макроглобулинемия Вальденстрёма), лимфома маргинальной зоны селезенки, плазмоклеточные опухоли (например, плазмоклеточная миелома, плазмочитома, болезни накопления моноклонального иммуноглобулина, болезни тяжелых цепей), экстранодальная В-клеточная лимфома из клеток краевой зоны (лимфома MALT-типа), узловая В-клеточная лимфома из клеток краевой зоны (УЛККЗ), фолликулярная лимфома, мантийноклеточная лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, В-клеточная крупноклеточная лимфома средостения (тимуса), внутрисосудистая крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная лимфома серозных полостей и лимфома/лейкоз Беркитта.

Некоторые примеры опухолей, лечение которых может осуществляться с использованием агента, нацеленного на FGFR2, по настоящему изобретению, включают опухоли, в которых с возникновением и развитием опухоли связаны мутационные события, включая рак молочной железы, рак эндометрия и желудочно-кишечного тракта.

Некоторые примеры опухолей миелоидного происхождения, лечение которых может осуществляться с использованием агента, нацеленного на CD33, по настоящему изобретению, включают острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Другие примеры опухолей, лечение которых может осуществляться с использованием агента, нацеленного на простатический специфический мембранный антиген (PSMA), по настоящему изобретению, включают раки предстательной железы и мозга.

Другие примеры опухолей, лечение которых может осуществляться с использованием агента, нацеленного на рецептор эпидермального фактора роста 2 типа (HER-2), по настоящему изобретению, включают раки молочной железы.

Другие примеры опухолей, лечение которых может осуществляться с использованием агента, нацеленного на мезотелин, по настоящему изобретению, включают такие злокачественные опухоли как рак мезотелиома, рак яичников, легких и поджелудочной железы.

Основным фактором, влияющим на эффективность настоящего изобретения, является стабильность конъюгатов антител при хранении в течение определенных периодов. Таким образом, стабильность нерадиоактивных конъюгатов антител и конечного лекарственного продукта, меченного торием, должна

соответствовать строгим критериям, которые предъявляются при производстве и распространении радиофармацевтических продуктов. Неожиданно было обнаружено, что препаративная форма, описанная в настоящем документе, содержащая нацеленный на ткань фрагмент, демонстрирует прекрасную стабильность при хранении. Это справедливо даже для высоких температур, которые используют, как правило, при ускоренных исследованиях стабильности.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, который применим ко всем сочетаемым аспектам изобретения, нацеленный на ткань комплекс может быть растворен в соответствующем буфере. В частности, было обнаружено, что при применении цитратного буфера получают необычайно стабильную препаративную форму. Предпочтительно используется цитратный буфер в диапазоне 1-100 мМ (значение pH 4-7), в частности, в диапазоне 10-50 мМ, наиболее предпочтительно цитратный буфер в диапазоне 20-40 мМ.

В соответствии с еще одним из вариантов осуществления изобретения, который применим ко всем сочетаемым аспектам изобретения, нацеленный на ткань комплекс может быть растворен в соответствующем буфере, содержащем парааминоасляную кислоту (ПАВА). Предпочтительной комбинацией является цитратный буфер (предпочтительно при концентрациях, описанных в настоящем документе) в комбинации с ПАВА. Предпочтительные концентрации для ПАВА для применения в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения, в том числе в комбинации с другими агентами, составляют приблизительно 0,005-5 мг/мл, предпочтительно 0,01-1 мг/мл, более предпочтительно 0,01-1 мг/мл. Концентрации в диапазоне 0,1-0,5 мг/мл являются наиболее предпочтительными.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения, который применим ко всем сочетаемым аспектам изобретения, нацеленный на ткань комплекс может быть растворен в соответствующем буфере, содержащем этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA). Предпочтительной комбинацией является применение EDTA с цитратным буфером. Особенно предпочтительной комбинацией является применение EDTA с цитратным буфером в присутствии ПАВА. Предпочтительным в таких комбинациях является то, что цитрат, ПАВА и EDTA (в зависимости от конкретного случая) будут присутствовать в диапазонах концентрации и предпочтительных диапазонах концентрации, указанных в настоящем документе. Предпочтительные концентрации для EDTA для применения в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения, в том числе в комбинации с другими агентами, составляют приблизительно 0,02-200 мМ, предпочтительно 0,2-20 мМ, более предпочтительно 0,05-8 мМ.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения, который применим ко всем сочетаемым аспектам изобретения, нацеленный на ткань комплекс может быть растворен в соответствующем буфере, содержащем, по меньшей мере, один полисорбат (PEG привитый эфир сорбита и жирной кислоты).

Предпочтительные полисорбаты включают полисорбат 80 (полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеат), полисорбат 60 (полиоксиэтилен (20) сорбитан моностеарат), полисорбат 40 (полиоксиэтилен (20) сорбитан монопальмитат), полисорбат 80 (полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат) и их смеси. Наиболее предпочтительным полисорбатов является полисорбат 80 (P80). Предпочтительные концентрации для полисорбата (в особенности, для предпочтительных полисорбатов, указанных в настоящем документе) для применения в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения, в том числе в комбинации с другими агентами, составляют приблизительно 0,001-10 мас./об.%, предпочтительно 0,01-1 мас./об.%, более предпочтительно 0,02-0,5 мас./об.%.

Несмотря на то, что ПАВА уже была описана в качестве радиостабилизатора (см. US 4880615 A), положительный эффект ПАВА в настоящем изобретении наблюдался при хранении нерадиоактивного конъюгата. Такой стабилизирующий эффект в отсутствие радиолитического состава особенно неожиданное преимущество, так как синтез нацеленного на ткань хелатора, как правило, будет происходить в основном до контактирования с ионом тория. Таким образом, нацеленный на ткань хелатор может быть получен от одного часа до трех лет до контакта с ионом тория и предпочтительно будет храниться в контакте с ПАВА в течение, по меньшей мере, части этого периода. Другими словами, этапы а) и б) по настоящему изобретению могут осуществляться от одного часа до трех лет до этапа с) и между этапами б) и с), нацеленный на ткань хелатор может храниться в контакте с ПАВА, в частности, в буфере, например, в цитратном буфере и, в некоторых случаях, вместе с EDTA и/или полисорбатов. Предпочтительные типы и концентрации материалов указаны в настоящем документе. Таким образом, ПАВА является особенно предпочтительным компонентом препаративных форм по изобретению и может обеспечить долговременную стабильность для нацеленного на ткань хелатора и/или для нацеленного на ткань комплекса тория. На фиг. 1 показан эффект ПАВА в системе по настоящему изобретению.

Применение цитратного буфера в соответствии с описанием в настоящем документе обеспечивает неожиданные преимущества в отношении стабильности нацеленного на ткань комплекса тория в препаративных формах по настоящему изобретению. Исследование облучения на эффект растворов буфера при получении пероксида водорода осуществлялось авторами настоящего изобретения, при этом были получены неожиданные результаты. Известно, что пероксид водорода образуется в результате радиолитического воды и способствует химическому модифицированию белковых конъюгатов в растворе. Таким образом, образование пероксида водорода оказывает нежелательный эффект на чистоту и стабильность продукта.

На фиг. 2 показано, что неожиданно наблюдались меньшие уровни пероксида водорода при измерениях в растворах конъюгата антитела НОРО по настоящему изобретению, которые облучались Со-60 (10 кГр) в цитратном буфере по сравнению со всеми другими исследуемыми буферами. Таким образом, препаративная форма по настоящему изобретению предпочтительно содержит цитратный буфер в соответствии с описанием в настоящем документе.

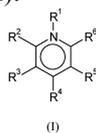
В дополнение, авторами настоящего изобретения было обнаружено неожиданные результаты в отношении комбинированного эффекта определенных компонентов в препаративных формах по настоящему изобретению. Опять же, это относится к стабильности радиомеченного конъюгата. Целью исследования была оценка стабильности конъюгата  $^{227}\text{Th}$ -AGC1118 (см. ниже) в ходе хранения. Осуществляли анализ связывания с помощью инфракрасной флуоресценции с использованием  $^{227}\text{Th}$ -AGC1118 при специфической активности приблизительно 8000 Бк/мкг. Были получены пять различных растворов для хранения для  $^{227}\text{Th}$ -AGC1118, с использованием 30-100 мМ цитратного буфера, или 30 мМ цитратного буфера с добавлением 0,02, 0,2 или 2 мг/мл РАВА, значение рН 5,5. На фиг. 3 показан значительный положительный эффект в отношении радиостабильности препаративных форм по настоящему изобретению, в частности, при комбинировании с цитратом и/или РАВА в диапазонах, указанных в настоящем документе. При проведении вышеуказанного исследования было обнаружено, что цитрат является наиболее эффективным буфером; неожиданно также было обнаружено, что такой эффект усиливался при добавлении РАВА.

Ключевым компонентом способов, комплексов и препаративных форм по настоящему изобретению является фрагмент октадентатного хелатора. Самая близкая по тематике работа в отношении образования комплексов ионов тория с лигандами гидроксипиридинона была опубликована как WO 2011/098611, в ней описана относительная простота получения комплексов ионов тория с октадентатными НОРО-содержащими лигандами.

Ранее известные хелаторы для тория также включают полиаминополикислотные хелаторы, которые включают неразветвленный, циклический или разветвленный полиазаалканый каркас с кислотными (например, карбоксиалкильными) группами, присоединенными к атомам азота в каркасе. Примеры таких хелаторов включают производные DOTA, такие как п-изотиоцианатобензил-1,4,7,10-тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (p-SCN-Bz-DOTA), и производные ДТРА, такие как п-изотиоцианатобензил-диэтилентриаминпентауксусная кислота (p-SCN-Bz-ДТРА), производные DOTA являются циклическими хелаторами, производные ДТРА являются неразветвленными хелаторами.

Примеры производных 1,4,7,10-тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты были приведены ранее, однако стандартные способы не могут быть просто использованы для хелатного связывания тория с производными DOTA. При нагревании производного DOTA с использованием металла осуществляют эффективное получение хелата, однако зачастую с малым выходом. В ходе этой процедуры может происходить необратимая денатурация, по меньшей мере, части лиганда. Кроме того, из-за сравнительно высокой подверженности необратимой денатурации, в целом, необходимо избегать прикрепления нацеленного фрагмента до завершения всех этапов нагревания. Для этого требуется дополнительный химический этап (со всей необходимой обработкой и сепарацией), который должен осуществляться в течение периода распада изотопа тория, излучающего альфа-частицы. Очевидно, предпочтительно не осуществлять обработку материала, излучающего альфа-частицы, таким образом и не производить соответствующие отходы сверх необходимого уровня. Кроме того, в течении времени, которое затрачивается на получение конъюгата, теряется часть тория, распад которого будет происходить в течение такого периода подготовки.

Ключевым аспектом настоящего изобретения во всех отношениях является применение соответствующего октадентатного лиганда, в частности, соответствующего октадентатного гидроксипиридинон-содержащего лиганда, включающего четыре НОРО фрагмента. Такие лиганды, как правило, содержат, по меньшей мере, четыре хелатообразующих группы, каждая из которых независимо друг от друга имеет следующую структуру замещенного пиридина (I):



где  $\text{R}^1$  может означать алкильную группу, такую как  $\text{C}_1$ - $\text{C}_5$ -алкильные группы с неразветвленной или разветвленной цепью, включая метил, этил, н- или изопропил и н-, втор- изо- или трет-бутил. Предпочтительно,  $\text{R}^1$  может представлять собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ , в особенности, метил. В соответствии с настоящим изобретением на атоме азота всех четырех фрагментов формулы (I) присутствует металлический заместитель.

Алкильные группы, упоминаемые по тексту настоящего документа, представляют собой, как правило,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкильные группы с неразветвленной или разветвленной цепью, такие как метил, этил, н- или изопропил, н-, изо- трет- или втор-бутил и т.д.

В некоторых опубликованных ранее изобретениях, таких как WO 2013/167756, WO 2013/167755 и

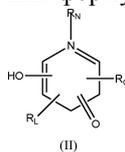
WO 2013/167754, группа, соответствующая  $R^1$ , ранее представляла собой растворяющую группу, такую как гидроксильная или гидроксильный алкил (например,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$  и т.д.). Это имеет определенные преимущества в отношении более высокой растворимости, однако такие хелаторы с трудом присоединяются к нацеленным фрагментам с использованием амидных связей из-за реактивной способности в  $R^1$ -положении. Таким образом, в настоящем изобретении  $R^1$  не является гидроксильной или гидроксильным алкилом.

В формуле (I), группы  $R^2$ - $R^6$  могут быть независимо друг от друга выбраны из H, OH, =O, соединительного фрагмента и линкерного фрагмента. Предпочтительно, в точности одна из групп  $R^2$ - $R^6$  будет =O, и одна из групп  $R^2$ - $R^6$  будет OH. Остальные три группы из групп  $R^2$ - $R^6$  могут представлять собой H, однако, по меньшей мере, одна из групп  $R^2$ - $R^6$  будет представлять собой линкерный фрагмент и/или соединительный фрагмент. Соединительный фрагмент описан ниже по тексту настоящего документа, однако он заканчивается карбоновой кислотой для прикрепления амидной связи к нацеленному фрагменту. Такой соединительный фрагмент может прикрепляться непосредственно к кольцу в одной из групп  $R^2$ - $R^6$ , однако более предпочтительно он прикрепляется к линкерному фрагменту, который сам по себе будет представлять одну из групп  $R^2$ - $R^6$ .

В соответствии с настоящим изобретением все четыре фрагмента октадентатного лиганда, как показано выше, входящие в состав комплекса, представляют собой 3,2-НОРО фрагменты.

Соответствующие хелатообразующие фрагменты могут быть образованы с использованием способов, известных специалистам, включая способы, описанные в документах US 5624901 (например, примеры 1 и 2) и WO 2008/063721 (которые включены в настоящую заявку посредством ссылки).

Хелатообразующие группы включают группы формулы (II) ниже



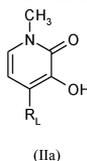
В приведенной выше формуле (II), фрагмент =O представляет собой оксо-группу, прикрепленную к любому атому углерода на пиридиновом кольце, -OH представляет собой гидроксильный фрагмент, прикрепленный к любому атому углерода на пиридиновом кольце, а  $-R_L$  представляет собой линкерный фрагмент, который прикрепляет фрагмент гидроксипиридинона к другим фрагментам, входящим в состав комплекса, для образования общего октадентатного лиганда. Любой линкерный фрагмент, который описан в настоящем документе, может использоваться в качестве  $R_L$ , включая короткие гидрокарбильные группы, такие как  $C_1$ - $C_8$ -гидрокарбил, включая  $C_1$ - $C_8$ -алкил, алкенил или алкинил группы, включая метил, этил, пропил, бутил, пентил и/или гексил группы всех топологий.  $R_L$  может присоединяться к кольцу формулы (II) через любой атом углерода в пиридиновом кольце. Затем  $R_L$  группы в свою очередь могут связываться непосредственно с другим хелатообразующим фрагментом, с другой линкерной группой и/или к центральному атому или группе, например, с кольцом или с другой матрицей. Линкеры, хелатообразующие группы и, при необходимости, матричные фрагменты выбираются таким образом, чтобы образовывать соответствующий октадентатный лиганд.

$R_C$  представляет собой соединительный фрагмент, в соответствии с описанием ниже. Соответствующие фрагменты включают гидрокарбильные группы, такие как алкильные или алкенильные группы, заканчивающиеся группой карбоновой кислоты. Авторами настоящего изобретения было установлено, что при применении линкерного фрагмента с карбоновой кислотой для образования амида, например, с использованием способов настоящего изобретения, обеспечивается более стабильная конъюгация между хелатором и нацеленным на ткань фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением фрагменты -OH и =O формулы II располагаются на прилежащих атомах пиридинового кольца, таким образом, производная 3,2-гидроксипиридинона является очень пригодной. Группа  $R_N$  представляет собой метильный заместитель.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением в структуре октадентатного лиганда присутствуют четыре фрагмента 3,2-гидроксипиридинона.

Следовательно, хелатообразующими группами являются группы формулы (IIa)



При использовании по тексту настоящего документа термин "линкерный фрагмент" ( $R_L$  в формуле (II) и формуле (IIa)) означает химический структурный элемент, служащий для присоединения, по меньшей мере, двух хелатообразующих групп в октадентатных лигандах, которые являются ключевым компонентом в различных аспектах настоящего изобретения. Линкерные фрагменты также могут присоединяться к соединительному фрагменту, который служит для присоединения октадентатного лиганда к нацеленному на ткань фрагменту. Как правило, каждая хелатообразующая группа (например, вышеуказан-



лентная функциональная группа. Предпочтительные мостиковые фрагменты включают все группы, указанные в настоящем документе в качестве соответствующих линкерных фрагментов.

