

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292704** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.13

(51) Int. Cl. **A61K 51/04** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.23

(54) НАЦЕЛЕННЫЕ НА FGFR3 РАДИОИММУНОКОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/993,622**

(32) **2020.03.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/023755**

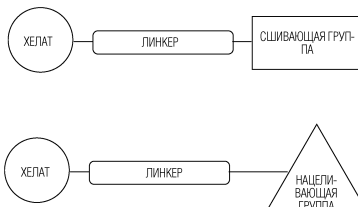
(87) **WO 2021/195131 2021.09.30**

(71) Заявитель:
**ФБЮЖН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНК. (CA)**

(72) Изобретатель:
**Швабиш Марк, Гринштейн Натали
(US), Бьюрак Эрик Стивен (CA)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Радиоиммуноконъюгаты, включающие хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом, линкер и фрагмент, нацеливающий на FGFR3. Фармацевтические композиции таких радиоиммуноконъюгатов и способы лечения состояний, например рака, с использованием таких фармацевтических композиций.



A1

202292704

202292704

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575960EA/061

НАЦЕЛЕННЫЕ НА FGFR3 РАДИОИММУНОКОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/993622, поданной 23 марта 2020 г., полное содержание которой таким образом полностью включено для всех целей посредством ссылки.

СПИСКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] В настоящем спецификации приведена ссылка на Списки последовательностей (представленные в электронной форме в виде файла с расширением.txt и с названием «FPI_012_Sequence_Listing.txt» от 23 марта 2021 г.). Файл с расширением.txt был создан 22 марта 2021 г. и имеет размер 8 Кбайт. Полное содержание Списков последовательностей включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Факторы роста фибробластов (FGF) и их рецепторы (FGFR) играют решающую роль во время эмбрионального развития, тканевого гомеостаза и метаболизма. У человека имеется 22 FGF (FGF1-14, FGF16-23) и четыре рецептора FGF с тирозинкиназным доменом (FGFR1-4). FGFR состоят из внеклеточной лиганд-связывающей области с двумя или тремя иммуноглобулиноподобными доменами (IgD1-3), одной трансмембранной области и цитоплазматического разделенного тирозинкиназного домена. FGF и их рецепторы регулируют широкий спектр клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, миграцию и выживание, зависимым от окружения образом. FGFR сверхэкспрессируются при многих типах рака, часто из-за мутаций, которые вызывают конститутивную активацию.

[0004] Аберрантно активированные FGFR вовлечены в специфические злокачественные новообразования человека. Например, хромосомная транслокация t(4; 14) (p16.3;q32) встречается примерно у 15-20% пациентов с множественной миеломой, что приводит к сверхэкспрессии FGFR3 и коррелирует с более короткой общей выживаемостью. FGFR3 участвует в получении химиорезистентности клеточными линиями миеломы в культуре, что согласуется с плохим клиническим ответом пациентов t(4; 14)+ на обычную химиотерапию. Сверхэкспрессии мутационно активированного FGFR3 достаточно, чтобы вызвать онкогенную трансформацию в гемопоэтических клетках и фибробластах, моделях трансгенных мышей и моделях трансплантации мышиног костного мозга. Онкогенные слитые белки FGFR3-TACC3 (FGFR3 и трансформирующий кислый суперскрученный белок 3) также наблюдались в ряде глиобластом и других видов рака, и предварительные данные свидетельствуют о том, что такие опухоли могут быть чувствительны к ингибированию FGFR. Кроме того, геномные изменения, которые активируют FGFR3, часто встречаются при раке мочевого пузыря,

включая метастатическую уротелиальную карциному мочевого пузыря.

Таким образом, FGFR3 был предложен в качестве потенциальной терапевтической мишени для лечения рака. Несколько низкомолекулярных ингибиторов, нацеленных на FGFR, продемонстрировали цитотоксичность против FGFR3-позитивных клеток миеломы в культуре и на мышинных моделях. Однако эти небольшие молекулы не являются селективными в отношении FGFR3 и проявляют ингибирующую активность в отношении некоторых других киназ.

[0006] Таким образом, сохраняется потребность в улучшенных терапевтических средствах (например, противораковых терапевтических средствах), которые могут воздействовать на FGFR3.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение относится к радиоиммуноконъюгатам, нацеленным на FGFR3 (например, FGFR3 человека, включая FGFR3 дикого типа и/или мутантный), их фармацевтическим композициям и к способам лечения рака с использованием таких фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления предложенные радиоиммуноконъюгаты демонстрируют повышенную скорость экскреции (например, после введения млекопитающему) по сравнению с некоторыми известными в настоящее время радиотерапевтическими средствами, сохраняя при этом терапевтическую эффективность. В некоторых вариантах осуществления более быстрая экскреция может ограничивать нецелевую токсичность за счет ограничения времени, в течение которого радиоиммуноконъюгат остается в субъекте. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложенные иммуноконъюгаты проявляют сниженную нецелевую токсичность.

[0008] В некоторых вариантах осуществления предложен радиоиммуноконъюгат, содержащий следующую структуру:

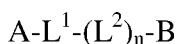
A-L-B

(Формула I-a)

где A представляет собой хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом, где B представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3, и где L представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления A представляет собой комплекс металла с хелатирующим фрагментом. В некоторых таких вариантах осуществления комплекс металла содержит радионуклид. В некоторых вариантах осуществления радионуклид представляет собой альфа-излучатель, например, альфа-излучатель, выбранный из группы, состоящей из астата-211 (^{211}At), висмута-212 (^{212}Bi), висмута-213 (^{213}Bi), актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), свинца-212 (^{212}Pb), тория-227 (^{227}Th) и тербия-149 (^{149}Tb) или их производных. В некоторых вариантах осуществления радионуклид представляет собой ^{225}Ac или его производное.

[0010] В некоторых вариантах осуществления L имеет структуру $-\text{L}^1-(\text{L}^2)_n-$, показанную в формуле I-b:



Формула I-b

где:

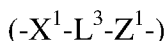
A представляет собой хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом;

B представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3;

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

n находится в диапазоне от 1 до 5 (включительно); и

каждый L^2 независимо имеет структуру:



Формула III

где:

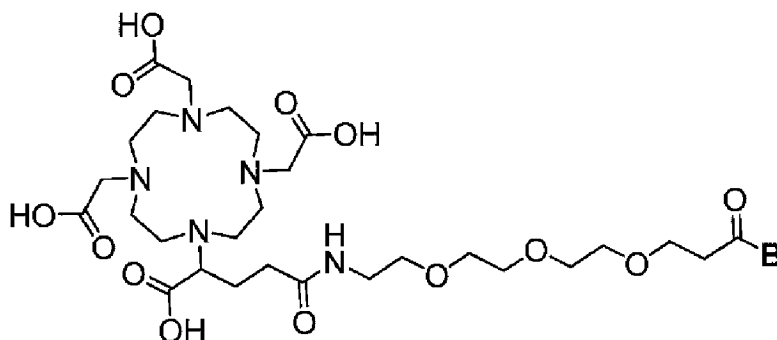
X^1 представляет собой $C=O(NR^1)$, $C=S(NR^1)$, $OC=O(NR^1)$, $NR^1C=O(O)$, $NR^1C=O(NR^1)$, $-CH_2PhC=O(NR^1)$, $-CH_2Ph(NH)C=S(NR^1)$, O или NR^1 ; и каждый R^1 независимо представляет собой H, необязательно замещенный C_1 - C_6 -алкил, необязательно замещенный C_1 - C_6 -гетероалкил или необязательно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

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

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

[0011] В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой C_5 - C_{20} -полиэтиленгликоль.

[0012] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат или его фармацевтически приемлемая соль имеют следующую структуру:



где B представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3.

[0013] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, имеет размер по меньшей мере 100 кДа, например, размер по меньшей мере 150 кДа, размер по меньшей мере 200 кДа, размер по меньшей мере 250 кДа или размер по меньшей мере 300 кДа.

[0014] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться с FGFR3 человека. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться с FGFR3 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться с мутантным FGFR3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться как с FGFR3 дикого типа, так и с мутантным FGFR3.

[0015] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 содержит точечную мутацию, например, точечная мутация связана с раком. В некоторых вариантах осуществления точечный мутант выбирают из группы, состоящей из FGFR3Y375C, FGFR3R248C, FGFR3S249C, FGFR3G372C, FGFR3K652E, FGFR3K652Q, FGFR3K652M и их комбинаций.

[0016] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 содержит слитый FGFR3. В некоторых вариантах осуществления слитый FGFR3 выбирают из группы, состоящей из FGFR3-TACC3, FGFR3-CAMK2A, FGFR3-JAKMOP1, FGFR3-TNIP2, FGFR3-WHSC1, FGFR3-BAIAP2L1 и их комбинаций.

[0017] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), выбранную из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или

аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере три CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0021] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере четыре CDR, выбранных из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере пять CDR, выбранных из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0024] В некоторых вариантах осуществления антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; а также

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от

SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0027] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[0028] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

[0029] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[0030] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и (ii) вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[0031] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и (ii) вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и (ii) вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и (ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

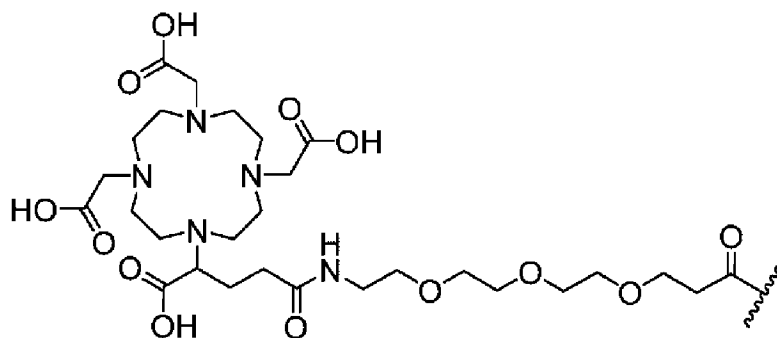
[0034] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой MFGR1877S (вофатамаб).

[0035] В некоторых вариантах осуществления после введения радиоиммуноконъюгата или его композиции млекопитающему доля радиации, выводимой кишечным путем, почечным путем или обоими путями, по меньшей мере в 2 раза превышает долю радиации, выводимой тем же путем (путями) сравнимым млекопитающим, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат.

[0036] В некоторых вариантах осуществления после введения радиоиммуноконъюгата или его композиции млекопитающему доля радиации, выводимой кишечным путем, почечным путем или обоими путями, по меньшей мере в 3 раза

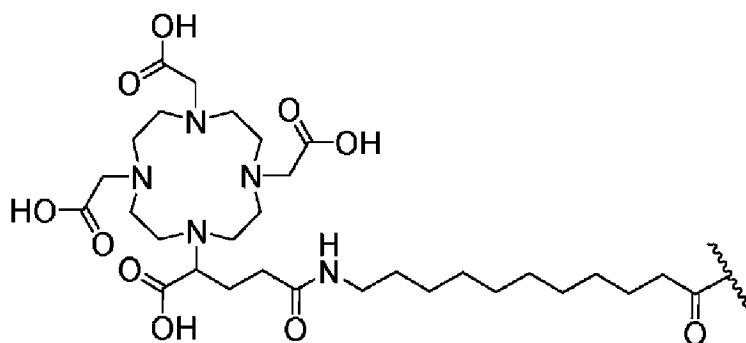
превышает долю радиации, выводимой тем же путем (путями) сравнимым млекопитающим, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат.

[0037] В некоторых вариантах осуществления А-Л- представляет собой комплекс металла с соединением, выбранным из группы, состоящей из:

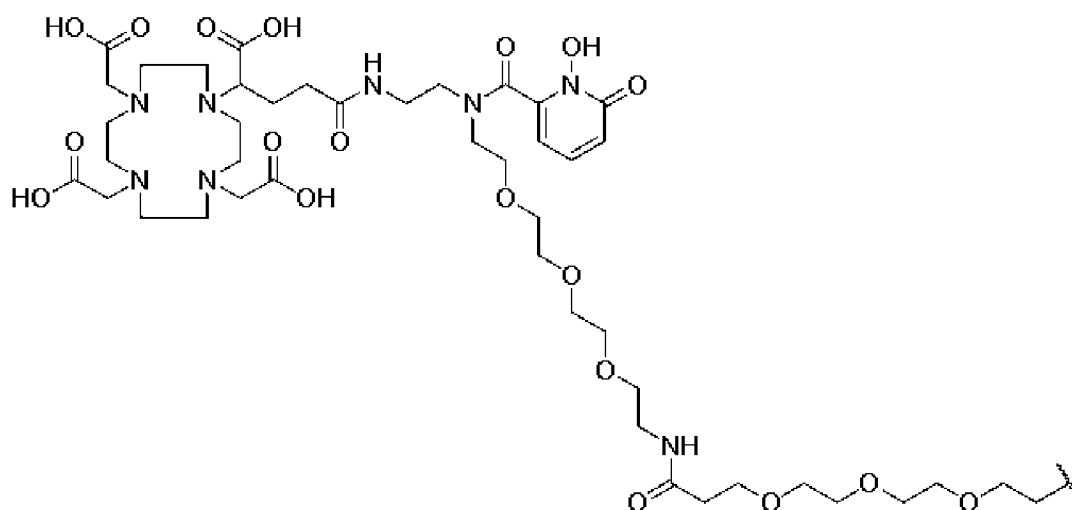


(i)

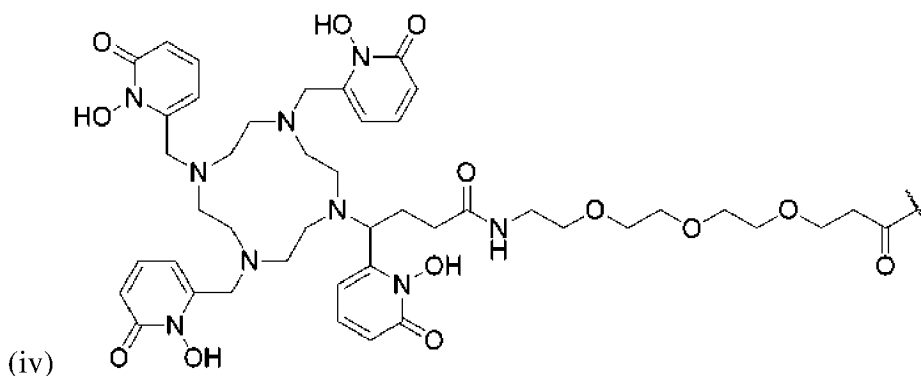
(Соединение 1),


$$(\ddot{11})$$

(Соединение 2),

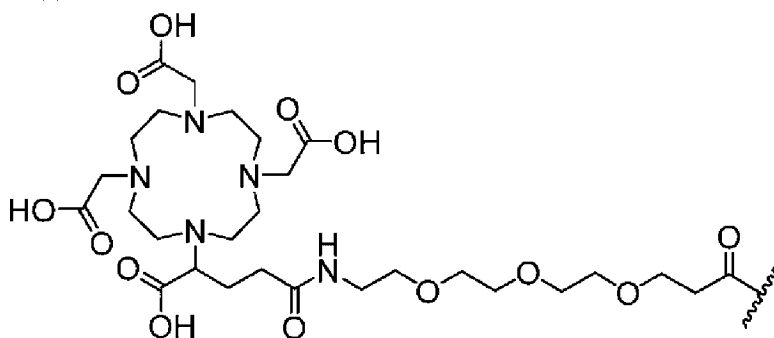
$$(\dot{\mathbf{i}}\dot{\mathbf{i}}\dot{\mathbf{i}})$$