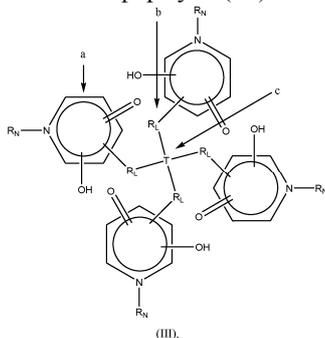
Предпочтительные нацеленные фрагменты включают все фрагменты, описанные в настоящем документе, а предпочтительные реактивные X группы включают любые группы, способные выступать в качестве "карбоновой кислоты" при образовании амидной ковалентной связи к нацеленному фрагменту, включая, например, -COOH, -SH, -NHR и группы, где R из NHR может представлять собой H или любые короткие гидрокарбильные группы, описанные в настоящем документе. Особенно предпочтительные группы для присоединения к нацеленному фрагменту включают эпсилон-амины остатков лизина. Помимо прочего, примеры соответствующих реактивных X групп включают N-гидроксисукцимидил эфиры, имидоэфиры, ацилгалогениды, N-малеимиды и альфа-галоацетил.

В соответствии с настоящим изобретением выбранный мостиковый фрагмент  $R^7$  представляет собой соответствующий замещенный арил, а выбранный соединительный фрагмент ( $R_C$ ), который присоединяет октадентатный лиганд к нацеленному фрагменту, представляет собой  $[-C(=O)-CH_2CH_2-X-]$ , где свободная карбоксилатная группа на НОРО лиганде активируется *in situ* в форме N-гидроксисукцинимид эфира в водном растворе непосредственно перед конъюгацией с нацеленным фрагментом.

Соединительный фрагмент предпочтительно присоединяется таким образом, чтобы полученный сопряженный октадентатный лиганд мог использоваться при образовании стабильных комплексов иона металла. Таким образом, соединительный фрагмент предпочтительно соединяется с линкером, матрицей или хелатообразующим фрагментом в таком участке, где он в значительной степени не препятствует образованию комплекса. Такой участок предпочтительно находится на линкере или матрице, более предпочтительно в положении, удаленном от поверхности, присоединяющейся к цели.

Каждый фрагмент формулы (I) или (II) или (IIa) в октадентатном лиганде может присоединяться к оставшейся части лиганда с помощью соответствующей линкерной группы, как было указано в настоящем документе, в любой соответствующей топологии. Например, четыре группы формулы (I) и/или (II) и/или (IIa) могут присоединяться своими линкерными группами к каркасу с образованием неразветвленного лиганда, или могут присоединяться мостиковой связью с помощью линкерной группы с образованием структуры "олигомерного" типа, которая может быть неразветвленной или циклической. В качестве альтернативы, лигандные фрагменты формул (I) и/или (II) и/или (IIa) могут присоединяться в крестовой или звездообразной топографии к центральному атому или группе, при этом каждый из фрагментов присоединяется с помощью линкера (например, с помощью " $R_L$ " фрагмента). Линкерные ( $R_L$ ) фрагменты могут присоединяться исключительно через углерод-углеродные связи или могут соединяться друг с другом или с другими хелатообразующими группами, с каркасом, матрицей, соединительным фрагментом или другим линкером с помощью любой достаточно устойчивой функциональной группы, включая амин, амид, простой эфир или тиоэфирную связь.

Звездообразное расположение показано на формуле (III) ниже



где все обозначения групп и положений соответствуют описаниям выше, а "Т" дополнительно означает центральный атом или группу матрицы, например, атом углерода, гидрокарбильную цепь (например, любую из цепей, описанных выше), алифатическое или ароматическое кольцо (включая гетероциклические кольца) или систему конденсированного кольца. Простейшей матрицей является один атом углерода, который затем присоединяется к каждому из хелатообразующих фрагментов с помощью их соединительных групп. Кроме того, также возможны более длинные цепи, например, этил или пропил, с двумя хелатообразующими фрагментами, присоединенными к каждому концу матрицы. Очевидно, что могут использоваться любые достаточно устойчивые связи для соединения матрицы и линкерных фрагментов, включая углерод-углеродные связи, сложные эфиры, простые эфиры, амины, амиды, тиоэфирные или дисульфидные связи.

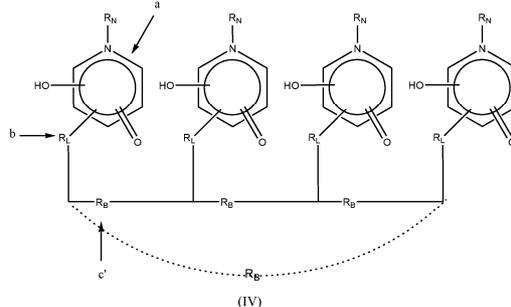
Очевидно, что в структурах формулы (II), (III), (IV) и (IVb) положения в пиридинном кольце, которые не являются замещенными иным образом (например, с помощью линкерного или соединительного фрагмента), могут в соответствующих случаях нести заместители, описанные для  $R^1-R^5$  в формуле (I). В частности, в любом положении могут присутствовать малые алкильные заместители, например, метиловые, этиловые или пропиловые группы.

Кроме того, октадентатный лиганд дополнительно будет содержать, по меньшей мере, один соеди-

нительный фрагмент в соответствии с описанием выше. Это может быть любая соответствующая структура, включая любые структуры, указанные в настоящем документе, при этом вместе с нацеленным фрагментом он будет оканчиваться конечным комплексом или карбоновой кислотой в соответствии со способами по настоящему изобретению.

Соединительный фрагмент может присоединяться к любой соответствующей точке линкера, матрицы или хелатообразующего фрагмента, например, к точкам a, b и/или c, как указано в формуле (III). Для присоединения соединительного фрагмента могут использоваться любые достаточно устойчивые связи, например, углерод-углеродные связи, сложные эфиры, простые эфиры, амины, амиды, тиоэфирные или дисульфидные связи. Аналогичным образом, группы, способные образовывать такие любые связи с нацеленным фрагментом, могут использоваться в качестве функционального окончания соединительного фрагмента, таким образом, указанный фрагмент будет оканчиваться такими группами при присоединении к нацеленной части.

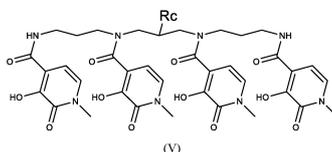
Альтернативная структура "каркасного" типа демонстрируется формулой (IV) ниже



где все обозначения групп и положений соответствуют описаниям выше, а "R<sub>B</sub>" дополнительно означает каркасный фрагмент, который, как правило, будет иметь схожую структуру и функцию с любым из линкерных фрагментов, описанных в настоящем документе, таким образом, если позволяет контекст, любое определение линкерного фрагмента может применяться для каркасного фрагмента. Соответствующие каркасные фрагменты образуют скаффолд, к которому прикрепляются хелатообразующие фрагменты с помощью своих линкерных групп. Обычно требуются три или четыре каркасных фрагмента. Как правило, требуются три фрагмента для линейного каркаса или четыре фрагмента, если каркас циклический. Особенно предпочтительные каркасные фрагменты включают короткие углеводородные цепи (такие, например, как описано в настоящем документе), при необходимости, имеющие гетероатом или функциональный фрагмент на одном из концов или на обоих концах. В этом отношении особенно подходящими являются аминные и амидные группы.

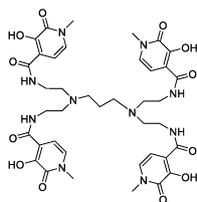
Соединительный фрагмент может присоединяться к любой соответствующей точке линкера, каркаса или хелатообразующего фрагмента, например, к точкам a, b и/или c, как указано в формуле (IV). Для присоединения соединительного фрагмента могут использоваться любые достаточно устойчивые связи, например, углерод-углеродные связи, сложные эфиры, простые эфиры, амины, амиды, тиоэфирные или дисульфидные связи. Аналогичным образом, группы, способные образовывать такие любые связи с нацеленным фрагментом, могут использоваться в качестве функционального окончания соединительного фрагмента, таким образом, указанный фрагмент будет оканчиваться такими группами при присоединении к нацеленной части.

Примером октадентатного лиганда каркасного типа с четырьмя хелатообразующими 3,2-НОРО фрагментами, прикрепленными к каркасу с помощью амидной линкерной группы, будет лиганд следующей формулы (V):



Очевидно, что соединительный фрагмент R<sub>C</sub> может присоединяться в любой соответствующей точке на этой молекуле, например, к одной из вторичных аминных групп или к точке разветвления на любой из алкильных групп каркаса. Предпочтительный участок для группы R<sub>C</sub> показан в формуле (V). R<sub>C</sub> будет оканчиваться карбоновой кислотой или будет присоединяться с помощью амидной связи к нацеленному на ткань фрагменту в соответствующих аспектах изобретения. Все малые алкильные группы, такие как группа пропилена в каркасе или группа n-замещающего этилена, могут быть замещены другими малыми алкиленами, например, любыми алкиленами, описанными в настоящем документе (из таких алкиленов особенно подходящими являются метилен, этилен, пропилен и бутилен).

Примерами октадентатных лигандов "матричного" типа, у каждого из которых имеются четыре хелатообразующих 3,2-НОРО фрагмента, присоединенных этиламидными группами к этил- и пропилидиамину, соответственно, будут лиганды следующей формулы (VI):

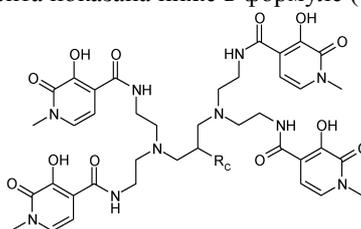


(VI)

Очевидно, что любая из алкильных групп, показанных в формуле (VI) в качестве этиленовых фрагментов, может быть независимо замещена другими малыми алкиленовыми группами, такими как метилен, пропилен или n-бутилен. Преимущественно должна сохраняться симметрия, таким образом предпочтительной является центральная пропиленовая  $C_3$  цепь, в то время как остальные этиленовые группы остаются, или два этилена, присоединяющие НОРО фрагменты к одному или к обоим центральным третичным аминам, могут быть замещены метиленом или пропиленом.

В формуле (VIb) показано возможное положение для соединительного фрагмента  $R_C$ , который будет присутствовать в формуле (VI) в любом подходящем положении, например, группа  $-CH-$ .

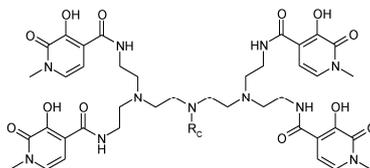
Как указано выше, октадентатный лиганд, как правило, будет включать соединительный фрагмент, который может присоединяться к остальной части лиганда в любой точке. Подходящая точка для присоединения соединительного фрагмента показана ниже в формуле (VIb)



(VIb)

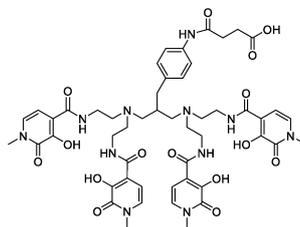
где  $R_C$  означает любой соответствующий соединительный фрагмент, в частности, для присоединения к нацеленной на ткань группе с помощью амидной группы. В качестве группы  $R_C$  в формуле (VIb) и по всему тексту настоящего документа особенно подходящей является короткая гидрокарбильная группа, например,  $C_1$ - $C_8$  циклическая, разветвленная или прямоцепочечная ароматическая или алифатическая группа, заканчивающаяся кислотной или эквивалентной активной группой, для присоединения амида к нацеленному на ткань фрагменту.

Примеры матриц также включают другие матрицы, в которых соединительная группа  $R_C$  ковалентно связана с атомом азота в амино-каркасе, как показано в формуле (VII)

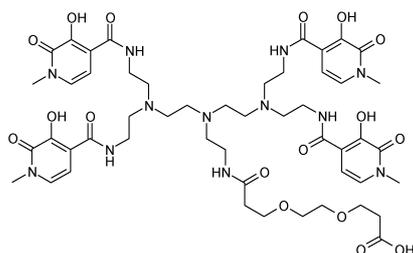


(VII)

Октадентатные лиганды, в которых имеются подходящие участки присоединения лигандов, включают лиганды формул (VIII) и (IX) ниже



(VIII)



(IX)

Синтез соединения (VIII) описан далее по тексту настоящего документа, он соответствует пути синтеза, который также описан ниже в настоящем документе.

AGC0019 и соединения формул (VI), (VIb), (VII), (VIII) и (IX) являются октадентатными хелаторами с линкерными фрагментами, оканчивающимися группами карбоновой кислоты. Октадентатные лиганды, показанные в этих структурах, а также показанные линкерные фрагменты также являются примерами их типа и могут объединяться в любой комбинации. Такие комбинации будут очевидны специалистам.

Этап а) способа по настоящему изобретению может осуществляться с использованием любого подходящего пути синтеза. Как правило, это будет включать присоединение четырех соответствующих НО-РО фрагментов (например, фрагментов формул (I) и/или (II) и/или (IIa)) с помощью линкерной группы к соединительному фрагменту, при необходимости, с помощью матрицы. Все эти группы описаны в настоящем документе; в этом контексте предпочтительные варианты осуществления изобретения являются равно предпочтительными. Соединение между НОРО фрагментами, линкерами, соединительным фрагментом и, при необходимости, матрицей, как правило, осуществляют с помощью устойчивой группы, такой как амид, амин, простой эфир или углерод-углеродная связь. Способы синтеза таких связей, а также любые необходимые защитные стратегии хорошо известны специалистам в области синтетической химии. Некоторые специфические примеры способов синтеза приведены ниже в разделе "Примеры". Далее приведены специфические примеры таких способов, однако проиллюстрированные способы синтеза также могут использоваться специалистами в данной области в общем контексте. Таким образом, подразумевается, что способы, проиллюстрированные в разделе "Примеры", приведены для общего описания и, если позволяет контекст, могут применяться ко всем аспектам и вариантам осуществления изобретения.

Предпочтительно, чтобы комплексы излучающего альфа-частицы тория и октадентатный лиганд в соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения могли быть получены без нагревания до температуры свыше 60°C (например, без нагревания до температуры свыше 50°C), предпочтительно без нагревания до температуры свыше 38°C, наиболее предпочтительно без нагревания до температуры свыше 25°C (например, получены при температуре в диапазоне 20-38°C). Обычными температурными диапазонами являются, например, 15-50°C или 20-40°C. Реакция комплексообразования (часть с)) в соответствии со способом по настоящему изобретению) может осуществляться в течении любого подходящего периода, однако предпочтительно такой период составляет 1-120 мин, предпочтительно 1-60 мин, более предпочтительно 5-30 мин.

Кроме того, предпочтительно, чтобы конъюгат нацеленного фрагмента и октадентатного лиганда был получен до добавления излучающего альфа-частицы изотопа тория (иона  $^{227}\text{Th}^{4+}$ ). Таким образом, продукты по изобретению получают или могут быть получены путем комплексообразования с использованием излучающего альфа-частицы изотопа тория (иона  $^{227}\text{Th}^{4+}$ ) с помощью конъюгата октадентатного лиганда и нацеленного на ткань фрагмента (нацеленного на ткань хелатора).

Различные типы нацеленных соединений могут быть соединены с торием (торием-227) через октадентатный хелатор (включающий соединительный фрагмент в соответствии с описанием в настоящем документе). Нацеленный фрагмент может быть выбран из известных нацеленных групп, которые включают моноклональные или поликлональные антитела, факторы роста, пептиды, гормоны и аналоги гормонов, производные фолатов, биотин, авидин и стрептавидин или их аналоги. Прочие возможные нацеленные группы включают соответствующие функционализированные РНК, ДНК или их фрагменты (например, аптамеры), олигонуклеотиды, углеводы, липиды или соединения, полученные путем объединения таких групп как с использованием белков, так и без белков, и т.д. Как было указано выше, могут быть включены PEG фрагменты, для повышения биологического времени удержания и/или для уменьшения иммуностимуляции.

В целом, при использовании по тексту настоящего документа нацеленные на ткань фрагменты могут представлять собой пептиды или белки, а именно структуры, которые первично образуются из амидного каркаса между аминокислотными компонентами, как с вторичными и третичными структурными признаками, так и без них.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения нацеленный на ткань фрагмент может исключать антитела и фрагменты антител, конъюгированные с остеотропами, липосомами и фолатами.

В соответствии с настоящим изобретением комплекс с  $^{227}\text{Th}$  может быть образован с использованием нацеленных комплексообразующих агентов, которые присоединены или могут быть присоединены с помощью амидной связи к нацеленным на ткань фрагментам в соответствии с описанием в настоящем документе. Как правило, нацеленные фрагменты имеют молекулярную массу в диапазоне от 100 г/моль до нескольких миллионов г/моль (в частности, от 100 г/моль до 1 млн. г/моль) и предпочтительно имеют аффинность непосредственно в отношении связанного с заболеванием рецептора и/или включают соответствующий предварительно вводимый связывающий фрагмент (например, биотин или авидин), связанный с молекулой, которая нацелена на заболевание, перед введением  $^{227}\text{Th}$ .

Соответствующие нацеленные фрагменты могут включать поли- и олигопептиды, белки, фрагмен-

ты ДНК и РНК, аптамеры и т.д., предпочтительно белок, например, авидин, стрептавидин, поликлональное или моноклональное антитело (включая антитела типа IgG и IgM) или смесь белков или фрагментов или конструкторов белка. Особенно предпочтительными могут являться антитела, конструкторы антител, фрагменты антител (например, фрагменты Fab или любые фрагменты, включающие, по меньшей мере, одну антиген-связывающую область, конструкторы фрагментов (например, одноцепочечные антитела) или их смеси. Соответствующие фрагменты, в частности, включают Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' и/или scFv. Конструкторы антител могут быть конструкторами любых антител или фрагментов, указанных в настоящем документе.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, относящимся к нацеливанию, который применим ко всем аспектам изобретения, выбранный специфический связывающий фрагмент (нацеленный на ткань фрагмент) может быть нацелен в рецептор CD22. Таким нацеленным на ткань фрагментом может являться пептид, имеющий сходство или идентичность последовательности, по меньшей мере, с одной из приведенных ниже последовательностей.

Легкая цепь:

Мышиная DIQLTQSPSSLAVSAGENVTMSCKSSQSVLYSANHKNYLAWYQQ  
 KPGQSP  
 Гуманизированная -----SA-V-DR-----KA  
 Мышиная KLIIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDETLTISR VQVEDLAIYYCHQ  
 YLSS  
 Гуманизированная -----S-S-----F--SL-P-I-T-----  
 Мышиная WTFGGGTKLEIKR (SeqID1)  
 Гуманизированная ----- (SeqID2)

Тяжелая цепь:

Мышиная QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFISYWLHWIKRPRGQG  
 LEWIG  
 Гуманизированная 1 ----Q---VK---S---V-----VR-A-----  
 H'ised2 ----VQ---VK---S---V-----VR-A-----  
 Мышиная YINPRNDYTEYNQNFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY  
 YCAR  
 H'ised1 -----I---E-TN---E---R---T-F-F---  
 H'ised2 -----I---E-TN---E---R---T-F-F---  
 Мышиная RDITTFYWGQGTTLTVSS (SeqID3)  
 H'ised1 -----V---- (SeqID4)  
 H'ised2 -----V---- (SeqID5)

В приведенных выше последовательностях "-" в гуманизированных (H'ised) последовательностях означает, что остаток неизменен относительно мышиной последовательности.

Предполагается, что в приведенных выше последовательностях (SeqID1-5) участки, выделенные жирным шрифтом, являются ключевыми специфическими связывающими участками (CDR), участки с подчеркиванием являются участками вторичного значения при связывании, а невыделенные участки представляют собой скорее структурные участки, чем специфические связывающие участки.

Нацеленный на ткань фрагмент может иметь последовательность со значительной идентичностью или сходством последовательности, по меньшей мере, с одной из последовательностей SeqID1-5. Значительная идентичность/сходство последовательности означает, что последовательность имеет, по меньшей мере, 80% идентичность последовательности относительно полной длины последовательности и/или, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности со специфическими связывающими участками (участками, выделенными жирным шрифтом, и, в некоторых случаях, участками с подчеркиванием, которые указаны выше). Предпочтительное сходство последовательности или, более предпочтительно, - идентичность последовательности может быть, по меньшей мере, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% для участков, выделенных жирным шрифтом, и, предпочтительно, также для всей длины последовательности. Идентичность и/или сходство последовательности могут определяться с использованием программы BestFit пакета Genetics Computer Group, версия 10, Висконсинского университета. В программе используется местный алгоритм Смита-Ватермана со следующими параметрами по умолчанию: штраф на внесение делеции = 8, штраф на продолжение делеции = 2, среднее спаривание = 2,912, средняя ошибка спаривания = 2,003.

Нацеленный на ткань фрагмент может содержать более одной пептидной последовательности; в этом случае, по меньшей мере, одна, предпочтительно, все последовательности могут (независимо друг от друга) соответствовать вышеуказанным критериям по сходству последовательности, предпочтительно -идентичности последовательности с любой из последовательностей SeqID1-5.

Нацеленный на ткань фрагмент может иметь аффинность связывания для CD22, и в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения также может иметь последовательность приблизительно с 40 и менее вариациями относительно полного домена (предпочтительно от 0 до 30 вариаций). Такие вариации могут быть обусловлены вставками, удалениями и/или замещениями и могут быть смежными или несмежными относительно SeqID1-5. Замещения или вставки, как правило, представляют собой замещения или вставки, по меньшей мере, одной из 20 аминокислот генетического кода, при этом замеще-

ния, как правило, являются консервативными.

В соответствии со вторым вариантом осуществления изобретения, относящимся к нацеливанию, который применим ко всем аспектам изобретения, выбранный специфический связывающий фрагмент (нацеленный на ткань фрагмент) может быть нацелен в рецептор CD33. Такой нацеленный на ткань фрагмент может представлять собой моноклональное антитело и может быть выбран из линтузумаба и линтузумаба с дополнительным лизинным остатком на С-конце.

В соответствии с третьим вариантом осуществления изобретения, относящимся к нацеливанию, который применим ко всем аспектам изобретения, выбранный специфический связывающий фрагмент (нацеленный на ткань фрагмент) может быть нацелен в антиген HER-2. Нацеленный на ткань фрагмент может представлять собой моноклональное антитело и предпочтительно является трастузумабом.

Примеры других соответствующих последовательностей антител для нацеливания на FGFR2, мезотелин и PSMA приведены в разделе "Примеры". Тем не менее, специалистам очевидно, что в способах настоящего изобретения и, соответственно, для всех других аспектов потенциально возможно использование любой известной формы белка, которая нацелена на специфическую для заболевания мишень, и которая содержит остаток лизина в последовательности.

Ключевую важность в отношении компонента излучающего альфа-частицы тория имеет то, что недавно было обнаружено, что определенные альфа-радиоактивные изотопы тория (например,  $^{227}\text{Th}$ ) могут вводиться в таком количестве, которое одновременно является терапевтически эффективным и не вызывает непереносимой миелотоксичности. В соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения изотопом тория является торий-227 ( $^{227}\text{Th}$ ). При использовании по тексту настоящего документа термин "не вызывающий непереносимой миелотоксичности" означает (что особенно важно), что количества радия-223, которое получают в результате распада вводимого радиоизотопа тория-227, в целом недостаточно для того, чтобы явиться непосредственной причиной смерти пациента. Тем не менее, специалистам будет понятно, что степень повреждения костного мозга (и возможность летального исхода), которая будет приемлемым побочным эффектом такого лечения, будет значительно варьироваться в зависимости от типа заболевания, которое подвергается лечению, целей схемы лечения и прогноза заболевания для пациента. Несмотря на то, что в соответствии с настоящим изобретением пациентом предпочтительно является человек, настоящее изобретение может применяться также для лечения других млекопитающих, в частности, животных-компаньонов, таких как собаки; таким образом, степень повреждения костного мозга также зависит от биологического вида пациента. Приемлемая степень повреждения костного мозга, как правило, будет выше при лечении злокачественных заболеваний по сравнению с доброкачественными заболеваниями. Одним из наиболее известных параметров для измерения степени миелотоксичности является уровень нейтрофилов; в соответствии с настоящим изобретением количеством  $^{223}\text{Ra}$ , не вызывающим непереносимой миелотоксичности, как правило, будет такое контролируемое количество, чтобы доля нейтрофилов в самой низшей точке (максимальное снижение уровня) составляла не менее 10% от уровня нейтрофилов до лечения. Предпочтительно, не вызывающим непереносимой миелотоксичности количеством  $^{223}\text{Ra}$  будет такое количество, чтобы доля нейтрофилов составляла, по меньшей мере, 20% при максимальном снижении уровня, более предпочтительно - , по меньшей мере, 30%. Наиболее предпочтительной при максимальном снижении уровня является доля нейтрофилов, составляющая, по меньшей мере, 40%.

В дополнение, соединения, содержащие радиоактивный торий (например,  $^{227}\text{Th}$ ) могут применяться при высоких режимах дозирования, когда миелотоксичность образовавшегося радия (например,  $^{223}\text{Ra}$ ) при других обстоятельствах была бы непереносимой, и когда параллельно используется пересадка стволовых клеток или аналогичный метод восстановления. В таких случаях число нейтрофилов может снизиться до уровня менее 10% при максимальном снижении уровня, а в исключительных случаях - до 5% или, при необходимости, - до уровня менее 5%, при условии, что были приняты соответствующие меры предосторожности, и впоследствии была проведена пересадка стволовых клеток. Такие техники хорошо известны специалистам.

Изотопом тория, представляющим особый интерес в соответствии с настоящим изобретением, является торий-227, и, если позволяет контекст, торий-227 является изотопом при любом упоминании тория в настоящем документе. Торий-227 относительно просто получить, он может быть получен непосредственно из облученного нейтронами  $^{226}\text{Ra}$ , который будет содержать материнский нуклид  $^{227}\text{Th}$ , т.е.  $^{227}\text{Ac}$  ( $T_{1/2} = 22$  года). Актиний-227 может быть довольно просто отделен от цели  $^{226}\text{Ra}$  и использоваться в качестве генератора  $^{227}\text{Th}$ . При необходимости, данный процесс может осуществляться в промышленном масштабе, таким образом, можно избежать проблем с доставкой лекарств, которые возникают с большинством других альфа-излучающих нуклидов, которые рассматриваются в качестве кандидатов для использования в молекулярно-нацеленной терапии.

В результате распада тория-227 получают радий-223. В этом случае период полураспада первичного дочернего радионуклида составляет 11,4 дней. Из источника чистого  $^{227}\text{Th}$  в течение первых нескольких дней получают лишь умеренные количества радия. Тем не менее, потенциальная токсичность  $^{223}\text{Ra}$  выше, чем токсичность  $^{227}\text{Th}$ , так как после излучения альфа-частиц  $^{223}\text{Ra}$  в течение нескольких минут следует излучение излучения альфа-частиц тремя дочерними радионуклидами с коротким периодом по-

лураспада (см. табл. 2 ниже, в которой приведена цепочка распада для тория-227).

Таблица 2

Нуклид	Вид излучения	Среднее энергия частиц (МэВ)	Период полураспада
$^{227}\text{Th}$	$\alpha$	6.02	18.72 дней
$^{223}\text{Ra}$	$\alpha$	5.78	11.43 дней
$^{219}\text{Rn}$	$\alpha$	6.88	3.96 секунд
$^{215}\text{Po}$	$\alpha$	7.53	1.78 мс
$^{211}\text{Pb}$	$\beta$	0.45	36.1 минут
$^{211}\text{Bi}$	$\alpha$	6.67	2.17 минуты
$^{207}\text{Tl}$	$\beta$	1.42	4.77 минуты
$^{207}\text{Pb}$			стабильно

Одной из причин того, что торий-227 ( $T_{1/2} = 18,7$  дней) не рассматривался широко для применения в альфа-терапии, является то, что при его распаде образуются вредные продукты.

Таким образом, чтобы провести различие с комплексами тория, где используется природный изотоп тория с наибольшим коэффициентом обогащения, т.е. торий-232 (период полураспада: 1010 лет, практически не обладает радиоактивностью), следует понимать, что комплексы тория и композиции на их основе, описанные в настоящем изобретении, включают излучающий альфа-частицы изотоп тория (т.е., по меньшей мере, один изотоп тория с периодом полураспада менее 103 года, например, тория-227) с коэффициентом обогащения большим, чем природный, например, по меньшей мере, на 20% больше. Это не влияет на определение способа по изобретению, в соответствии с которым прямо требуется терапевтически эффективное количество радиоактивного тория, такого как торий-227, однако предпочтительно это влияет на все аспекты изобретения.

В соответствии со всеми аспектами настоящего изобретения излучающим альфа-частицы ионом тория является ион тория-227. Ион 4+ тория является ионом для применения в комплексах по настоящему изобретению. Соответственно используют ион 4+ тория-227.

Торий-227 может применяться в количествах достаточных для того, чтобы обеспечить необходимый терапевтический эффект без образования такого количества радия-223, которое могло бы вызвать недопустимое подавление функции костного мозга. Необходимо, чтобы дочерние изотопы оставались в пределах участка-мишени, чтобы в результате их распада можно было бы достигнуть дополнительного терапевтического эффекта. Тем не менее, нет необходимости осуществлять контроль за продуктами распада тория для достижения полезного терапевтического эффекта без возникновения недопустимой миелотоксичности.

Если исходить из того, что эффект уничтожения опухолевых клеток будет обеспечиваться в основном торием-227, а не его дочерними нуклидами, вероятная терапевтическая доза этого изотопа может быть установлена путем сравнения с другими нуклидами, излучающими альфа-частицы. Например, для астатина-211 терапевтические дозы для животных будут составлять, как правило, 2-10 МБк/кг. С поправкой на продолжительность периода полураспада и энергию соответствующая дозировка для тория-227 будет составлять, по меньшей мере, 36 - 200 кБк/кг массы тела. Это значение будет установлено в качестве нижнего предела количества  $^{227}\text{Th}$ , которое может вводиться для достижения предполагаемого терапевтического эффекта. В этом расчете учитывается удержание астатина и тория. Тем не менее, очевидно, что период полураспада тория, составляющий 18,7 дней, обуславливает большее выведение этого изотопа до его распада. Следовательно, такая расчетная дозировка, как правило, будет считаться минимальным эффективным количеством. Терапевтическая доза, выраженная с точки зрения полностью удержанного  $^{227}\text{Th}$  (т.е.  $^{227}\text{Th}$ , который не выведен из организма), как правило, будет составлять, по меньшей мере, 18 или 25 кБк/кг, предпочтительно, по меньшей мере, 36 кБк/кг, более предпочтительно, по меньшей мере, 75 кБк/кг, например, 100 кБк/кг или более. Предполагается, что большие количества тория будут обладать большим терапевтическим эффектом, однако такие количества не могут применяться, если это приведет к возникновению недопустимых побочных эффектов. Аналогичным образом, если торий применяется в форме с коротким биологическим периодом полураспада (т.е. периодом полураспада до выведения из организма лекарства, содержащего торий), то для достижения терапевтического эффекта необходимы большие количества радиоизотопа, так как значительное количество тория будет выведено из организма до его распада. Тем не менее, это также приведет к соответствующему уменьшению количества образовавшегося радия-223. Вышеуказанные количества тория-227, которые применяются при полном удержании изотопа, могут с легкостью быть соотнесены с эквивалентными дозами с более коротким периодами полураспада. Специалисты могут произвести такие расчеты, указанные расчеты приведены в документе WO 04/091668 (например, в тексте примеров 1 и 2).

Если соединение, меченное радиоактивным изотопом, высвобождает дочерние нуклиды, важно, в соответствующих случаях, знать, что происходит с каждым из таких радиоактивных дочерних нуклидов. Для  $^{227}\text{Th}$  основным дочерним продуктом является  $^{223}\text{Ra}$ , который подвергается клинической оценке из-за его остеотропных свойств. Радий-223 чрезвычайно быстро выводится из крови и концентрируется в скелете или выводится из организма через кишечник или через почки (см. Larsen, J Nucl Med 43 (5, Supplement): 160P (2002)). Следовательно, радий-223, который образуется in vivo в результате распада  $^{227}\text{Th}$ ,

незначительно воздействует на здоровые мягкие ткани. В исследовании Müller в *Int. J. Radiat. Biol.* 20:233-243 (1971) в отношении распределения  $^{227}\text{Th}$  в виде растворенной соли цитрата было обнаружено, что  $^{223}\text{Ra}$ , образовавшийся из  $^{227}\text{Th}$  в мягких тканях, перераспределяется в кость или выводится из организма. Таким образом, в отношении дозировки тория проблематичной является известная токсичность излучающей альфа-частицы радия, в частности токсичность для костного мозга.

Фактически, в WO 04/091668 в первый раз было установлено, что человеку может быть введена переносимая доза  $^{223}\text{Ra}$ , составляющая, по меньшей мере, 200 кБк/кг. Эти данные приведены в указанной публикации. Таким образом, неожиданно было обнаружено, что существует терапевтическое окно, в пределах которого пациенту-млекопитающему может быть введено терапевтически эффективное количество  $^{227}\text{Th}$  (например, доза, превышающая 36 кБк/кг) без риска недопустимой или летальной миелотоксичности для пациента. Тем не менее, чрезвычайно важно оптимально использовать такое терапевтическое окно, следовательно, важно, чтобы комплекс радиоактивного тория был получен быстро и эффективно, а также должна быть обеспечена высокая аффинность, чтобы в участок-мишень доставлялась максимальная доза.