(Соединение 3) и



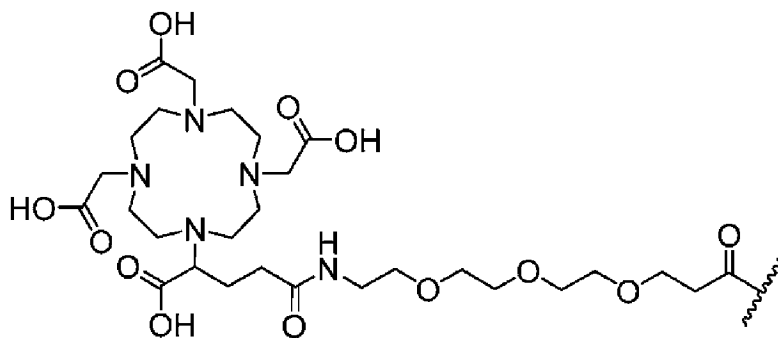
(Соединение 4).

[0038] В некоторых вариантах осуществления A-L- представляет собой комплекс металла с соединением:



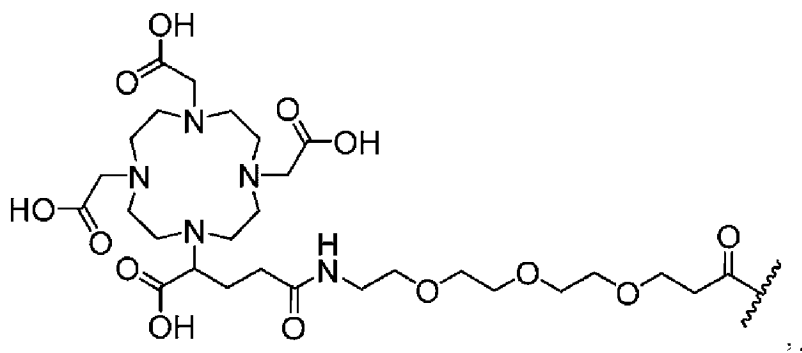
(Соединение 1)

[0039] В некоторых вариантах осуществления A-L- представляет собой комплекс металла с соединением



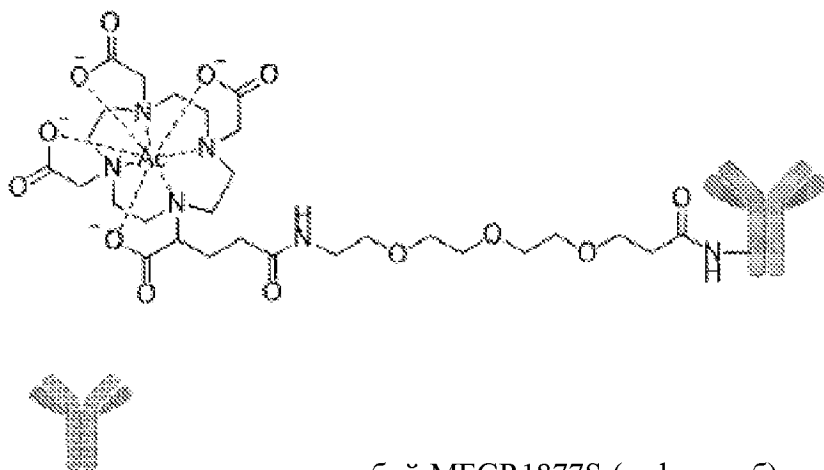
и комплекс металла содержит радионуклид, такой как альфа-излучатель (например, аstat-211 (^{211}At), висмут-212 (^{212}Bi), висмут-213 (^{213}Bi), актиний-225 (^{225}Ac), радий-223 (^{223}Ra), свинец-212 (^{212}Pb), торий-227 (^{227}Th) и тербий-149 (^{149}Tb) или их производные). В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

[0040] В некоторых вариантах осуществления A-L- представляет собой комплекс металла с соединением



причем комплекс с металлом содержит ^{225}Ac или его производное, а фрагмент, нацеливающий на FGFR3, представляет собой MFGR1877S (вофатамаб) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, представляет собой MFGR1877S (вофатамаб).

[0041] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат имеет следующую структуру:



где  представляет собой MFGR1877S (вофатамаб), где аминогруппа NH-, присоединенная к показанному выше антителу, относится к остатку лизина, который является частью антитела.

[0042] В некоторых вариантах осуществления предложены фармацевтические композиции, содержащие радиоиммуноконъюгат, описанный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0043] В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения рака, включающие в себя введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество радиоиммуноконъюгата, описанного в настоящем документе.

[0044] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например, человека.

[0045] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой аденокарциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, аденокарциному эндометрия, саркому

Юинга, карциному желчного пузыря, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, нейробластому, нейроэндокринный рак, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, аденоидно-кистозный рак слюнных желез или сперматоцитарную семиному. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой глиому. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой нейробластому. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой рак печени. В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой рак легкого.

[0046] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой несолидную раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой подвижную раковую опухоль или гематологический рак, например миелому (например, множественную миелому), лейкемию или лимфому.

[0047] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят системно. Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально, например, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, подкожно или внутрикожно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят энтерально, например, через желудочно-кишечный тракт или перорально.

[0048] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят местно, например, путем периопухолевой инъекции или внутриопухолевой инъекции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0049] Фиг. 1A представляет собой схему, изображающую общую структуру конъюгата, включающего хелат, линкер и нацеливающий фрагмент.

[0050] Фиг. 1B представляет собой схему, изображающую структуру [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3, иллюстративного радиоиммуноконъюгата, описанного в настоящем документе.

[0051] Фиг. 2 представляет собой схему, изображающую синтез бифункционального хелата, $4-\{[11\text{-оксо-}11-(2,3,5,6\text{-тетрафторфенокси})\text{ундецил}]\text{карбамоил}\}-2-[4,7,10\text{-трис(карбоксиметил)}-1,4,7,10\text{-тетраазациклододекан-1-ил}]\text{бутановой кислоты (соединения В)}$. Синтез соединения В описан в примере 2.

[0052] Фиг. 3 представляет собой схему, изображающую синтез бифункционального хелата, $4-\{[2-(2-[3\text{-оксо-}3-(2,3,5,6\text{-тетрафторфенокси})\text{пропокси}]\text{этокси})\text{этил}]\text{карбамоил}\}-2-[4,7,10\text{-}$

трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1-ил]бутановой кислоты (соединения С). Синтез соединения С описан в примере 4.

[0053] Фиг. 4А-4С представляют собой кривые связывания немеченого DOTA-анти-FGFR3 с FGFR3-положительными опухолевыми клетками: RT4 (фиг. 4А), RT112 (фиг. 4В) и HerG2 (фиг. 4С). См. пример 16.