Количество  $^{223}\text{Ra}$ , которое получают при распаде  $^{227}\text{Th}$  в лекарственном средстве, будет зависеть от биологического периода полураспада радиомеченного соединения. Идеальной ситуацией будет применение комплекса с быстрым всасыванием в опухоль, включая интернализацию в опухолевые клетки, устойчивое удержание в опухоли и короткий биологический период полураспада в здоровых тканях. Тем не менее, комплексы с биологическим периодом полураспада меньше идеального могут использоваться при условии сохранения дозы  $^{223}\text{Ra}$  на приемлемом уровне. Количество радия-223, которое образовалось *in vivo*, будет зависеть от количества вводимого тория и время биологического удержания комплекса тория. В каждом конкретном случае специалист может с легкостью произвести расчет образующегося количества радия-223. Максимальное вводимое количество  $^{227}\text{Th}$  будет определяться количеством радия, который образуется *in vivo*; такое количество должно быть меньше количества, которое вызовет недопустимый уровень побочных эффектов, в частности, миелотоксичности. Такое количество, как правило, будет менее 300 кБк/кг, в частности, менее 200 кБк/кг, более предпочтительно, менее 170 кБк/кг (например, менее 130 кБк/кг). Минимальная эффективная доза будет определяться цитотоксичностью тория, чувствительностью пораженной ткани к воздействию альфа-излучению и степени, с которой торий эффективно может входить в состав комплекса, удерживаться в составе такого комплекса и доставляться нацеливаемым комплексом (в этом случае, таким комплексом является комбинация лиганда и нацеленного фрагмента).

В соответствии со способом по изобретению комплекс тория предпочтительно вводится при дозировке тория-227, составляющей 18-400 кБк/кг массы тела, предпочтительно 36-200 кБк/кг, (например, 50-200 кБк/кг), более предпочтительно 75-170 кБк/кг, в особенности, 100-130 кБк/кг. Соответственно, при однократном введении приблизительная доза может быть рассчитана путем умножения указанных значений на соответствующее значение массы тела в диапазоне, например, 30-150 кг, предпочтительно, 40-100 кг, например, доза может составлять от 540 до 4000 кБк и т.д.). Более того, желательно, чтобы доза тория, агент, входящий в состав комплекса и путь введения были такими, чтобы доза радия-223, образующегося *in vivo*, составляла менее 300 кБк/кг, более предпочтительно менее 200 кБк/кг, еще более предпочтительно менее 150 кБк/кг, в особенности менее 100 кБк/кг. Опять же, путем умножения указанных диапазонов на указанные значения массы тела можно получить значение дозы радиационного воздействия для  $^{223}\text{Ra}$ . Указанные выше уровни относятся к полностью удерживаемой дозе  $^{227}\text{Th}$ , однако такие дозы могут применяться с учетом некоторого количества  $^{227}\text{Th}$ , которое выводится из организма до распада.

В случае если биологический период полураспада комплекса  $^{227}\text{Th}$  является коротким по сравнению с физическим периодом полураспада (например, если он составляет менее 7 дней, в особенности, менее 3 дней), потребуются введение значительно больших доз для обеспечения эквивалентной удерживаемой дозы. Таким образом, например, полностью удерживаемая доза 150 кБк/кг эквивалентна комплексу с периодом полураспада 5 дней с дозой при введении 711 кБк/кг. Эквивалентная доза введения для соответствующих удерживаемых доз может быть рассчитана исходя из скорости биологического выведения комплекса с использованием способов, известных специалистам.

Так как при распаде одного ядра  $^{227}\text{Th}$  получают атом  $^{223}\text{Ra}$ , удержание и терапевтическая активность  $^{227}\text{Th}$  будут напрямую связаны с дозой  $^{223}\text{Ra}$ , воздействию которой подвергается пациент. Расчет образующегося количества  $^{223}\text{Ra}$  в каждом конкретном случае может осуществляться с использованием известных способов.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется способ лечения указанных заболеваний у млекопитающих (в соответствии с описанием в настоящем документе), при этом указанный способ включает введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного нацеленного на ткань комплекса тория в соответствии с описанием в настоящем документе.

Очевидно, предпочтительно свести к минимуму воздействие на пациента дочернего изотопа  $^{223}\text{Ra}$ , за исключением случаев, когда его свойства используют с пользой. В частности, количество радия-223,

образовавшегося *in vivo*, как правило, будет больше 40 кБк/кг, например, больше 60 кБк/кг. В некоторых случаях, количество радия-223, образовавшегося *in vivo*, должно быть больше 80 кБк/кг, например, больше 100 или 115 кБк/кг.

Для конъюгатов, меченных торием-227, в соответствующих растворах-носителях может использоваться внутривенный, внутриполостной (например, интраперитональный), подкожный, пероральный или местный способ введения, они могут вводиться однократно или в соответствии с схемой приема, предусматривающей введение частями. Предпочтительно, комплексы, конъюгированные с нацеленным фрагментом, вводятся в виде растворов парентерально (например, путем чрескожного введения), в особенности, с использованием внутривенного или внутриполостного способа введения. Предпочтительно, композиции по настоящему изобретению используют в составе со стерильным раствором для парентерального введения.

Торий-227 в способах и продуктах по настоящему изобретению может использоваться по отдельности или в комбинации другими методами терапии, включая хирургическое вмешательство, радиотерапию, химиотерапию, применение других радионуклидов или регулирование температуры ткани и т.д. Это составляет еще один, предпочтительный вариант осуществления способа по изобретению, соответственно, препаративные формы/лекарственные средства могут содержать, по меньшей мере, один дополнительный терапевтически активный агент, например, другой радиоактивный агент или химиотерапевтический агент.

В соответствии с одним особенно предпочтительным вариантом осуществления изобретения параллельно осуществляют лечение пациента стволовыми клетками и/или другая поддерживающая терапия для снижения миелотоксичности, вызванной воздействием радия-223.

Молекулы, меченные торием (торием-227), по изобретению могут применяться для лечения раковых и неракковых заболеваний путем нацеливания на рецепторы, связанные с заболеванием. Как правило,  $^{227}\text{Th}$  будет применяться таким образом в радиоиммунотерапии на основании связывания  $^{227}\text{Th}$  хелатором с антителом, фрагментом антитела или с конструктором антитела или фрагмента антитела для лечения раковых и неракковых заболеваний. Применение  $^{227}\text{Th}$  в способах и лекарственных средства по настоящему изобретению, в частности, пригодно для лечения любых форм рака, включая карциномы, саркомы, лимфомы и лейкемии, в особенности, для лечения рака легкого, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, почек, желудка, предстательной железы, пищевода, мозга, яичников, матки, рака ротовой полости, колоректального рака, меланомы, множественной миеломы и неходжкинской лимфомы.

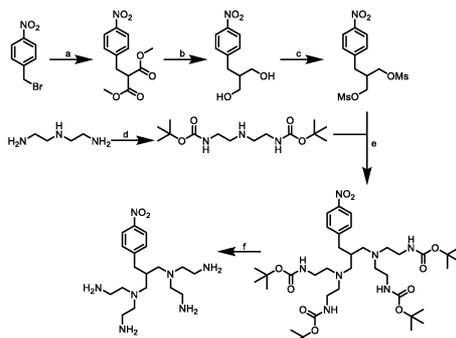
В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения, лечение пациента больного одновременно заболеванием мягких тканей и скелетным заболеванием может осуществляться с использованием  $^{227}\text{Th}$  и  $^{223}\text{Ra}$ , который образуется *in vivo* после введения тория. В соответствии с таким особенно предпочтительным аспектом дополнительный терапевтический компонент лечения обеспечивается использованием не вызывающего непереносимой миелотоксичности количества  $^{223}\text{Ra}$ , когда мишенью является скелетное заболевание. В соответствии с этим терапевтическим методом  $^{227}\text{Th}$ , как правило, используется для лечения первичного и/или метастатического рака мягких тканей путем его нацеливания в соответствующие участки тела, в  $^{223}\text{Ra}$ , образовавшийся в результате распада  $^{227}\text{Th}$ , используется для лечения заболеваний скелета у того же пациента. Таким заболеванием скелета могут являться метастазы в костях скелета, возникшие в результате первичного рака мягких тканей, или им может быть первичное заболевание, при этом лечение мягких тканей осуществляют для противодействия метастатическому раку. В некоторых случаях заболевания мягких тканей и скелета могут быть несвязанными (например, дополнительное лечение скелетного заболевания у пациента с ревматологическим заболеванием мягких тканей).

Состояния, для лечения которых указанные способы, применения и другие аспекты настоящего изобретения являются особенно пригодными, включают неопластические и гиперпластические заболевания, такие как карцинома, саркома, миелома, лейкемия, лимфома или рак смешанного типа, включая неходжкинскую лимфому или В-клеточные неоплазмы, рак молочной железы, рак эндометрия, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак предстательной железы или мозга, рак мезотелиомы, рак яичников, легких или поджелудочной железы.

Ниже представлены некоторые примеры методов синтеза. Этапы, описанные для указанных методов синтеза, могут применяться в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. Этап а), например, может осуществляться с использованием промежуточного соединения AGC0021, которое описывается ниже для многих или во всех вариантов осуществления изобретения.

Синтез ключевого промежуточного продукта AGC0020.

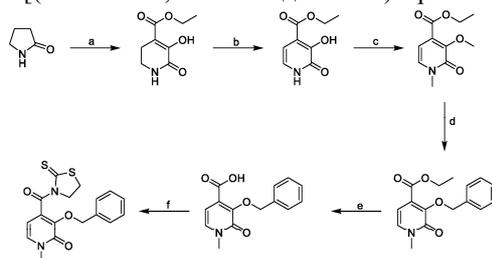
N,N,N',N'-Тетраakis(2-аминоэтил)-2-(4-нитробензил)пропан-1,3-диамин



а) диметилалонат, гидрид натрия, ТГФ, б) ДИБАЛ-Л, ТГФ, с) MsCl,  $\text{Net}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  
 д) имидазол,  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , толуол, е) ДИПЭА, ацетонитрил, ф) MeOH, вода, AcCl

Синтез ключевого промежуточного продукта AGC0021.

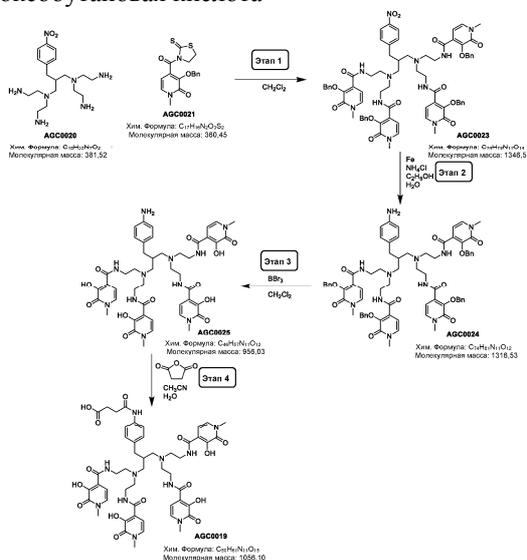
3-(Бензилокси)-1-метил-4-[(2-тиоксо-1,3-тиазолидин-3-ил)карбонил]пиридин-2(1H)-он



а) диэтилоксалат, этиоксид калия, толуол EtOH, б) Pd/C, p-ксилол, с) MeI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ДМСО, ацетон,  
 д) i)  $\text{VBr}_3$ , ДЦМ, ii)  $\text{VnBr}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KI, ацетон, е) NaOH, вода, MeOH, ф)  $\text{HS-C}_2\text{H}_4\text{S}$ , ДЦК, ДМАП, ДЦМ

Синтез хелата соединения формулы (VIII).

4-{{4-(3-[бис(2-{{(3-Гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-ил)карбонил}амино}этил)амино]-2-{{бис(2-{{(3-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-ил)карбонил}амино}этил)амино]метил}пропил)фенил]амино}-4-оксобутановая кислота



В способе получения комплексов по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы реакция сочетания между октадентатным хелатором и нацеленным на ткань фрагментом осуществлялась в водном растворе. Это имеет несколько преимуществ. Прежде всего, при этом производителю нет необходимости удалять весь растворитель до приемлемого содержания и проходить соответствующую сертификацию, подтверждающую такое удаление. Во-вторых, при этом снижается количество отходов, и, что самое важное, ускоряется производство, так как исключается этап сепарации или удаления растворителя. В контексте производства радиофармацевтических продуктов в соответствии с настоящим изобретением важно, чтобы синтез осуществлялся в кратчайшие сроки из-за постоянного распада радиоизотопа, так как в течение времени, затраченного на их получение, происходит расход ценного материала, а также образуются посторонние дочерние изотопы.

Соответствующие водные растворы включают очищенную воду и буферы, например, любые различные буферы, известные специалистам. Обычными известными водными буферами являются ацетатные, цитратные, фосфатные (например, фосфатно-солевой буфер, PBS) и сульфатные буферы (например, MES).

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения способ включает получение первого водного раствора лиганда, содержащего октадентат гидроксипиридинон (в соответствии с описанием в настоящем документе), и второго водного раствора нацеленного на ткань фрагмента (в соответствии с описанием в настоящем документе) и контактирование указанного первого и указанного второго водного раствора.

Соответствующие соединительные фрагменты подробно описаны выше, и все группы и фрагменты, описанные в настоящем документе в качестве соединительных и/или связывающих групп, пригодны для связывания нацеленного фрагмента с лигандом. Некоторые предпочтительные соединительные группы включают амидные группы, группы сложных эфиров, простых эфиров и аминные соединительные группы. Сложные эфиры и амиды могут быть образованы с помощью активации групп сложных эфиров из карбоновой кислоты. Такая карбоновая кислота может присутствовать на нацеленном фрагменте, на соединительном фрагменте и/или на лигандном фрагменте, она, как правило, будет вступать в реакцию со спиртом или амином для образования сложного эфира или амида. Такие способы известны специалистам, в них могут использоваться известные активирующие реагенты, включая N-гидроксималеимид, карбодиимид и/или азодикарбоксилат-активирующие реагенты, такие как DCC, DIC, EDC, DEAD, DIAD и т.д.

В соответствии с изобретением октадентатный хелатор, включающий указанные четыре гидроксипиридиноновых фрагмента (НОРО), замещенных в N-положении C<sub>1</sub>-алкильной группой, и соединительный фрагмент, заканчивающийся группой карбоновой кислоты, могут активироваться с использованием, по меньшей мере, одного связывающего реагента (например, любого реагента, описанного в настоящем документе) и активирующего агента, такого как N-гидроксисукцинимид (NHS), в результате чего образуется сложный эфир NHS октадентатного хелатора. Может осуществляться сепарация такого активированного сложного эфира (например, NHS), или он может использоваться без сепарации для соединения с любым нацеленным на ткань фрагментом со свободной аминной группой (такой как боковая цепь лизина). Другие активированные сложные эфиры известны специалистам и могут представлять собой любой сложный эфир эффективной уходящей группы, такой как фторсодержащие группы, тозилаты, мезилаты, йодиды и т.д. Тем не менее, предпочтительными являются сложные эфиры NHS.

Реакцию сочетания предпочтительно осуществляют на протяжении сравнительно короткого периода и приблизительно при обычной температуре. Типичные периоды для 1-этапной или 2-этапной реакции сочетания будут составлять приблизительно 1-240 мин, предпочтительно 5-120 мин, более предпочтительно 10-60 мин. Типичные температуры для реакции сочетания будут составлять 0-90°C, предпочтительно 15-50°C, более предпочтительно 20-40°C. Подходящими температурами являются температуры около 25°C или около 38°C.

Соединение октадентатного хелатора с нацеленным фрагментом, как правило, осуществляют при таких условиях, которые не влияют негативно (или, по меньшей мере, не оказывают необратимого воздействия) на связывающую способность нацеленного фрагмента. Так как связывающими фрагментами, как правило, являются фрагменты на основе пептидов или белков, для того, чтобы избежать денатурации или потери вторичной/третичной структуры, требуются относительно нежесткие условия. Водные условия (в соответствии с описанием в настоящем документе во всех контекстах) являются предпочтительными, предпочтительно избегать экстремальных условий в отношении pH и/или окислительно-восстановительного потенциала. Таким образом, этап b) может осуществляться при значении pH в диапазоне 3-10, предпочтительно 4-9, более предпочтительно 4,5-8. Предпочтительными условиями являются нейтральные условия в отношении окислительно-восстановительного потенциала или незначительно восстановительными для того, чтобы избежать окисления в воздушной атмосфере.

Предпочтительным нацеленным на ткань хелатором, который может применяться в соответствии со всеми аспектами изобретения, является AGC0018 согласно описанию в настоящем документе. Комплексы AGC0018 с ионами <sup>227</sup>Th составляют предпочтительный вариант осуществления комплексов и соответствующих препаративных форм, применений, способов по изобретению и т.д. Прочие варианты осуществления изобретения во всех таких аспектах изобретения включают <sup>227</sup>Th-комплексы AGC0019, конъюгированные с нацеленными на ткань фрагментами (в соответствии с описанием в настоящем документе), включая моноклональные антитела с аффинностью связывания в отношении любого рецептора CD22, FGFR2, мезотелина, HER-2, PSMA или CD33.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1 - данные, демонстрирующие стабилизирующий эффект EDTA/PABA на конъюгат нерадиоактивного антитела AGC1118 в растворе.

Фиг. 2 - эффект на уровни пероксида водорода различных буферов, содержащих конъюгаты антитела НОРО, облученных излучением 10 кГр.

Фиг. 3 - радиостабилизирующий эффект <sup>227</sup>Th-AGC1118 (анализ методом инфракрасной флуоресценции) со специфической активностью приблизительно до 8000 Бк/мкг.