[0054] На фиг. 5 показан график, представляющий результаты исследований биораспределения у мышей, несущих ксенотрансплантатные опухоли RT4 (рака мочевого пузыря), и которым вводили [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 с помощью инъекций. Процент вводимой дозы на грамм ткани (% ВД/г) нанесен на ось абсцисс и показан для крови, почек, печени, легких, селезенки, кожи, опухоли и хвоста через 4, 24, 48, 96 и 168 часов. См. пример 17.

[0055] На фиг. 6А показан график, представляющий результаты исследований биораспределения у мышей с ксенотрансплантатными опухолями RT112 (рака мочевого пузыря), которым вводили [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3. % ВД/г отложен по оси абсцисс и показан для крови, кишечника, почек и надпочечников, печени и желчного пузыря, легких, селезенки, кожи, мочевого пузыря, мочи и опухоли через 4, 24, 48 и 96 часов. См. пример 18.

[0056] На фиг. 6В показан график, представляющий результаты исследований биораспределения у мышей с ксенотрансплантатными опухолями RT112 (рака мочевого пузыря), которым вводили [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 после предварительной дозы «холодного» анти-FGFR3. % ВД/г отложен по оси абсцисс и показан для крови, кишечника, почек и надпочечников, печени и желчного пузыря, легких, селезенки, кожи, мочевого пузыря, мочи и опухоли через 4, 24, 48 и 96 часов. Мыши получали предварительную дозу 100 мкг «холодного» (нерadioактивного, неконъюгированного) анти-FGFR3 антитела за 3 часа до введения [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3. См. пример 18.

[0057] На фиг. 7А-7С показаны графики, представляющие результаты исследований биораспределения у мышей, несущих ксенотрансплантатные опухоли RT112 (рака мочевого пузыря) и получавших совместное введение холодного анти-FGFR3 и [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3. % ВД/г отложен по оси абсцисс и показан для крови, кишечника, почек, печени, легких, селезенки, кожи, мочевого пузыря, мочи и опухоли через 24 и 96 часов. Мышам совместно вводили 50 мкг (фиг. 7А), 100 мкг (фиг. 7В) или 200 мкг (фиг. 7С) холодного анти-FGFR3; холодное анти-FGFR3 вводили одновременно с [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3. См. пример 19.

[0058] На фиг. 8А-8В показаны графики, представляющие результаты исследований биораспределения у мышей, несущих ксенотрансплантатные опухоли RT112 (рака мочевого пузыря) и получавших совместную дозу холодного анти-FGFR3 и либо [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 (фиг. 8А), либо [^{111}In]-DOTA-анти-FGFR3 (фиг. 8В). % ВД/г отложен по оси абсцисс и показан для крови, кишечника, почек, печени, легких, селезенки, кожи, мочевого пузыря и опухоли через 4, 24, 48, 96 и 168 часов. Мышам совместно вводили 100 мкг холодного анти-FGFR3 вместе с [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3.

См. пример 19.

[0059] Фиг. 9А и 9В представляют собой графики, показывающие относительные объемы опухолей (фиг. 9А) и относительную массу тела (фиг. 9В) у мышей, которые в начале эксперимента имели ксенотрансплантатные опухоли RT112. Относительные объемы опухоли (фиг. 9А) и относительная масса тела (фиг. 9В) показаны в различные моменты времени после лечения с помощью [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3. Мышам вводили предварительную дозу 100 мкг холодного анти-FGFR3 за 3 часа до введения [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3. См. пример 20.

[0060] Фиг. 10А и 10В представляют собой графики, показывающие относительные объемы опухолей (фиг. 10А) и относительную массу тела (фиг. 10В) у мышей, которые в начале эксперимента имели ксенотрансплантатные опухоли RT112. Относительные объемы опухоли (фиг. 10А) и относительная масса тела (фиг. 10В) показаны в различные моменты времени после лечения с помощью [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3. Мышам совместно вводили 100 мкг холодного анти-FGFR3. См. пример 21.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0061] Радиоиммуноконъюгаты предназначены для нацеливания на активирующийся при заболевании белок или рецептор для доставки радиоактивной полезной нагрузки с целью повреждения и уничтожения представляющих интерес клеток (радиоиммунотерапия). В процессе доставки такой полезной нагрузки в результате радиоактивного распада образуются альфа-, бета- или гамма-частицы или Оже-электроны, которые могут оказывать прямое воздействие на ДНК (например, осуществлять разрывы одноцепочечной или двухцепочечной ДНК) или косвенное воздействие, такое как феномены радиоиндуцированного воздействия (передачи радиационных сигналов от облученных клеток необлученным) или перекрестного воздействия (накопления радиационного излучения в клетках, не являющихся мишенями).

[0062] Радиоиммуноконъюгаты обычно содержат молекулу для биологического нацеливания (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфично связываться с FGFR3 человека), радиоизотоп и молекулу, которая связывает их. Конъюгаты образуются, когда бифункциональный хелат присоединяется к биологической молекуле-мишени, так что структурные изменения минимальны при сохранении сродства к мишени. После мечения радиоактивным изотопом образуется конечный радиоиммуноконъюгат.

[0063] Бифункциональные хелаты в структуре содержат хелат, линкер и нацеливающий фрагмент, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (фиг. 1). При разработке новых бифункциональных хелатов основное внимание уделяется хелатирующей части молекулы. Описано несколько примеров бифункциональных хелатов с различными циклическими и ациклическими структурами, конъюгированными с целевым фрагментом. [Bioconjugate Chem. 2000, 11, 510-519; Bioconjugate Chem. 2012, 23, 1029-1039; Mol Imaging Biol. 2011, 13, 215-221, Bioconjugate Chem. 2002, 13, 110-115.]

[0064] Одним из ключевых факторов разработки безопасных и эффективных

радиоиммуноконъюгатов является максимальное повышение эффективности при минимизации нецелевой токсичности в нормальных тканях. Хотя это утверждение является одним из основных принципов разработки новых лекарств, его применение в радиоиммунотерапии ставит новые задачи. Радиоиммуноконъюгатам не нужно блокировать рецептор, как это необходимо для терапевтического антитела, или высвободить цитотоксическую полезную нагрузку внутри клетки, как это требуется для конъюгата антитело-лекарственное средство, чтобы иметь терапевтическую эффективность. Однако испускание токсичной частицы является событием, которое происходит в результате распада первого порядка (радиоактивного) и может происходить случайным образом в любом месте тела после введения. Как только происходит излучение, может произойти повреждение окружающих клеток в пределах диапазона излучения, что может привести к потенциальной нецелевой токсичности. Следовательно, ограничение воздействия этих излучений на нормальные ткани является ключом к разработке новых лекарств.

[0065] Одним из возможных способов снижения нецелевого воздействия является более эффективное удаление радиоактивности из организма (например, из здоровых тканей организма). Одним из механизмов является увеличение скорости клиренса биологического нацеливающего агента. Этот подход, вероятно, требует определения способов сокращения периода полураспада биологического нацеливающего агента, который недостаточно хорошо описан для биологических нацеливающих агентов. Независимо от механизма, увеличение клиренса лекарственного средства также отрицательно повлияет на фармакодинамику/эффективность, поскольку более быстрое выведение лекарственного средства из организма снизит эффективную концентрацию в месте действия, что, в свою очередь, потребует более высокой общей дозы и не приведет к желаемой цели снижения общей радиоактивной дозы относительно здоровой ткани.