Фиг. 4 - цитотоксичность <sup>227</sup>Th-AGC1118 в отношении Ramos с другой общей активностью (время инкубирования: 4 ч) (см. пример 3).

Фиг. 5 - <sup>227</sup>Th-AGC0718 индуцирует избирательное уничтожение CD33-положительных клеток *in vitro* (см. пример 4).

Фиг. 6 - цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118 при высокой (20 кБк/мкг) и низкой (7,4 кБк/мкг) специфической активности. Негативным контролем являлся комплекс пептид-альбумин со слабой связью с аналогичной дозировкой, временем инкубации и количеством дней до выборки информации (см. пример 5).

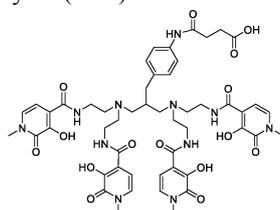
Фиг. 7 -  $^{227}\text{Th}$ -AGC2518 индуцирует избирательное уничтожение FGFR2-положительных клеток *in vitro* (см. пример 6).

Фиг. 8 -  $^{227}\text{Th}$ -AGC2418 индуцирует избирательное уничтожение мезотелин-положительных клеток *in vitro* (см. пример 7).

Фиг. 9 -  $^{227}\text{Th}$ -AGC1018 индуцирует избирательное и дозозависимое уничтожение клеток PSMA-положительных LNCaP клеток *in vitro* (см. пример 9).

Далее настоящее изобретение поясняется следующими примерами, не имеющих ограничительного характера. Все соединения, примеры которых приведены в разделе "Примеры" составляют предпочтительные варианты осуществления изобретения (включая предпочтительные промежуточные соединения и прекурсоры) и могут применяться по отдельности или в комбинации в соответствии с любым аспектом, если позволяет контекст. Таким образом, например, все вместе и каждое по отдельности соединения 2-4 в соответствии с примером 2, соединение 10 в соответствии с примером 3 и соединение 7 в соответствии с примером 4 составляют предпочтительные варианты осуществления изобретения различных типов.

Пример 1. Синтез соединений формулы (VIII)



Пример 1 а). Синтез диметил 2-(4-нитробензил)малоната



Гидрид натрия (60% дисперсия, 11,55 г, 289 ммоль) суспендировали в 450 мл тетрагидрофурана (THF) при 0°C. По каплям добавили диметилмалонат (40,0 мл, 350 ммоль) в течение приблизительно 30 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C. По каплям добавили 4-нитробензилбромид (50,0 г, 231 ммоль), растворенный в 150 мл THF, в течение приблизительно 30 мин при 0°C, а затем в течение двух часов при обычной температуре.

Перед тем как раствор профильтровали, добавили 500 мл этилацетата (EtOAc) и 250 мл  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (вод., насыщ.). Фазы были разделены. Водную фазу экстрагировали с использованием 2×250 мл EtOAc. Органические фазы объединили, промыли 250 мл соляного раствора, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , профильтровали и растворители удалили при пониженном давлении.

К остатку добавили 300 мл гептана и 300 мл метил-трет-бутилового эфира (MTBE) и нагрели до 60°C. Раствор профильтровали, фильтрат поместили в холодильную установку на всю ночь, затем профильтровали. Фильтрационный осадок промыли 200 мл гептана и высушили при пониженном давлении с получением главного соединения в виде твердого вещества грязно-белого цвета.

Выход: 42.03 г, 157.3 ммоль, 68%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3.30 (d, 2H, 7.8 Hz), 3.68 (t, 1H, 7.8 Hz), 3.70 (s, 6H), 7.36 (d, 2H, 8.7 Hz), 8.13 (d, 2H, 8.7 Hz).

Пример 1 б). Синтез 2-(4-нитробензил)пропан-1,3-диола

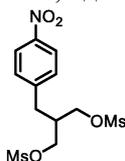


Диметил 2-(4-нитробензил)малонат (28,0 г, 104,8 ммоль) растворили 560 мл THF при 0°C. Добавили по каплям гидрид диизобутилалюминия (DIBAL-H) (1 M в гексанах, 420 мл, 420 ммоль) при 0°C в течение приблизительно 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при температуре 0°C в течение двух часов. К реакционной смеси по каплям добавили 20 мл воды при 0°C. К реакционной смеси по каплям добавили 20 мл NaOH (вод., 15%) при 0°C, а затем к реакционной смеси по каплям добавили 20 мл воды. Смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин перед добавлением приблизительно 150 г  $\text{MgSO}_4$ . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин перед тем, как ее профильтровали с использованием воронки Бюхнера. Фильтрационный осадок промыли 500 мл EtOAc. Перед тем, как раствор профильтровали, фильтрационный осадок удалили и перемешивали с 800 мл EtOAc и 200 мл MeOH в течение приблизительно 30 мин. Фильтраты объединили и высушили при пониженном давлении. С помощью сухой флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента EtOAc в гептане, затем градиента MeOH в EtOAc получили главное соединение в виде твердого вещества бледно-желтого цвета.

Выход: 15.38 г, 72.8 ммоль, 69%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.97-2.13 (m, 3H), 2.79 (d, 2H, 7.6 Hz), 3.60-3.73 (m, 2H), 3.76-3.83 (m, 2H), 7.36 (d, 2H, 8.4 Hz), 8.14 (d, 2H, 8.4 Hz).

Пример 1 с). Синтез 2-(4-нитробезил)пропан-1,3-диилдиметансульфоната

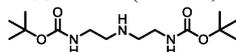


2-(4-Нитробезил)пропан-1,3-диол (15,3 г, 72,4 ммоль) растворили в 150 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $0^\circ\text{C}$ . Добавили триэтиламин (23 мл, 165 ммоль), затем по каплям добавили метансульфонилхлорид (12 мл, 155 ммоль) в течение приблизительно 15 мин, затем смесь перемешивали при обычной температуре в течение одного часа. Добавили 500 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и смесь промыли  $2 \times 250$  мл  $\text{NaHCO}_3$  (вод., насыщ.), 125 мл  $\text{HCl}$  (вод., 0,1 М) и 250 мл соляного раствора. Органическую фазу высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , профильтровали и высушили при пониженном давлении с получением главного соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

Выход: 25.80 г, 70.2 ммоль, 97%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.44-2.58 (m, 1H), 2.87 (d, 2H, 7.7 Hz), 3.03 (s, 6H), 4.17 (dd, 2H, 10.3, 6.0 Hz), 4.26 (dd, 2H, 10.3, 4.4 Hz), 7.38 (d, 2H, 8.6 Hz), 8.19 (d, 2H, 8.6 Hz).

Пример 1 d). Синтез ди-трет-бутил(азандиилбис(этан-2,1-диил))дикарбамата



Имидазол (78,3 г, 1,15 моль) суспендировали в 500 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при комнатной температуре. Порциями добавили ди-трет-бутилкарбонат ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) (262,0 г, 1,2 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение одного часа при комнатной температуре. Реакционную смесь промыли  $3 \times 750$  мл, высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , профильтровали и летучие вещества удалили при пониженном давлении. Остаток растворили в 250 мл толуола и добавили диэтилентриамин (59,5 мл, 550 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при температуре  $60^\circ\text{C}$  в течение двух часов.

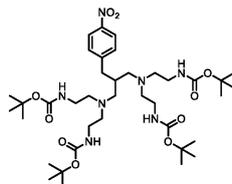
Добавили 1 л  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и органическую фазу промыли  $2 \times 250$  мл воды. Органическую фазу осушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , профильтровали и восстановили при пониженном давлении.

С помощью сухой флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента метанола (MeOH) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с триэтиламинем получили главное соединение в виде бесцветного твердого вещества.

Выход: 102 г, 336 ммоль, 61%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.41 (s, 18H), 1.58 (bs, 1H), 2.66-2.77 (m, 4H), 3.13-3.26 (m, 4H), 4.96 (bs, 2H).

Пример 1 e). Синтез тетра-трет-бутил (((2-(4-нитробезил)пропан-1,3-диил)-бис-(азантриил))тетракис(этан-2,1-диил))тетракарбамата



2-(4-Нитробезил)пропан-1,3-диилдиметансульфонат (26,0 г, 71 ммоль) и ди-трет-бутил(азандиилбис(этан-2,1-диил))дикарбамат (76,0 г, 250 ммоль) растворили в 700 мл ацетонитрила. Добавили  $N,N$ -диизопропилэтиламин (43 мл, 250 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 дней при кипячении с обратным холодильником.

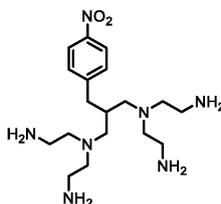
Летучие вещества удалили при пониженном давлении.

С помощью сухой флэш-хроматографии на силикагеле с использованием градиента  $\text{EtOAc}$  в гептане получили главное соединение в виде плотной пены бледно-желтого цвета.

Выход: 27.2 г, 34.8 ммоль, 49%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.40 (s, 36H), 1.91-2.17 (m, 3H), 2.27-2.54 (m, 10H), 2.61-2.89 (m, 2H), 2.98-3.26 (m, 8H), 5.26 (bs, 4H), 7.34 (d, 2H, 8.5 Hz), 8.11 (d, 2H, 8.5 Hz).

Пример 1 f). Синтез  $N^1,N^{1'}$ -(2-(4-нитробезил)пропан-1,3-диил)-бис-( $N^1$ -(2-аминоэтил)этан-1,2-диамина), AGC0020



Тетра-трет-бутил (((2-(4-нитробензил)пропан-1,3-диил)-бис-(азантриил)тетраakis(этан-2,1-диил)тетракарбамат (29,0 г, 37,1 ммоль) растворили в 950 мл MeOH и 50 мл воды. По каплям добавили ацетилхлорид (50 мл, 0,7 моль) в течение приблизительно 20 мин при 30°C. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи.

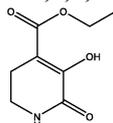
Летучие вещества удалили при пониженном давлении, и остаток растворили в 250 мл воды. Добавили 500 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, затем - 175 мл NaOH (вод., 5 М, насыщенный NaCl). Фазы разделили и водную фазу экстрагировали с помощью 4×250 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Органические фазы объединили, высушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, профильтровали и высушили при пониженном давлении с получением главного соединения в виде вязкого маслянистого вещества красно-коричневого цвета.

Выход: 11.20 г, 29.3 ммоль, 79%. Purity (ВЭЖХ фиг. 9): 99.3%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.55 (bs, 8H), 2.03 (dt, 1H, 6.6, 13.3 Hz), 2.15 (dd, 2H, 12.7, 6.6), 2.34-2.47 (m, 10H), 2.64-2.77 (m, 10H), 7.32 (d, 2H, 8.7 Hz), 8.10 (d, 2H, 8.7 Hz).

<sup>13</sup>C-ЯМР (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): 37.9, 38.5, 39.9, 58.0, 58.7, 123.7, 130.0, 146.5, 149.5.

Пример 1 g). Синтез этил 5-гидрокси-6-оксо-1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-карбоксилата

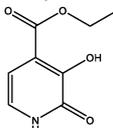


2-Пирролидинон (76 мл, 1 моль) и диэтилоксалат (140 мл, 1,03 моль) растворили в 1 л толуола при комнатной температуре. Добавили этюксид калия (EtOK) (24% в этиловом спирте, 415 мл, 1,06 моль), и реакционную смесь нагрели до 90°C. Порциями добавили 200 мл EtOH в течение первого часа реакции из-за сгущения реакционной смеси. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи и охладили до комнатной температуры. Медленно при перемешивании добавили 210 мл HCl (5 М, вод.).

Добавили 200 мл соляного раствора и 200 мл толуола, и фазы разделили. Водную фазу экстрагировали с использованием 2×400 мл CHCl<sub>3</sub>. Смешанные органические фазы высушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), профильтровали и восстановили под вакуумом. Остаток рекристаллизировали из EtOAc с получением главного соединения в виде твердого вещества бледно-желтого цвета.

Выход: 132.7 г, 0.72 моль, 72%.

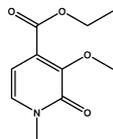
Пример 1 h). Синтез этил 3-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксилата



{Этил 5-гидрокси-6-оксо-1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-карбоксилат} (23,00 г, 124,2 ммоль) растворили в 150 мл п-ксилола и добавили палладиевый катализатор на углеродном носителе (10%, 5,75 г). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при кипячении с обратным холодильником. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь разбавили 300 мл MeOH и профильтровали через короткую подложку из Celite®. Подложку промыли 300 мл MeOH. Растворители удалили в вакууме с получением главного соединения в виде твердого вещества бледно-красно-коричневатого цвета.

Выход: 19.63 г, 107.1 ммоль, 86%. MS (ESI, pos): 206.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 389.1 [2M+Na]<sup>+</sup>.

Пример 1 i). Синтез этил 3-метокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксилата



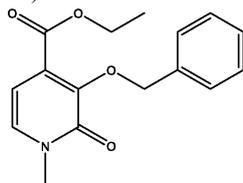
{Этил 3-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксилат} (119,2 г, 0,65 моль) растворили в 600 мл диметилсульфоксида (DMSO) и 1,8 л ацетона при комнатной температуре. Добавили K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (179,7 г, 1,3 моль). По каплям добавили йодистый метил (MeI) (162 мл, 321 ммоль), растворенный в 600 мл ацетона, в течение приблизительно 1 ч при комнатной температуре.

Реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных двух часов при комнатной температуре перед тем, как добавили MeI (162 мл, 2,6 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при кипячении с обратным холодильником. Реакционную смесь восстановили при пониженном давлении и добавили 2,5 л EtOAc.

Смесь профильтровали и восстановили при пониженном давлении. С помощью очистки путем сухой флэш-хроматографии (DFC) на SiO<sub>2</sub> с использованием градиента EtOAc в гептане получили главное соединение.

Выход: 56.1 г, 210.1 ммоль, 32%. MS (ESI, pos): 234.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 445.1 [2M+Na]<sup>+</sup>.

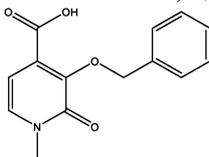
Пример 1 j). Синтез этил 3-(бензилокси)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксилата



{Этил 3-метокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксилат} (5,93 г, 28,1 ммоль) растворили в 80 мл дихлорметана (DCM) при  $-78^{\circ}\text{C}$  и по каплям добавили  $\text{VBr}_3$  (5,3 мл, 56,2 ммоль), растворенный в 20 мл DCM. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при  $-78^{\circ}\text{C}$  перед нагреванием реакции до  $0^{\circ}\text{C}$ . Реакцию резко охладили путем добавления по каплям 25 мл трет-бутилметилового эфира ( $\text{tert-BuOMe}$ ) и 25 мл  $\text{MeOH}$ . Летучие вещества удалили в вакууме. Остаток растворили в 90 мл DCM и 10 мл  $\text{MeOH}$  и профильтровали через короткую подложку  $\text{SiO}_2$ . Положку промыли 200 мл 10%  $\text{MeOH}$  в DCM. Летучие вещества удалили в вакууме. Остаток растворили в 400 мл ацетона. Добавили  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (11,65 г, 84,3 ммоль),  $\text{KI}$  (1,39 г, 8,4 ммоль) и бензилбромид ( $\text{BnBr}$ ) (9,2 мл, 84,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при кипячении с обратным холодильником. Реакционную смесь разбавили 200 мл  $\text{EtOAc}$  и промыли  $3 \times 50$  мл воды и 50 мл соляного раствора. Объединенные водные фазы экстрагировали с использованием  $2 \times 50$  мл  $\text{EtOAc}$ . Объединенные органические фазы высушили ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), профильтровали и летучие вещества удалили в вакууме и очистили путем сухой флэш-хроматографии на  $\text{SiO}_2$  с использованием  $\text{EtOAc}$  (40-70%) в гептанах в качестве элюента с получением главного соединения.

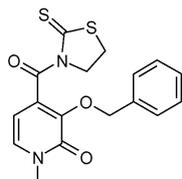
Выход: 5.21 г, 18.1 ммоль, 65%. MS (ESI, pos): 310.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 597.4  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Пример 1 k). Синтез 3-(бензилокси)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоновой кислоты



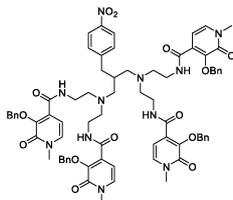
{Этил 3-(бензилокси)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксилат} (27,90 г, 97,1 ммоль) растворили в 250 мл  $\text{MeOH}$  и добавили 60 мл  $\text{NaOH}$  (5 М, вод.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч перед тем, как реакционную смесь сконцентрировали до приблизительно 1/3 в вакууме. Остаток разбавили 150 мл воды и подкислили до значения pH 2 с использованием хлорида водорода ( $\text{HCl}$ ) (5 М, вод.). Осадок профильтровали и высушили в вакууме с получением главного соединения в виде бесцветного твердого вещества. Выход: 22.52 г, 86.9 ммоль, 89%.