[0066] Другие усилия были сосредоточены на ускорении метаболизма части молекулы, которая содержит радиоактивный фрагмент. С этой целью были предприняты некоторые попытки увеличить скорость отщепления радиоактивного элемента от агентов биологического нацеливания с использованием так называемых «расщепляемых линкеров». Однако в отношении радиоконъюгатов термин расщепляемые линкеры имеет различные значения. Корнелиссен и др. описали расщепляемые линкеры как молекулы, с помощью которых бифункциональный конъюгат присоединяется к биологическому нацеливающему агенту через восстановленный цистеин, тогда как другие авторы описали использование ферментативно расщепляемых систем, которые требуют совместного введения радиоиммуноконъюгата с расщепляющим агентом/ферментом для высвобождения [Mol Cancer Ther. 2013, 12(11), 2472-2482; Methods Mol Biol. 2009, 539, 191-211; Bioconjug Chem. 2003, 14(5), 927-33]. Эти способы либо изменяют природу биологического нацеливающего фрагмента в случае цистеиновой связи, либо непрактичны с точки зрения разработки лекарств (ферментативно расщепляемые системы), поскольку в случае приведенных ссылок требуют введения двух агентов.

[0067] Настоящее изобретение обеспечивает, среди прочего, радиоиммуноконъюгаты, которые более эффективно удаляются из организма после катаболизма и/или метаболизма, сохраняя при этом терапевтическую эффективность. Описанные иммуноконъюгаты могут в некоторых вариантах осуществления обеспечивать снижение общей радиоактивности организма, например, за счет увеличения степени выведения продуктов катаболизма/метаболизма при сохранении фармакокинетики интактной молекулы по сравнению с известными бифункциональными хелатами. В некоторых вариантах осуществления это снижение радиоактивности является результатом клиренса побочных продуктов катаболизма/метаболизма без влияния на другие свойства *in vitro* и *in vivo*, такие как специфичность связывания (связывание *in vitro*), удержание клеток и поглощение опухолью *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложенные радиоиммуноконъюгаты обеспечивают снижение радиоактивности в организме человека при сохранении целевой активности.

Определения

[0068] Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится к полипептиду, аминокислотная последовательность которого включает иммуноглобулины и их фрагменты, которые специфично связываются с указанным антигеном или его фрагментами. Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть любого типа (например, IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) или подтипа (например, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). Специалистам в данной области будет понятно, что характерная последовательность или часть антитела может включать аминокислоты, присутствующие в одной или нескольких областях антитела (например, вариабельная область, гипервариабельная область, константная область, тяжелая цепь, легкая цепь и их комбинации). Более того, специалистам в данной области будет понятно, что характерная последовательность или часть антитела может включать одну или несколько полипептидных цепей и может включать элементы последовательности, встречающиеся в одной и той же полипептидной цепи или в разных полипептидных цепях.

[0069] Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части антитела, которая сохраняет характеристики связывания исходного антитела.

[0070] Используемый в настоящем документе термин «связывать» или «связывание» в отношении нацеливающего фрагмента означает по меньшей мере временное взаимодействие или ассоциацию с молекулой-мишенью, например, с FGFR3 человека и/или мутантным FGFR3, например, как описано в настоящем документе.

[0071] Термины «бифункциональный хелат» или «бифункциональный конъюгат», используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к соединению, которое содержит хелат или его комплекс с металлом, линкер и нацеливающий фрагмент, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. См., например, формулу I-a или фиг. 1.

[0072] Термин «рак» относится к любому раку, вызванному пролиферацией

злокачественных неопластических клеток, таких как опухоли, новообразования, карциномы, саркомы, лейкемии и лимфомы. «Солидная раковая опухоль» представляет собой рак, включающий аномальную массу ткани, например саркомы, карциномы и лимфомы. «Гематологический рак» или «подвижный рак», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, представляют собой рак, присутствующий в жидкостях организма, например, лимфомы и лейкемии.

[0073] Используемый в настоящем документе термин «хелат» относится к органическому соединению или его части, которые могут быть связаны с центральным атомом металла или радиоактивного металла в двух или нескольких точках.

[0074] Термин «конъюгат», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, которая содержит хелатирующую группу или ее комплекс с металлом, линкерную группу, и который необязательно содержит нацеливающий фрагмент, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0075] Используемый в настоящем документе термин «соединение» включает все стереоизомеры, геометрические изомеры и таутомеры изображенных структур.

[0076] Соединения, указанные или описанные в настоящем документе, могут быть асимметричными (например, иметь один или несколько стереоцентров). Все стереоизомеры, такие как энантиомеры и диастереомеры, являются предусмотренными, если не указано иное. Соединения, обсуждаемые в настоящем изобретении, которые содержат асимметрично замещенные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активных или рацемических формах. В данной области техники известны способы получения оптически активных форм из оптически активных исходных материалов, такие как разделение рацемических смесей или стереоселективный синтез.

[0077] Используемый в настоящем документе термин «детектирующий агент» относится к молекуле или атому, который полезен при диагностике заболевания путем обнаружения клеток, содержащих антиген. В данной области известны различные способы мечення полипептидов детектирующими агентами. Примеры средств обнаружения включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы и радионуклиды, красители (например, с комплексом биотин-стрептавидин), контрастные вещества, люминесцентные вещества (например, изотиоцианат флуоресцеина или FITC, родамин, люминофоры лантанидов, цианин и красители с излучение в дальнекрасном спектре) и магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния.

[0078] Используемый в настоящем документе термин «радионуклид» относится к атому, способному к радиоактивному распаду (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{47}Sc , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{89}Zr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{149}Pm , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{229}Th , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{201}Tl). Термины радиоактивный нуклид, радиоизотоп или радиоактивный изотоп также могут использоваться для описания радионуклида. Радионуклиды могут быть использованы в качестве агентов обнаружения, как описано в настоящем документе. В некоторых

вариантах осуществления радионуклид может представлять собой альфа-излучающий радионуклид.

[0079] Термин «эффективное количество» агента (например, любого из вышеперечисленных конъюгатов), используемый в настоящем документе, представляет собой количество, достаточное для достижения полезных или желаемых результатов, таких как клинические результаты, и, как таковой, термин «эффективное количество» зависит от контекста, в котором он применяется. Например, в терапевтических применениях «эффективное количество» может быть количеством, достаточным для излечения или, по крайней мере, частичного купирования симптомов расстройства и его осложнений и/или для существенного улучшения по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или медицинским состоянием. условие. Например, при лечении рака терапевтически эффективным будет агент или соединение, которое уменьшает, предотвращает, задерживает, подавляет или останавливает любой симптом заболевания или состояния. Терапевтически эффективное количество агента или соединения не требуется для излечения заболевания или состояния, но может, например, обеспечить лечение заболевания или состояния таким образом, что начало заболевания или состояния отсрочено, затруднено или предотвращено, например, уменьшаются симптомы заболевания или состояния, или изменяется продолжительность заболевания или состояния. Например, заболевание или состояние может стать менее тяжелым, и/или выздоровление индивидуума может ускориться. Эффективное количество можно вводить путем введения однократной дозы или нескольких (например, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или по меньшей мере шести) доз.

[0080] Термин «иммуноконъюгат», используемый в настоящем документе, относится к конъюгату, который включает нацеливающий фрагмент, такой как антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), нанотело, аффитело или консенсусную последовательность из домена фибронектина III типа. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит в среднем по меньшей мере 0,10 конъюгата на нацеливающий фрагмент (например, в среднем по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 4, 5 или 8 конъюгатов на нацеливающую группу).