Пример 1 l). Синтез 3-(бензилокси)-1-метил-4-(2-тиоксотиазолидин-3-карбонил)пиридин-2(1H)-она (AGC0021)



{3-(Бензилокси)-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоновую кислоту} (3,84 г, 14,8 ммоль), 4-диметиламинопиридин (DMAP) (196 мг, 1,6 ммоль) и 2-тиазолин-2-тиол (1,94 г, 16,3 ммоль) растворили в 50 мл DCM. Добавили  $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодиимид (DCC) (3,36 г, 16,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Реакцию профильтровали, твердые компоненты промыли DCM и фильтрат восстановили в вакууме. Полученное твердое вещество желтого цвета рекристаллизировали из изопропанола/DCM с получением AGC0021. Выход: 4.65 г, 12.9 ммоль, 87%. MS(ESI, pos): 383  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 743  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Пример 1 m). Синтез AGC0023



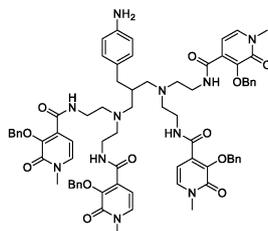
AGC0023

AGC0020 (8,98 г; 23,5 ммоль) растворили в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (600 мл). Добавили AGC0021 (37,43 г, 103,8 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь сконцентрировали при пониженном давлении.

С помощью сухой флэш-хроматографии на  $\text{SiO}_2$  с использованием градиента метанола в смеси 1:1  $\text{EtOAc}$  и  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  получили AGC0023 в виде плотной пены.

Средний выход: 26,95 г, 20,0 ммоль, 85%.

Пример 1 n). Синтез AGC0024

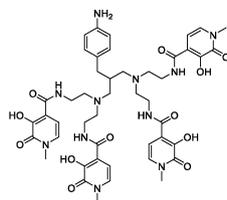


AGC0024

AGC0023 (26,95 г; 20,0 ммоль) растворили в этаноле ( $\text{EtOH}$ ) (675 мл). Добавили железо (20,76 г; 0,37 моль) и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (26,99 г; 0,50 моль), затем воду (67 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре  $70^\circ\text{C}$  в течение двух часов. Добавили дополнительное количество железа (6,75 г; 121 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение одного часа при  $74^\circ\text{C}$ . Добавили дополнительное количество (6,76 г; 121 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение одного часа при  $74^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь охладили перед тем, как реакционную смесь восстановили при пониженном давлении.

С помощью сухой флэш-хроматографии на  $\text{SiO}_2$  с использованием градиента метанола в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  получили AGC0024 в виде плотной пены. Выход: 18,64 г, 14,2 ммоль, 71%.

Пример 1 o). Синтез AGC0025



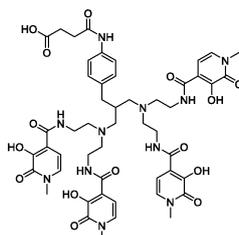
AGC0025

AGC0024 (18,64 г; 14,2 ммоль) растворили в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (750 мл) и охладили до  $0^\circ\text{C}$ . Добавили  $\text{VBr}_3$  (50 г; 0,20 моль) и реакционную смесь перемешивали в течение 75 мин. Реакцию резко охладили путем акуратного добавления метанола ( $\text{MeOH}$ ) (130 мл) при перемешивании при  $0^\circ\text{C}$ . Летучие вещества удалили при пониженном давлении. К остатку добавили  $\text{HCl}$  (1,25 М в  $\text{EtOH}$ , 320 мл). Затем колбу центрифугировали с использованием ротационного испарителя при атмосферном давлении и при обычной температуре в течение 15 мин перед тем, как летучие вещества удалили при пониженном давлении.

С помощью сухой флэш-хроматографии на неэндкепированном  $\text{C}_{18}$  силикагеле с использованием градиента ацетонитрила ( $\text{ACN}$ ) в воде получили AGC0025 в виде стеклянistoго твердого вещества слегка оранжевого цвета.

Выход: 13,27 г, 13,9 ммоль, 98%.

Пример 1 p). Синтез AGC0019



AGC0019

AGC0025 (10,63 г; 11,1 ммоль) растворили в  $\text{ACN}$  (204 мл) и воде (61 мл) при комнатной температуре. Добавили ангидрид янтарной кислоты (2,17 г; 21,7 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение двух часов. Реакционную смесь восстановили при пониженном давлении. С помощью сухой флэш-хроматографии на неэндкепированном  $\text{C}_{18}$  силикагеле с использованием градиента  $\text{ACN}$  в воде получили стеклянistoго твердое вещество зеленоватого цвета. Твердое вещество растворили в  $\text{MeOH}$  (62 мл) и воде (10,6 мл) при  $40^\circ\text{C}$ . Раствор по каплям добавили к  $\text{EtOAc}$  (750 мл) при ультразвуковой обработке. Осадок профильтровали, промыли  $\text{EtOAc}$  и высушили при пониженном давлении с получением AGC0019 в виде твердого вещества грязно-белого цвета с зеленоватым оттенком.

Выход: 9,20 г, 8,7 ммоль, 78%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (100 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Пример 2. Выделение чистого тория-227.

Торий-227 выделяют из генератора актиния-227. Актиний-227 получили посредством облучения тепловыми нейтронами радия-226, после чего следовал распад радия-227 ( $t_{1/2}=42,2$  мин) до актиния-227.

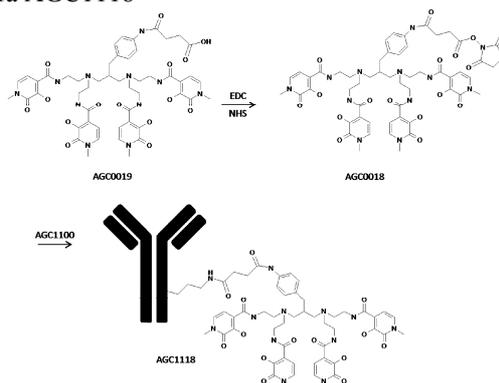
Торий-227 селективно удерживался из смеси распада актиния-227 в 8 М растворе  $\text{HNO}_3$  путем анионообменной хроматографии. Использовалась колонка с внутренним диаметром 2 мм, длиной 30 мм, содержащая 70 мг смолы AG®1-X8 (200-400 меш, нитратная форма). После актиния-227, радий-223 и дочерний радионуклиды элюировали из колонки, торий-227 экстрагировали из колонки с использованием 12 М  $\text{HCl}$ . Элюат, содержащий торий-227, выпаривали до сухости, и остаток ресуспендировали в 0,01 М  $\text{HCl}$  до этапа мечения.

Пример 3. Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC1118 в отношении Ramos.

Пример 3 а). Получение анти-CD22 моноклонального антитела (AGC1100).

Последовательность моноклонального антитела (mAb) hLL2, также именуемого эспратузумаб, в соответствии настоящим документом - AGC1100, конструировалась в соответствии с описанием в Leung, Goldenberg, Dion, Pellegrini, Shevitz, Shih, and Hansen: *Molecular Immunology* 32: 1413-27, 1995. В настоящих примерах использовалось mAb производства Immunomedics Inc, Нью-Джерси, США. Получение данного mAb может, например, осуществляться в клетках яичника китайского хомячка в суспензии (CHO-S), трансфицированных плазмидой, кодирующей гены, кодирующие легкую и тяжелую цепь. Для использования стандартных процедур выбираются первые стабильные клоны. По прошествии приблизительно 14 дней в одноразовом биореакторе может производиться сбор моноклонального антитела после фильтрации супернатанта. Дальнейшую очистку AGC1100 осуществляют с помощью аффинной хроматографии со связыванием белка A (MabSelect SuRe, Atoll, Вайнгартен/Германия), за которой следовал этап ионного обмена. Для удаления агрегатов и возможно оставшихся примесей может использоваться третий этап очистки на основании электростатических и гидрофобных свойств. Идентичность AGC1100 подтверждалась изoeлектрическим фокусированием, электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (анализ SDS-PAGE), N-концевым секвенированием и жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией (LC/MS). Дальнейший анализ чистоты образца производился путем эксклюзионной хроматографии (SEC).

Пример 3 б). Сочетание mAb AGC1100 (эспратузумаб) с хелатором AGC0019 (соединение формулы (VIII)) с получением конъюгата AGC1118



Перед конъюгацией к раствору антитела (AGC1100) добавили фосфатный буфер (pH 7,5) для увеличения буферной способности раствора. Определили количество AGC1100 (моноклональное антитело, mAb) в сосуде.

Хелатор AGC0019 растворили в 1:1, DMA: 0,1 М MES буфера, pH 5,4. NHS и EDC растворили в 0,1 М MES буфера, pH 5,4.

Получили 1/1/3 молярный эквивалентный раствор хелатора/N-гидроксисукцинимид (NHS)/1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC) для активации хелатора. Для конъюгации с антителом активированный хелатор в молярном отношении 7,5/7,5/22,5/1 (хелатор/NHS/EDC/mAb) добавили к mAb. Через 20-40 мин, реакцию конъюгации резко охладили 12% (по объему) 0,3 М лимонной кислоты для регулирования pH до 5,5.

Затем в растворе производили замену буфера на 30 мМ цитрата, 70 мМ  $\text{NaCl}$ , 2 мМ EDTA, 0,5 мг/мл pABA, pH 5,5 (буфер TFF) путем тангенциальной поточной фильтрации при постоянном объеме. В конце диалитрирования раствор вылили в емкость для препаративной формы. Для получения продукта добавили TFF-буфер (30 мМ цитрата, 70 мМ  $\text{NaCl}$ , 2 мМ EDTA, 0,5 мг/мл pABA, pH 5,5) и 7% (в отношении веса к объему) полисорбата 80 с получением 2,6 мг/мл AGC1118 в 30 мМ цитрата, 70 мМ  $\text{NaCl}$ , 2 мМ EDTA, 0,5 мг/мл pABA 0,1% (в отношении веса к объему) PS80, pH 5,5. Наконец, раствор профильтровали через фильтр с размером пор 0,2  $\mu\text{m}$  в стерильные колбы перед хранением.

Пример 3 с). Получение дозы инъекции  $^{227}\text{Th}$ -AGC1118.

Содержимое пробирки с 20 МБк пленки хлорида тория-227 растворили в 2 мл 8 М раствора  $\text{HNO}_3$  и оставили на 15 мин перед тем, как раствор извлекли и нанесли на анионообменную колонку для удаления радия-223, образовавшегося за это время. Колонку промыли 3 мл 8 М  $\text{HNO}_3$  и 1 мл воды перед элюированием тория-227 с использованием 3 мл 3 М  $\text{HCl}$ . Производили измерение элюционной активности тория-227, и дозу 10 МБк перенесли в пустую стеклянную пробирку объемом 10 мл. Затем испарили ки-

слоту путем использования вакуумного насоса и помещения пробирки в нагревательный блок (с настройкой температуры на 120°C) на 30-60 мин. После достижения комнатной температуры добавили 6 мл AGC1118 конъюгата 2,5 мг/мл для введения радиоактивных изотопов. Содержимое пробирки осторожно перемешали и оставили на 15 мин при комнатной температуре. Затем производили стерилизующую фильтрацию раствора в стерильную пробирку, и производили отбор образца для осуществления анализа iTLC (моментальной тонкослойной хроматографии) для определения радиохимической чистоты перед использованием.

Пример 3 d). Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC1118 в отношении Ramos с другой общей активностью и специфической активностью.

В этом исследовании производили тестирование доз  $^{227}\text{Th}$ -AGC1118 путем варьирования общей активности и специфической активности, время инкубирования составляло 4 ч. Это исследование проводили в формате 96-луночного планшета при специфической активности при 10/50 кБк/мкг и общей активности при 5, 10, 20 и 40 кБк/мл.

Культивирование клеток Ramos осуществлялось в RPMI1640-среде с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина (Passage 22). Клетки перенесли в пробирку для центрифуги, центрифугировали при 300 г в течение 5 мин и суспендировали в 5 мл среды перед подсчетом с использованием счетчика Z2 Coulter. Суспензию клеток разбавили средой до клеточной концентрации 400 000 клеток/мл и перенесли в 48 лунок (200 мкл на лунку) в 96-луночный планшет (80 000 клеток на лунку). Для измерения жизнеспособности клеток использовали набор CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), см. фиг. 4.

Пример 4. Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC0718 в отношении HL-60.

Пример 4 а). Получение анти-CD33 моноклонального антитела (AGC0700).

Последовательность моноклонального антитела (mAb) HuM195/линтузумаб, которое в настоящем документе именуется AGC0700, получили в соответствии с описанием в литературе согласно (1) и (2). AGC0700 было произведено на предприятии CobraBiologics (Сёдертелье, Швеция). Вкратце, производили обратную трансляцию аминокислотных последовательностей тяжелых и легких цепей в последовательность ДНК с использованием программного обеспечения Vector NTI® Software (Invitrogen/Life-Technologies Ltd., Пейсли, Великобритания). Из гена тяжелых цепей IgG1 исключили кодон С-конечного лизина (Lys) для упрощения точного определения отношения конъюгата к антителу (CAR), как указано в примере 2. Полученная последовательность ДНК была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих и синтезирована GeneArt (GeneArt/Life-Technologies Ltd., Пейсли, Великобритания) и далее клонирована в вектор экспрессии CobraBiologics (Сёдертелье, Швеция). Клетки яичника китайского хомячка в суспензии (CHO-S) стабильно трансфицировали плазмидой, кодирующей V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-домены AGC0700 и выращивали в присутствии стандартной среды CD-CHO (Invitrogen/Life-Technologies Ltd., Пейсли, Великобритания) с добавлением пуромидина (12,5 мг/л, Sigma Aldrich). Были выбраны стабильные клоны, экспрессирующие AGC0700, методом предельного разведения в течение 25 поколений. Стабильность клона оценивалась путем измерений белковый титров из супернатанта. Был получен клеточный банк наиболее стабильного клона, и осуществлялась его криоконсервация.

Экспрессия mAb осуществлялась при 37°C в течение приблизительно 14 дней в одноразовом биореакторе в масштабе 250 л. Производился сбор моноклонального антитела после фильтрации супернатанта. Дальнейшая очистка AGC0700 осуществлялась с использованием колонки для аффинной хроматографии со связыванием белка A (MabSelect SuRe, Atoll, Вайнгартен/Германия), после чего следовала одна анионообменная (QFF-Sepharose; GE Healthcare) и катионообменная хроматография (PorosXS; Invitrogen/Life-Technologies Ltd.) для повышения чистоты и конечного выхода. Идентичность AGC0700 подтверждалась изоэлектрическим фокусированием и анализом SDS-PAGE. Анализ активности очищенного AGC0700 осуществлялся методом ИФА со связыванием с иммобилизованной мишенью CD33-Fc (Novoprotein). Анализ чистоты образца производился путем эксклюзионной хроматографии (SEC).

Список используемой литературы:

(1) Scheinberg D.A. "Therapeutic uses of the hypervariable region of monoclonal antibody M195 and constructs thereof. US Patent Application 6007814 (1999 Dec 28).

(2) Co M.S. et al.; J Immunol. 1992 Feb 15; 148(4): 1149-54. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen.

Пример 4 б). Сочетание mAb AGC0700 (линтузумаб) с хелатором AGC0019 (соединение формулы (VIII)) с получением конъюгата AGC0718.

Конъюгация осуществлялась в соответствии с описанием в примере 3 с небольшими отличиями.

Перед конъюгацией к раствору антитела (AGC0700) добавили фосфатный буфер (pH 7,5) для увеличения буферной способности раствора. Определили количество AGC0700 (моноклональное антитело, mAb) в сосуде.

Хелатор AGC0019 растворили в 1:1, DMA: 0,1 М MES буфера, pH 5,4. NHS и EDC растворили в 0,1 М MES буфера, pH 5,4.

Получили 1/1/3 молярный эквивалентный раствор хелатора/NHS/EDC для активации хелатора. Для конъюгации с антителом активированный хелатор в молярном отношении 20/20/60/1

(хелатор/NHS/EDC/mAb) добавили к mAb. Через 40-60 мин, реакцию конъюгации резко охладили 12% (по объему) 0,3 М лимонной кислоты для регулирования pH до 5,5.

Затем в растворе производили замену буфера на 30 мМ цитрата, 154 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мг/мл pABA, pH 5,5 (буфер TFF) путем тангенциальной поточной фильтрации при постоянном объеме. В конце диафильтрации раствор вылили в емкость для препаративной формы. Для получения продукта добавили TFF-буфер (30 мМ цитрата, 154 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мг/мл pABA, pH 5,5) с получением 2,5 мг/мл AGC0718 в 30 мМ цитрата, 154 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мг/мл pABA, pH 5,5. Наконец, раствор профильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм в стерильные колбы перед хранением.

Пример 4 с). Получение дозы инъекции  $^{227}\text{Th}$ -AGC0718.