[0081] Термин «радиоконъюгат», используемый в настоящем документе, относится к любому конъюгату, который включает радиоизотоп или радионуклид, такой как любой из радиоизотопов или радионуклидов, описанных в настоящем документе.

[0082] Термин «радиоиммуноконъюгат», используемый в настоящем документе, относится к любому иммуноконъюгату, который включает радиоизотоп или радионуклид, такой как любой из радиоизотопов или радионуклидов, описанных в настоящем документе. Термин «радиоиммунотерапия», используемый в данном документе, относится к способу применения радиоиммуноконъюгата для получения терапевтического эффекта. В некоторых вариантах осуществления радиоиммунотерапия может включать введение радиоиммуноконъюгата субъекту, нуждающемуся в этом, при этом введение

радиоиммуноконъюгата вызывает терапевтический эффект у субъекта. В некоторых вариантах осуществления радиоиммунотерапия может включать введение радиоиммуноконъюгата в клетку, при этом введение радиоиммуноконъюгата убивает клетку. В тех случаях, когда радиоиммунотерапия включает избирательное уничтожение клетки, в некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой раковую клетку у субъекта, страдающего раком.

[0083] Термин «фармацевтическая композиция», используемый в данном документе, представляет собой композицию, содержащую описанный в настоящем документе радиоиммуноконъюгат в составе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция производится или продается с одобрения государственного регулирующего органа как часть терапевтического режима лечения заболевания у млекопитающего. Фармацевтические композиции могут быть изготовлены, например, для перорального введения в виде стандартной лекарственной формы (например, таблеток, капсул, каплет, желатиновых капсул или сиропа); для местного применения (например, в виде крема, геля, лосьона или мази); для внутривенного введения (например, в виде стерильного раствора, не содержащего вызывающих эмболию частиц, и в системе растворителей, пригодной для внутривенного введения); или в любом другом составе, описанном в настоящем документе.

[0084] «Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество», используемое в настоящем документе, относится к любому ингредиенту, отличному от соединений, описанных в настоящем документе (например, носителю, способному суспендировать или растворять действующее соединение) и нетоксичному и не вызывающему воспаление у пациента. Вспомогательные вещества могут включать, например: антиадгезивы, антиоксиданты, связующие вещества, покрытия, компрессионные добавки, разрыхлители, красители (цветные агенты), смягчающие средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, ароматизаторы, отдушки, способствующие скольжению вещества (усилители текучести), смазывающие вещества, консерванты, печатные краски, радиопротекторы, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие агенты, подсластители или воду для гидратации. Примеры наполнителей включают, но не ограничиваются ими: аскорбиновую кислоту, гистидин, фосфатный буфер, бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кроскармеллозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, карбоксиметилцеллюлозу натрия, цитрат натрия, крахмалгликолят натрия, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, стеариновую кислоту, сахарозу,

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

[0085] Термин «фармацевтически приемлемая соль», используемый в настоящем документе, представляет те соли соединений, описанных в настоящем документе, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения или аллергической реакции. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, фармацевтически приемлемые соли описаны в: Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977 and in Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Соли могут быть получены *in situ* во время окончательного выделения и очистки описанных в настоящем документе соединений или отдельно путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой.

[0086] Соединения по изобретению могут иметь ионизируемые группы, чтобы их можно было получать в виде фармацевтически приемлемых солей. Эти соли могут представлять собой соли присоединения кислот, включающие неорганические или органические кислоты, или в случае кислых форм соединений по изобретению соли могут быть получены из неорганических или органических оснований. Часто соединения получают или используют в виде фармацевтически приемлемых солей, полученных в виде продуктов присоединения фармацевтически приемлемых кислот или оснований. Подходящие фармацевтически приемлемые кислоты и основания хорошо известны в данной области техники, такие как соляная, серная, бромистоводородная, уксусная, молочная, лимонная или винная кислоты для образования солей присоединения кислот, а также гидроксид калия, гидроксид натрия, гидроксид аммония, кофеин, различные амины для образования солей присоединения оснований. Способы получения соответствующих солей хорошо известны в данной области.

[0087] Типичные соли присоединения кислот включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат, валерат и другие соли. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций и магний, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь ими, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин и этиламин.

[0088] Термин «полипептид», используемый в настоящем документе, относится к цепочке из по меньшей мере двух аминокислот, соединенных друг с другом пептидной

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

[0089] Под «субъектом» подразумевается человек или животное (например, млекопитающее).

[0090] Под «существенной идентичностью» или «практически идентичным» подразумевается полипептидная последовательность, которая имеет такую же полипептидную последовательность, соответственно, что и эталонная последовательность, или имеет определенный процент аминокислотных остатков, соответственно, которые являются одинаковыми в соответствующем месте в эталонной последовательности, когда две последовательности оптимально выровнены. Например, аминокислотная последовательность, которая «по существу идентична» эталонной последовательности, имеет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с эталонной аминокислотной последовательностью. Для полипептидов длина сравнительных последовательностей обычно составляет не менее 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 смежных аминокислот (например, полноразмерная последовательность). Идентичность последовательностей может быть измерена с использованием программного обеспечения для анализа последовательности с настройками по умолчанию (например, пакет программного обеспечения для анализа последовательностей компьютерной группы Genetics, Биотехнологического центра университета Висконсина, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Такое программное обеспечение может сопоставлять сходные последовательности, присваивая степени гомологии различным заменам, делециям и другим модификациям.

[0091] Используемый в настоящем документе термин «нацеливающий фрагмент» относится к любой молекуле или любой части молекулы, которая способна связываться с данной мишенью. Термин «фрагмент, нацеливающий на FGFR3» относится к нацеливающему фрагменту, который способен связываться с молекулой FGFR3, например, FGFR3 человека, например, FGFR3 дикого типа или мутантным FGFR3.

[0092] Используемый в настоящем документе и хорошо известный в данной области термин «лечить» состояние или «лечение» состояния (например, состояний, описанных в настоящем документе, таких как рак) представляет собой подход для

получения полезных или желаемых результатов, таких как клинические результаты. Благоприятные или желаемые результаты могут включать, но не ограничиваться ими, облегчение или улучшение одного или нескольких симптомов или состояний; уменьшение степени заболевания, расстройства или состояния; стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние болезни, расстройства или состояния; предотвращение распространения болезни, расстройства или состояния; задержку или замедление развития заболевания, расстройства или состояния; улучшение или временное облегчение заболевания, расстройства или состояния; и ремиссию (частичную или полную), будь то определяемые или неопределяемые. «Смягчение» заболевания, расстройства или состояния означает, что степень и/или нежелательные клинические проявления заболевания, расстройства или состояния уменьшаются и/или скорость развития замедляется или удлиняется время развития по сравнению со скоростью или временем при отсутствии лечения.

[0093] Используемый в настоящем документе термин «примерно» или «приблизительно», когда он используется в отношении количественного значения, включает само указанное количественное значение, если специально не указано иное. Используемый в настоящем документе термин «примерно» или «приблизительно» относится к отклонению $\pm 10\%$ от указанного количественного значения, если иное не указано или не следует из контекста.

Радиоиммуноконъюгаты

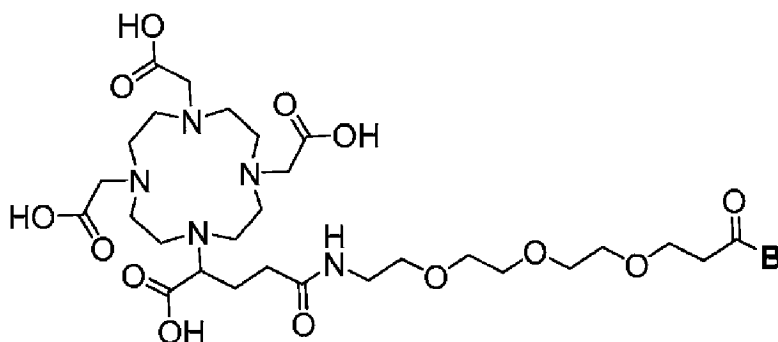
[0094] В одном аспекте настоящее изобретение относится к радиоиммуноконъюгатам, имеющим структуру формулы I-a:

A-L-B

Формула I-a

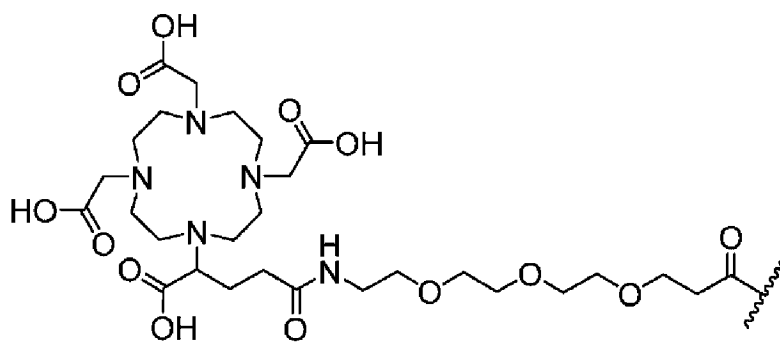
где А представляет собой хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом,
где В представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3, и
где L представляет собой линкер.

[0095] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгат имеет или содержит структуру, показанную в формуле II:



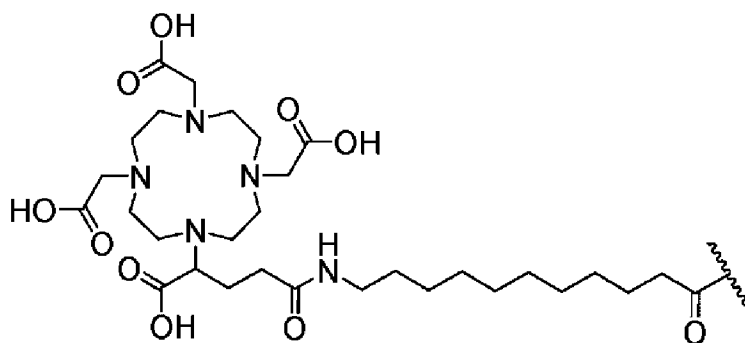
где В представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3.

[0096] В некоторых вариантах осуществления A-L- представляет собой металлокомплекс соединения, выбранного из группы, состоящей из



(i)

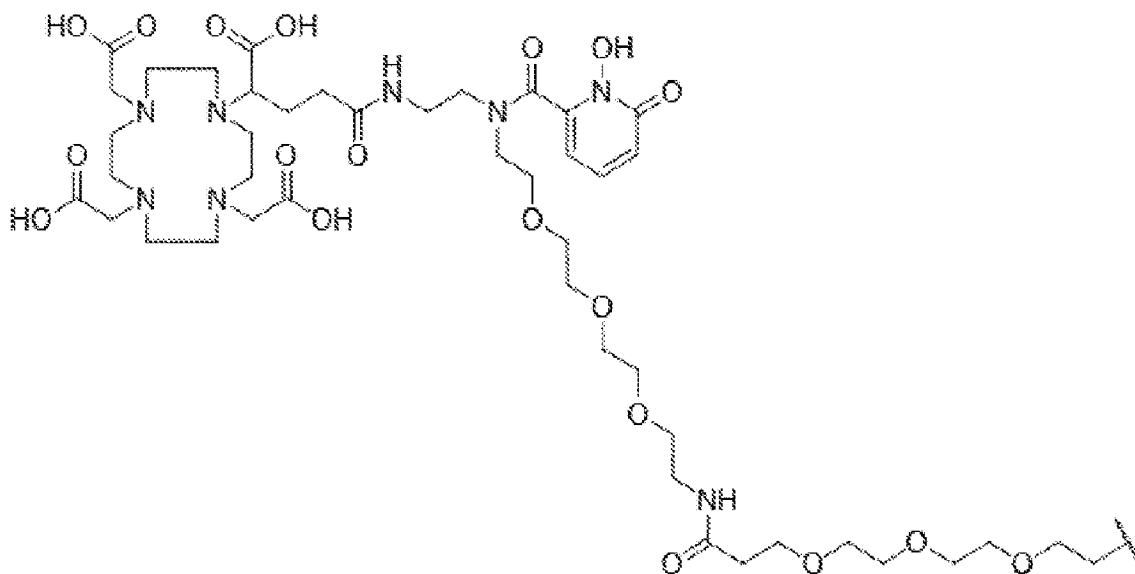
(Соединение 1),



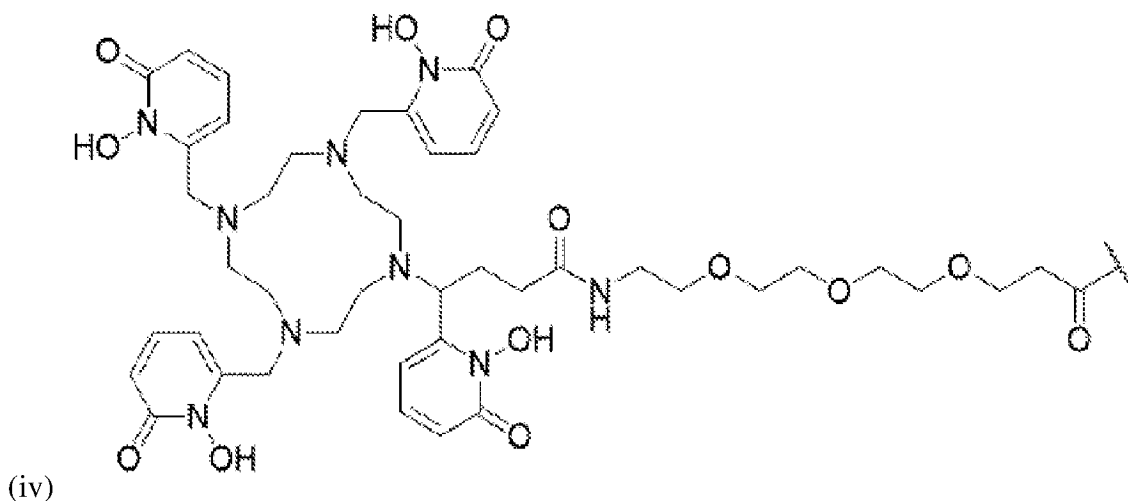
(ii)

(Соединение 2),

(iii)



(Соединение 3) и



(Соединение 4).

[0097] В некоторых вариантах осуществления, как дополнительно описано в настоящем документе, радиоиммуноконъюгат содержит хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом, причем комплекс с металлом может содержать радионуклид. В некоторых таких радиоиммуноконъюгатах среднее отношение или медианное отношение хелатирующего фрагмента к нацеливающему фрагменту FGFR3 составляет восемь или менее, семь или менее, шесть или менее, пять или менее, четыре или менее, три или менее, два или менее или примерно единицу. В некоторых радиоиммуноконъюгатах среднее отношение или медианное отношение хелатирующего фрагмента к фрагменту, нацеливающему на FGFR3, составляет примерно единицу.