Содержимое пробирки с 20 МБк пленки хлорида тория-227 растворили в 2 мл 8 М раствора  $\text{HNO}_3$  и оставили на 15 мин перед тем, как раствор извлекли и нанесли на анионообменную колонку для удаления радия-223, образовавшегося за это время. Колонку промыли 3 мл 8 М  $\text{HNO}_3$  и 1 мл воды перед элюированием тория-227 с использованием 3 мл 3 М HCl. Производили измерение элюционной активности тория-227, и дозу 10 МБк перенесли в пустую стеклянную пробирку объемом 10 мл. Затем испарили кислоту путем использования вакуумного насоса и помещения пробирки в нагревательный блок (с настольной температуры на 120°C) на 30-60 мин. После достижения комнатной температуры добавили 6 мл AGC0718 конъюгата 2,5 мг/мл для введения радиоактивных изотопов. Содержимое пробирки осторожно перемешали и оставили на 15 мин при комнатной температуре. Затем производили стерилизующую фильтрацию раствора в стерильную пробирку, и производили отбор образца для осуществления анализа iTLC (моментальной тонкослойной хроматографии) для определения радиохимической чистоты перед использованием.

Пример 4 d). Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC0718 в отношении HL-60 с другой общей активностью.

Для демонстрации цитотоксичности  $^{227}\text{Th}$ -AGC0718 после связывания с CD33+-клетками осуществляли анализ цитотоксичности *in vitro*. Для этого линию человеческих миелоидных лейкозных клеток HL-60, а также линию CD33-отрицательных В-клеток (Ramos) подвергали воздействию  $^{227}\text{Th}$ -AGC0718. Производили тестирование общей активности 2 и 20 кБк/мл при специфической активности 44 кБк/мкг. Все экспериментальные процедуры описаны в RD2013.093. Вкратце, было получено 50000 человеческих HL-60 клеток/мл в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM), с использованием 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин; посев производили при плотности 100 000 клеток на лунку в 24-луночном планшете. Клетки инкубировали в течение 4 ч при температуре 37°C с активностью от 0 до 20 кБк/мл  $^{227}\text{Th}$ -AGC0718. Параллельно, в качестве соответствующих контрольных образцов получили соответствующий образец конъюгата  $^{227}\text{Th}$  изотипического контроля, а также немеченный образец AGC0718. Затем клетки промыли свежей средой, и произвели посев в новый 24-луночный культуральный планшет.

Сбор клеток производился в различные моменты времени, и производились измерения жизнеспособности клеток с использованием набора CellTiterGlo (Promega). Жизнеспособность выражалась в процентах, при этом жизнеспособность положительного контроля (необработанных клеток) принимали за 100%; см. фиг. 5.

Пример 5. Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118 в отношении SKOV-3.

Пример 5 а). Получение AGC0100 (трастузумаб).

Трастузумаб, моноклональное антитело (в настоящем документе обозначено как AGC0100) было приобретено в компании Roche; его растворили до концентрации 10 мг/мл в PBS (Dulbecco BIOCROM).

Пример 5 б). Сочетание mAb AGC0100 (трастузумаб) с хелатором AGC0019 (соединение формулы (VIII)) с получением конъюгата AGC0118.

Конъюгация осуществлялась в соответствии с описанием в примере 3 с небольшими модификациями. Очистку конечного конъюгата mAb с помощью TFF заменили гельфильтрационной колоночной хроматографией.

К трастузумабу в PBS добавили 11% 1 М фосфатный буфер, pH 7,4. Хелатор (AGC0019) NHS и EDC растворили в тех же растворах, как описано для примера 3 б). При активации молярное отношение хелатор/NHS/EDC составляло 1/1/3. При молярном отношении 8/8/25/1 для смеси хелатор/NHS/EDC/mAb и со временем конъюгации 30-40 мин получили CAR (отношение хелатора к антителу), составляющее 0,7-0,9 для конъюгированного AGC0118. Реакцию резко охладили путем добавления 12% (по объему) 0,3 М лимонной кислоты до конечного значения pH 5,5.

Очистку и замену буфера для конъюгатов AGC0118 в 30 мМ цитрата, pH 5,5, 154 мМ NaCl осуществляли путем гель-фильтрации на колонке Superdex 200 (GE Healthcare) в сочетании с системой АКТА (GE Healthcare). Производили измерение концентрации белка при Abs 280 нм до добавления в продукт буфера (для получения 2,5 мг/мл AGC0118 в 30 мМ цитрата, 154 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мг/мл pABA, pH 5,5). Наконец, раствор профильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм в стерильные колбы перед хранением.

Пример 5 с). Получение дозы инъекции  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118.

Мечение производили в соответствии с описанием выше.

Содержимое пробирки с 20 МБк пленки хлорида тория-227 растворили в 2 мл 8 М раствора  $\text{HNO}_3$  и оставили на 15 мин. перед тем, как раствор извлекли и нанесли на анионообменную колонку для удаления радия-223, образовавшегося за это время. Колонку промыли 3 мл 8 М  $\text{HNO}_3$  и 1 мл воды перед элюированием тория-227 с использованием 3 мл 3 М  $\text{HCl}$ . Производили измерение элюционной активности тория-227, и дозу 10 МБк перенесли в пустую стеклянную пробирку объемом 10 мл. Затем испарили кислоту путем использования вакуумного насоса и помещения пробирки в нагревательный блок (с постоянной температурой на  $120^\circ\text{C}$ ) на 30-60 мин. После достижения комнатной температуры добавили 6 мл AGC0118 конъюгата 2,5 мг/мл для введения радиоактивных изотопов. Содержимое пробирки осторожно перемешали и оставили на 15 мин при комнатной температуре. Затем производили стерилизующую фильтрацию раствора в стерильную пробирку, и производили отбор образца для осуществления анализа iTLC (моментальной тонкослойной хроматографии) для определения радиохимической чистоты перед использованием.

Пример 5 d). Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118 в отношении SKOV-3 с другой общей активностью.

Производили тестирование цитотоксичности с различными дозами  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118 путем варьирования общей активности с добавлением в лунки при инкубировании в течение 4 ч. Плотность посева клеток SKOV-3 составляла 10000 клеток на лунку в 96-луночной планшете за день до эксперимента. В день 1 к клеткам последовательно добавляли хелатообразующее  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118 с общей активностью 5, 10, 20 и 40 кБк/мл, при специфической активности 20 кБк/мкг. Оставшиеся не связанные  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118 удалили с помощью многоканальной пипетки, затем следовала дополнительная промывка средой и свежей культуральной средой после окончания инкубационного периода. Культивирование клеток SKOV-3 осуществлялось в среде МакКоя с 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин. В ходе инкубации с  $^{227}\text{Th}$ -AGC0118 культуральная среда была заменена средой без сыворотки. На четвертый день для измерения жизнеспособности клеток использовали набор CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega); см. фиг. 6.

Пример 6. Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC2518 в отношении NCI-H716.

Пример 6 а). Получение FGFR2 моноклонального антитела (BAY1179470; AGC2500).

Получение моноклонального антитела BAY 1179470, которое далее по тексту настоящего документа именуется "AGC2500", подробно описано в документе WO 2013076186A1. Вкратце, антитело было получено после биопаннинга на антигене FGFR2. Полученное IgG1-антитело человека экспрессировали в клетках яичников китайского хомячка (CHO) и очистили с использованием колонки для аффинной хроматографии со связыванием белка A (MAb Select Sure), затем следовала эксклюзионная хроматография для выделения мономерных фракций. Антитело объединили с PBS, pH 7,4. Определенная путем эксклюзионной хроматографии однородность составляла  $> 99\%$ .

Пример 6 b). Сочетание mAb AGC2500 с хелатором AGC0019 (соединение формулы (VIII)) с получением конъюгата AGC2518.

Производили корректировку значения pH содержащего антитело раствора до pH 7,5. Хелатор AGC0019 растворили в 1:1, DMA: 0,1 М MES буфера, pH 5,4. NHS и EDC растворили в 0,1 М MES буфера, pH 5,4. Получили 1/1/3 молярный эквивалентный раствор хелатора/NHS/EDC для активации хелатора. Для конъюгации с антителом активированный хелатор в молярном отношении 10/10/30/1 (хелатор/NHS/EDC/mAb) добавили к mAb. Через 30 мин, реакцию конъюгации резко охладили 12% (по объему) 0,3 М лимонной кислоты для регулирования pH до 5,5. Реакционный образец далее загрузили на колонку HiLoad 16/600 Superdex 200 (предварительного класса) для выделения мономерных фракций с использованием 30 мМ цитрата, 70 мМ NaCl, pH 5,5 в качестве подвижной фазы. В конце хроматографии конъюгат антитела AGC2518 сконцентрировали до 2,5 мг/мл в 30 мМ цитрата, 70 мМ NaCl, 2 мМ EDTA и 0,5 мг/мл pABA. Все процедуры описаны в RD.2014.092, Журнал № 211/149, 140619 AEF.

Пример 6 c). Получение дозы инъекции  $^{227}\text{Th}$ -AGC2518.

Содержимое пробирки с 20 МБк пленки хлорида тория-227 растворили в 2 мл 8 М раствора  $\text{HNO}_3$  и оставили на 15 мин перед тем, как раствор извлекли и нанесли на анионообменную колонку для удаления радия-223, образовавшегося за это время. Колонку промыли 3 мл 8 М  $\text{HNO}_3$  и 1 мл воды перед элюированием тория-227 с использованием 3 мл 3 М  $\text{HCl}$ . Производили измерение элюционной активности тория-227, и дозу 10 МБк перенесли в пустую стеклянную пробирку объемом 10 мл. Затем испарили кислоту путем использования вакуумного насоса и помещения пробирки в нагревательный блок (с постоянной температурой на  $120^\circ\text{C}$ ) на 30-60 мин. После достижения комнатной температуры добавили 6 мл AGC2518 конъюгата 2,5 мг/мл для введения радиоактивных изотопов. Содержимое пробирки осторожно перемешали и оставили на 15 мин при комнатной температуре. Затем производили стерилизующую фильтрацию раствора в стерильную пробирку, и производили отбор образца для осуществления анализа iTLC (моментальной тонкослойной хроматографии) для определения радиохимической чистоты перед использованием.

Пример 6 d). Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC2518 в отношении клеток NCI-H716 с другой общей активностью.

Для демонстрации цитотоксичности  $^{227}\text{Th}$ -AGC2518 после связывания с FGFR2+-клетками осуществляли анализ цитотоксичности *in vitro*. Для этого человеческая линия клеток колоректального рака

NCI-H716 подвергалась воздействию  $^{227}\text{Th}$ -AGC2518. Производили тестирование общей активности 2, 10, 20 и 40 кБк/мл при специфической активности 2 кБк/мкг. Параллельно был получен несвязанный изотипический контроль. Все экспериментальные процедуры описаны в RD2014.138. Вкратце, было получено 400 000 человеческих NCI-H716 клеток/мл в среде RPMI 1640 с использованием 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин; посев производили при плотности 80 000 клеток на лунку в 96-луночном планшете. Клетки инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C с активностью от 0 до 40 кБк/мл  $^{227}\text{Th}$ -AGC2518 и соответствующим образцом конъюгата  $^{227}\text{Th}$  изотипического контроля. Затем клетки промыли свежей средой, и произвели посев в новый 96-луночный культуральный планшет. Спор клеток производился через пять и через семь дней, и производились измерения жизнеспособности клеток с использованием набора CellTiterGlo (Promega). Жизнеспособность выражалась в процентах, при этом жизнеспособность положительного контроля (необработанных клеток) принимали за 100%, см. фиг. 7.

Пример 7. Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC2418 в отношении клеток HT29.

Пример 7 а). Получение мезотелин-моноклонального антитела (BAY 86-1903; AGC2400).

Получение моноклонального антитела BAY 86-1903, которое далее по тексту настоящего документа именуется "AGC2400", подробно описано в документе WO 2009068204. Вкратце, антитело было получено после биопаннинга на антигене мезотелин. Полученное IgG1-антитело человека экспрессировали в клетках яичников китайского хомячка (CHO) и очистили с использованием колонки для аффинной хроматографии со связыванием белка A (MAb Select Sure), затем следовало удаление агрегатов с использованием колонки для гидрофобной хроматографии (Toyopearl Butyl 600M). Антитело объединили с PBS, pH 7,5.

Пример 7 б). Сочетание mAb AGC2400 с хелатором AGC0019 (соединение формулы (VIII)) с получением конъюгата AGC2418.

Производили корректировку значения pH содержащего антитело раствора до pH 7,5. Хелатор AGC0019 растворили в 1:1, DMA: 0,1 М MES буфера, pH 5,4. NHS и EDC растворили в 0,1 М MES буфера, pH 5,4. Получили 1/1/3 молярный эквивалентный раствор хелатора/NHS/EDC для активации хелатора. Для конъюгации с антителом активированный хелатор в молярном отношении 16,5/16,5/49,5/1 (хелатор/NHS/EDC/mAb) добавили к mAb. Через 30 мин, реакцию конъюгации резко охладили 12% (по объему) 0,3 М лимонной кислоты для регулирования pH до 5,5. Реакционный образец далее загрузили на колонку HiLoad 16/600 Superdex 200 (предварительного класса) для выделения мономерных фракций с использованием 30 мМ цитрата, 70 мМ NaCl, pH 5,5 в качестве подвижной фазы. В конце хроматографии, конъюгат антитела AGC2418 сконцентрировали до 2,5 мг/мл в 30 мМ цитрата, 70 мМ NaCl, 2 мМ EDTA и 0,5 мг/мл pABA. Все процедуры описаны в RD.2014.111, Журнал № 211/160, 140814 AEF.

Пример 7 с). Получение дозы  $^{227}\text{Th}$ -AGC2418.

Содержимое пробирки с 20 МБк пленки хлорида тория-227 растворили в 2 мл 8 М раствора  $\text{HNO}_3$  и оставили на 15 мин перед тем, как раствор извлекли и нанесли на анионообменную колонку для удаления тория-223, образовавшегося за это время. Колонку промыли 3 мл 8 М  $\text{HNO}_3$  и 1 мл воды перед элюированием тория-227 с использованием 3 мл 3 М HCl. Производили измерение элюционной активности тория-227, и дозу 10 МБк перенесли в пустую стеклянную пробирку объемом 10 мл. Затем испарили кислоту путем использования вакуумного насоса и помещения пробирки на нагревательный блок (с настройкой температуры на 120°C) на 30-60 мин. После достижения комнатной температуры добавили 6 мл AGC2418 конъюгата 2,5 мг/мл для введения радиоактивных изотопов. Содержимое пробирки осторожно перемешали и оставили на 15 мин при комнатной температуре. Затем производили стерилизующую фильтрацию раствора в стерильную пробирку, и производили отбор образца для осуществления анализа iTLC (моментальной тонкослойной хроматографии) для определения радиохимической чистоты перед использованием.

Пример 7 д). Цитотоксичность  $^{227}\text{Th}$ -AGC2418 в отношении клеток HT29 со сверхэкспрессией антигена мезотелина с другой общей активностью.

Для демонстрации цитотоксичности  $^{227}\text{Th}$ -AGC2418 после связывания с мезотелин+-клетками осуществляли анализ цитотоксичности *in vitro*. Для этого человеческую линию клеток колоректального рака HT29, трансфицированную антигеном мезотелином, подвергали воздействию  $^{227}\text{Th}$ -AGC2418. Производили тестирование общей активности в 12 точках в трехкратном разбавлении, начиная с 5 кБк/мл при специфической активности 10 кБк/мкг. Параллельно был получен несвязанный изотипический контроль. Все экспериментальные процедуры описаны в RD2014.154. Вкратце, было получено 200 000 человеческих HT29 клеток/мл в среде RPMI 1640 с использованием 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин 1%  $\text{NaHCO}_3$ , 600 мкг/мл гидромицина В; посев производили при плотности 40 000 клеток на лунку в 96-луночном планшете. Клетки инкубировали в течение 6 дней при температуре 37°C с активностью от 0 до 40 кБк/мл  $^{227}\text{Th}$ -AGC2418 и соответствующим образцом конъюгата  $^{227}\text{Th}$  изотипического контроля. Сбор клеток производился на шестой день, и производились измерения жизнеспособности клеток с использованием набора CellTiterGlo (Promega). Жизнеспособность выражалась в процентах, при этом жизнеспособность положительного контроля (необработанных клеток) принимали за 100%.

Пример 8.

Сравнение стабильности амидных и изоцианат-связанных конъюгатов AGC1118 и соответствующий конъюгат с изоцианатным соединительным фрагментом (AGC1115) хранили в водном растворе при 40°C в течение 11 дней. Периодически производили отбор образцов.

Образцы 40°C, нормализованные до точки отбора 4°C

	AGC1118	AGC1115
	CAR (% норм.)	CAR (% норм.)
День 0	100	100
День 5	105	92
День 11	103	88

Из таблицы, приведенной выше видно, что для амид-связанного конъюгата поддающегося измерению снижения концентрации конъюгата не наблюдалось. Напротив, концентрация изоцианатного конъюгата снизилась на 8% через 5 дней и на 12% через 11 дней.

Пример 9.

Пример 9 а). Получение PSMA моноклонального антитела (AGC1000).

PSMA моноклональное антитело, которое далее по тексту настоящего документа именуется "AGC1000", было приобретено у компании Progenics, США.

Пример 9 б). Сочетание mAb AGC1000 с хелатором AGC0019 (соединение формулы (VIII)) с получением конъюгата AGC1018.

Производили корректировку значения pH содержащего антитело раствора до pH 7,5. Хелатор AGC0019 растворили в 1:1, DMA: 0,1 М MES буфера, pH 5,5. NHS и EDC растворили в 0,1 М MES буфера, pH 5,5. Получили 1/1/2 молярный эквивалентный раствор хелатора/NHS/EDC для активации хелатора. Для конъюгации с антителом активированный хелатор в молярном отношении 20/20/40/1 (хелатор/NHS/EDC/mAb) добавили к mAb 4 порциями с промежутком 10 мин между каждой порцией. Через 50 мин, реакцию конъюгации резко охладили 12% (по объему) 1 М TRIS, pH 7,3. Конъюгат очистили и произвели замену буфера путем тангенциальной поточной фильтрации (TFF). Рецептурный буфер: 30 мМ цитрата, 70 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 0,5 мг/мл pABA, pH 5,5. В конце диафильтрации раствор вылили в емкость, и концентрация регулировалась до 2,7 мг/мл. Наконец, основной объем раствора профильтровали через стерильный фильтр с размером пор 0,2 мкм и перенесли в стерильные пробирки для хранения при -20°C.

Пример 9 с). Получение дозы инъекции <sup>227</sup>Th-AGC1018.

Содержимое пробирки с приблизительно 50 МБк пленки хлорида тория-227 растворили в 2 мл 8 М раствора HNO<sub>3</sub> и оставили на 15 мин перед тем, как раствор извлекли и нанесли на анионообменную колонку для удаления радия-223, образовавшегося за это время. Колонку промыли 3 мл 8 М HNO<sub>3</sub> и 1 мл воды перед элюированием тория-227 с использованием 3 мл 3 М HCl. Затем элюат HCl испарили с использованием вакуумного насоса и нагревательного блока (с настойкой температуры на 100°C) на 60-90 мин. Производили измерение активности высушенного Th-227 в дозкалибраторе. Сухой Th-227 растворили в 0,05 М HCl с получением концентрации 0,5 МБк/мкл. Для введения радиоактивных изотопов конъюгат AGC1018 разбавили в рецептурном буфере для получения 25 мкг mAb в 200 мкл. С раствором AGC1018 смешали 1 МБк Th-227, и производилось точное измерение активности Th-227 с помощью германиевого детектора. Осуществлялось хелатообразование в течение 30-60 мин при комнатной температуре до стерилизующей фильтрации в стерильную пробирку. Производили отбор образца для осуществления анализа iTLC (моментальной тонкослойной хроматографии) для определения радиохимической чистоты перед использованием.

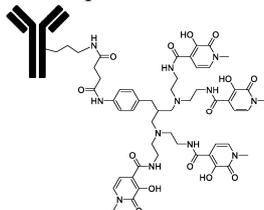
Пример 9 d). Цитотоксичность <sup>227</sup>Th-AGC1018 в отношении клеток LNCaP, экспрессирующих PSMA.

Для демонстрации цитотоксичности <sup>227</sup>Th-AGC1018 после связывания с PSMA-положительными клетками осуществляли анализ цитотоксичности *in vitro*. Для этого человеческая линия клеток рака предстательной железы LNCaP подвергалась воздействию <sup>227</sup>Th-AGC1018. Производили тестирование общей активности в 12 точках в трехкратном разбавлении, начиная с 20 кБк/мл при специфической активности 40 кБк/мкг. Параллельно был получен несвязанный изотипический контроль. Все экспериментальные процедуры описаны в архиве RD.2015.101.

Вкратце, культивирование клеток LNCaP человека осуществлялось в RPMI1640-среде с добавлением 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин. Плотность посева составляла 2500 клеток на лунку в 96-луночном планшете. Через 24 ч после посева (день 1), клетки подвергали воздействию изотипического контроля <sup>227</sup>Th-AGC1018 и <sup>227</sup>Th при общей активности в диапазоне 0-20 кБк/мл в течение 5 дней при 37°C. Сбор клеток производился на шестой день, и производились измерения жизнеспособности клеток с использованием набора CellTiterGlo (Promega). Жизнеспособность выражалась в процентах, при этом жизнеспособность положительного контроля (необработанных клеток) принимали за 100%.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс тория, нацеленный на ткань, представляющий собой соединение, включающее



причем указанный нацеленный на ткань фрагмент  представляет собой моноклональное антитело, выбранное из hLL2 (эпратузумаб), NuM195 (линтузумаб), трастузумаба, BAY 1179470 и BAY 86-1903 (мезотелин); и

4+ ион радионуклида тория  $^{227}\text{Th}$ , излучающего альфа-частицы.

2. Комплекс тория, нацеленный на ткань, по п.1, содержащий указанное моноклональное антитело, нацеленное на ткань, включающее по меньшей мере одну пептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере с 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере с одной из следующих последовательностей:

Легкая цепь:

DIQLTQSPSSLAVSAGENVTMSCKSSQSVLYSANHKNYLAWYQKPGQ

SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGTDFTLTISRVQVEDLAIYYCHQYL

SSWTFGGGTKLEIKR (SeqID1)

DIQLTQSPSSLASAVEDRTMSCKSSQSVLYSANHKNYLAWYQKPGQ

KAKLLIYWASTRESGVPSRFRSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCHQYL

SSWTFGGGTKLEIKR (SeqID2)

Тяжелая цепь:

QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFTSYWLHWIKORPGGLEWI

GYINPRNDYTEYNQNFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC

ARRDITTFYWGQTTTVSS (SeqID3)

QVQLQESGAEVKPKGSSVKVSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGGLEW

IGYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFC

ARRDITTFYWGQTTTVSS (SeqID4)

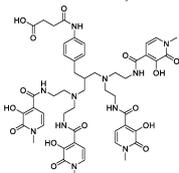
QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGGLEW

IGYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFC

ARRDITTFYWGQTTTVSS (SeqID5).

3. Способ образования комплекса тория, нацеленного на ткань, при этом указанный способ включает следующие этапы:

а) образование октадентатного хелатора AGC0019, имеющего следующую структуру:



б) соединение указанного октадентатного хелатора по меньшей мере с одним нацеленным на ткань фрагментом, содержащим по меньшей мере один аминный фрагмент, с помощью по меньшей мере одного реагента, связывающего амиды, выбранного из N-гидроксиимидов, карбодиимида и/или азодикарбоксилат-активирующих реагентов,

причем получают нацеленный на ткань хелатор,

причем указанный нацеленный на ткань фрагмент представляет собой моноклональное антитело, выбранное из hLL2 (эпратузумаб), NuM195 (линтузумаб), трастузумаба, BAY 1179470 и BAY 86-1903 (мезотелин); и

с) приведение в контакт указанного нацеленного на ткань хелатора с водным раствором, содержащим 4+ ион радионуклида тория  $^{227}\text{Th}$ , излучающего альфа-частицы.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что этап б) осуществляют в водном растворе.

5. Способ по п.3 или 4, отличающийся тем, что указанным реагентом, связывающим амиды, является карбодиимид-связывающий реагент, выбранный из 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC), N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC) или N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC).

6. Способ по любому из пп.3-5, отличающийся тем, что этап б) осуществляют в водном растворе при значении pH в диапазоне 4-9.

7. Способ по любому из пп.3-6, отличающийся тем, что этап б) осуществляют при температуре 15-50°C в течение 5-120 мин.

8. Способ по любому из пп.3-7, отличающийся тем, что этап с) осуществляют при температуре 15-50°C в течение 1-60 мин.

9. Фармацевтическая препаративная форма для лечения гиперпластических или неопластических заболеваний, содержащая по меньшей мере один комплекс тория, нацеленный на ткань, по п.1 или 2 в терапевтически эффективном количестве.

10. Фармацевтическая препаративная форма по п.9, дополнительно содержащая цитратный буфер.

11. Фармацевтическая препаративная форма по п.9 или 10, дополнительно содержащая парааминомасляную кислоту (ПАВА) и, при необходимости, EDTA (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и/или по меньшей мере один полисорбат.

12. Применение комплекса тория, нацеленного на ткань, по п.1 или 2 для производства лекарственного средства для лечения гиперпластических или неопластических заболеваний.

13. Применение фармацевтической препаративной формы по любому из пп.9-11 для производства лекарственного средства для лечения гиперпластических или неопластических заболеваний.

14. Применение по п.12 или 13, отличающееся тем, что указанным заболеванием является карцинома, саркома, миелома, лейкемия, лимфома или рак смешанного типа, рак молочной железы, рак эндометрия, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак предстательной железы или мозга, мезотелиома, рак яичников, легких или поджелудочной железы.

15. Применение по п.14, причем рак смешанного типа представляет собой неходжкинскую лимфому или В-клеточные неоплазмы.

16. Способ лечения гиперпластических или неопластических заболеваний у человека или животного, включающий введение по меньшей мере одного комплекса тория, нацеленного на ткань, по п.1 или 2 в терапевтически эффективном количестве или по меньшей мере одной фармацевтической препаративной формы по любому из пп.9-11.

17. Способ по п.16, причем гиперпластическое или неопластическое заболевание выбрано из карциномы, саркомы, миеломы, лейкемии, лимфомы или рака смешанного типа, рака молочной железы, рака эндометрия, рака желудка, острого миелоидного лейкоза, рака предстательной железы или мозга, мезотелиомы, рака яичников, легких или поджелудочной железы.

18. Способ по п.17, причем рак смешанного типа представляет собой неходжкинскую лимфому или В-клеточные неоплазмы.

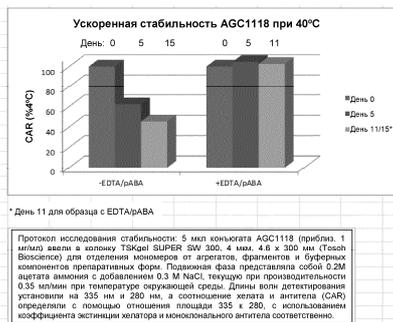
19. Применение комплекса тория, нацеленного на ткань, по п.1 или 2 для лечения гиперпластического и/или неопластического заболевания.

20. Применение фармацевтической препаративной формы по любому из пп.9-11 для лечения гиперпластического и/или неопластического заболевания.

21. Применение по п.19 или 20, причем гиперпластическое и/или неопластическое заболевания выбраны из карциномы, саркомы, миеломы, лейкемии, лимфомы или рака смешанного типа, рака молочной железы, рака эндометрия, рака желудка, острого миелоидного лейкоза, рака предстательной железы или мозга, мезотелиомы, рака яичников, легких или поджелудочной железы.

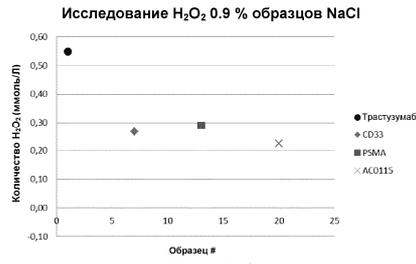
22. Применение по п.21, причем рак смешанного типа представляет собой неходжкинскую лимфому или В-клеточные неоплазмы.

Данные, демонстрирующие стабилизирующий эффект EDTA/ПАВА на конъюгат антитела AGC1118 в растворе

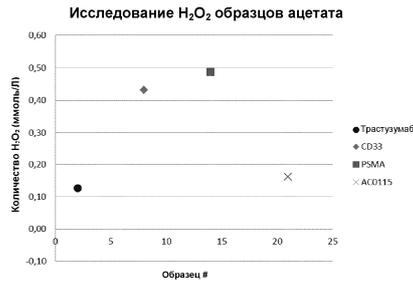


Фиг. 1

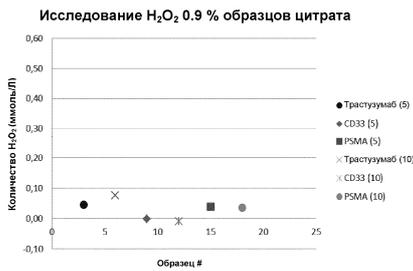
Эффект на уровни пероксида водорода различных буферов, содержащих конъюгаты антитела НОРО, облученных излучением 10 кГр: а) - NaCl, б) - ацетат, с) - цитрат



Фиг. 2а)

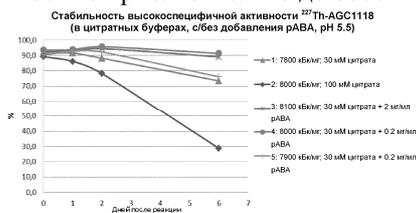


Фиг. 2б)



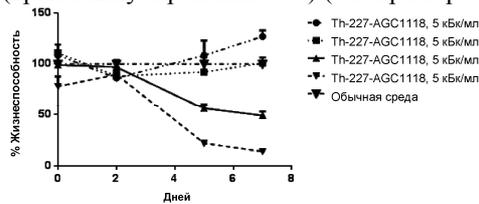
Фиг. 2с)

Радиостабилизирующий эффект <sup>227</sup>Th-AGC1118 (анализ методом инфракрасной флуоресценции) со специфической активностью приблизительно до 8000 Бк/мкг



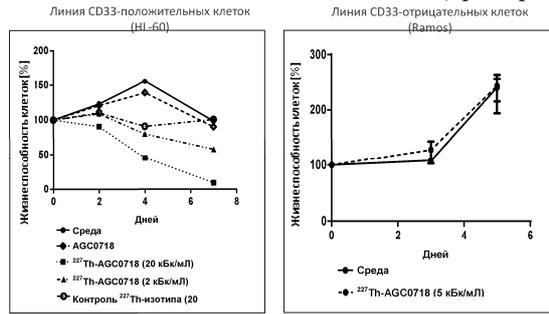
Фиг. 3

Цитотоксичность <sup>227</sup>Th-AGC1118 в отношении Ramos с другой общей активностью (время инкубирования: 4 ч) (см. пример 3)



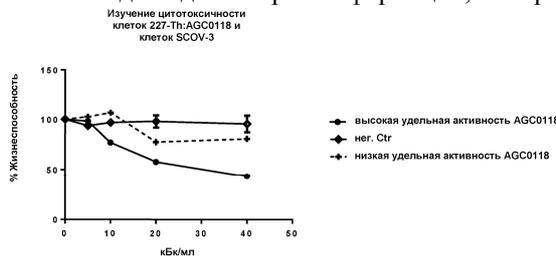
Фиг. 4

<sup>227</sup>Th-AGC0718 индуцирует избирательное уничтожение CD33-положительных клеток in vitro (пример 4)



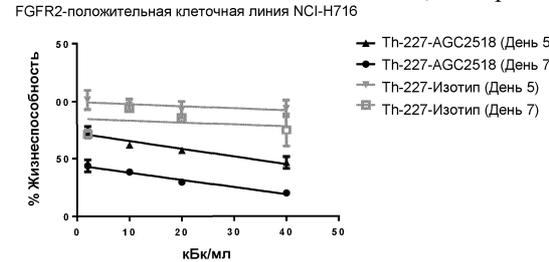
Фиг. 5

Цитотоксичность <sup>227</sup>Th-AGC0118 при высокой (20 кБк/мкг) и низкой (7,4 кБк/мкг) специфической активности. Негативным контролем являлся комплекс пептид-альбумин со слабой связью с аналогичной дозировкой, временем инкубации и количеством дней до выборки информации, см. пример 5



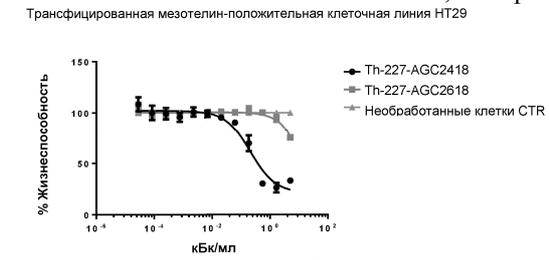
Фиг. 6

<sup>227</sup>Th-AGC2518 индуцирует избирательное уничтожение FGFR2-положительных клеток in vitro, см. пример 6



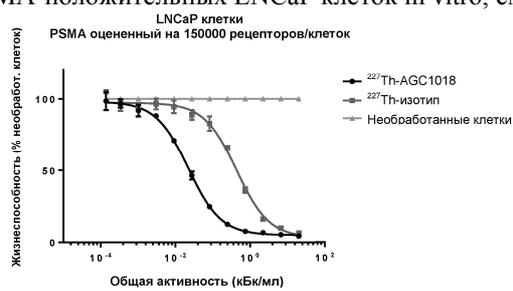
Фиг. 7

<sup>227</sup>Th-AGC2418 индуцирует избирательное уничтожение мезотелин-положительных клеток in vitro, см. пример 7



Фиг. 8

$^{227}\text{Th}$ -AGC1018 индуцирует избирательное и дозозависимое уничтожение клеток PSMA-положительных LNCaP клеток *in vitro*, см. пример 9



Фиг. 9