[0098] В некоторых вариантах осуществления после введения радиоиммуноконъюгата млекопитающему доля радиации (от общего количества введенной радиации), которая выводится кишечным путем, почечным путем или обоими, превышает долю радиации, выделяемую сопоставимым млекопитающим, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат. Под «эталонным иммуноконъюгатом» подразумевается известный радиоиммуноконъюгат, который отличается от описанного в настоящем документе радиоиммуноконъюгата, по меньшей мере, (1) наличием другого линкера; (2) наличием нацеливающего фрагмента другого размера и/или (3) отсутствием нацеливающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления эталонный радиоиммуноконъюгат выбирают из группы, состоящей из [^{90}Y]-ибритумомаба тиуксетана (Зевалина (^{90}Y)) и [^{111}In]-ибритумомаба тиуксетана (Зевалина (^{111}In)).

[0099] В некоторых вариантах осуществления доля радиации, выводимой данным путем или набором путей, превышает по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% долю радиации, выводимой тем же путем (путями) сопоставимым млекопитающим, которому вводили

эталонный радиоиммуноконъюгат. В некоторых вариантах осуществления доля выводимой радиации по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз больше, чем доля радиации, выводимой сопоставимым млекопитающим, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат. Степень экскреции можно измерить способами, известными в данной области, например, путем измерения радиоактивности в моче и/или фекалиях и/или путем измерения общей радиоактивности организма за определенный период времени. См. также, например, международную патентную публикацию WO 2018/024869.

[00100] В некоторых вариантах осуществления степень экскреции измеряют за период времени по меньшей мере или примерно 12 часов после введения, по меньшей мере или примерно 24 часов после введения, по меньшей мере или примерно 2 дня после введения, по меньшей мере или примерно 3 дня после введения, по меньшей мере или примерно 4 дня после введения, по меньшей мере или примерно 5 дней после введения, по меньшей мере или примерно 6 дней после введения или по меньшей мере или примерно 7 дней после введения.

[00101] В некоторых вариантах осуществления после введения радиоиммуноконъюгата млекопитающему радиоиммуноконъюгат проявляет сниженные нецелевые эффекты связывания (например, токсичность) по сравнению с эталонным конъюгатом (например, эталонным иммуноконъюгатом, таким как эталонный радиоиммуноконъюгат). В некоторых вариантах осуществления этот сниженный эффект нецелевого связывания является признаком радиоиммуноконъюгата, который также демонстрирует более высокую скорость экскреции, как описано в настоящем документе.

Нацеливающие фрагменты

[00102] Нацеливающие фрагменты включают любую молекулу или любую часть молекулы, которая способна связываться с данной мишенью, например, FGFR3. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит белок или полипептид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, нанотел, аффител и консенсусных последовательностей из доменов фибронектина III типа (например, центринов или аднектинов). В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой как нацеливающий, так и терапевтический фрагмент, т. е. фрагмент способен связываться с данной мишенью, а также обеспечивать терапевтический эффект. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент содержит низкомолекулярное соединение.

[00103] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент имеет молекулярную массу по меньшей мере 50 кДа, по меньшей мере 75 кДа, по меньшей мере 100 кДа, по меньшей мере 125 кДа, по меньшей мере 150 кДа, по меньшей мере 175 кДа,

по меньшей мере 200 кДа, по меньшей мере 225 кДа, по меньшей мере 250 кДа, по меньшей мере 275 кДа или по меньшей мере 300 кДа.

[00104] Как правило, нацеливающий фрагмент способен связываться с FGFR3, например, FGFR3 дикого типа и/или мутантным FGFR3. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с FGFR3 человека, например, с человеческим FGFR3 дикого типа и/или мутантным.

[00105] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен специфично связываться с FGFR3 (например, способен связываться с FGFR3, демонстрируя сравнительно небольшое связывание или отсутствие связывания с другими киназами, такими как другие белки FGFR).

[00106] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с внеклеточной областью FGFR3, например, областью IgD1, областью IgD2, областью IgD3, линкерной областью между IgD1 и IgD2, линкерной областью между IgD2 и IgD3 или внеклеточным примембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с линкерной областью между IgD2 и IgD3. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с внеклеточным примембранным доменом.

[00107] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с изоформой IIIb FGFR3. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с изоформой IIIc FGFR3. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с обеими изоформами FGFR3, IIIb и IIIc.

[00108] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с мутантным FGFR3, например, мутантным FGFR3 человека. Некоторые мутации FGFR3 приводят к образованию неспаренного цистеина, что может приводить к независимой от лиганда димеризации рецептора и/или конститутивной активации. В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 представляет собой активированный мутант и/или ассоциирован с раком.

[00109] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент способен связываться с FGFR3 дикого типа и по меньшей мере с одним мутантным FGFR3, ассоциированным с раком.

[00110] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 содержит мутацию во внеклеточной области FGFR3. Например, в некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 содержит мутацию в линкерной области между IgD2 и IgD3 и/или во внеклеточной примембранной области FGFR3.

[00111] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 содержит мутацию во внутриклеточной области FGFR3, например, киназном домене FGFR3.

[00112] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 содержит точечную мутацию. Неограничивающие примеры точечных мутантов FGFR3, связанных с раком, включают FGFR3^{Y375C}, FGFR3^{R248C}, FGFR3^{S249C}, FGFR3^{G372C}, FGFR3^{K652E},

FGFR3^{K652Q}, FGFR3^{K652M} и их комбинации.

[00113] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 является лиганд-зависимым (например, FGFR3^{G372C} или FGFR3^{Y375C}). В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 конститутивно активирован (например, FGFR3^{R248C} или FGFR3^{S249C}). В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 является как лиганд-зависимым, так и конститутивно активированным (например, FGFR3^{K652E}).

[00114] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 содержит слитый FGFR3, например, конститутивно активированный и/или онкогенный слитый, такой как слитый белок, который возникает в результате транслокации. Например, слитые белки FGFR3-TACC3, FGFR3-CAMK2A, FGFR3-JAKMOP1, FGFR3-TNIP2, FGFR3-WHSC1 и FGFR3-BAIAP2L1 (также известный как FGFR3-IRTKS) связаны с раком.

[00115] В некоторых вариантах осуществления мутантный FGFR3 представляет собой амплифицирующую мутацию, например, содержащую увеличенное количество копий и/или приводящую к более высокой экспрессии по сравнению с FGFR3 дикого типа.

[00116] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент ингибирует FGFR3. Под «ингибирует» подразумевается, что нацеливающий фрагмент по меньшей мере частично ингибирует одну или несколько функций FGFR3 (например, FGFR3 человека). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент по меньшей мере частично ингибирует одну или несколько функций FGFR3 дикого типа, например, человеческого FGFR3 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент по меньшей мере частично ингибирует одну или несколько функций мутантного FGFR3, например, мутантного FGFR3 человека.

[00117] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент блокирует связывание лиганда с FGFR3 и/или димеризацию рецептора FGFR3. Например, в некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент, который блокирует связывание лиганда, конкурирует с лигандами FGF за взаимодействие с изоформами IIIb и/или IIIc FGFR3.

[00118] В некоторых вариантах осуществления изобретения нацеливающий фрагмент нарушает передачу сигнала от рецептора FGFR3, например, приводит к снижению уровней фосфорилирования и/или белков или транскриптов одного или нескольких нижестоящих медиаторов FGFR3, таких как FRS2 α , АКТ и p44/42 MAPK.

Антитела

[00119] Антитела, как правило, содержат две идентичные легкие полипептидные цепи и две идентичные тяжелые полипептидные цепи, связанные вместе дисульфидными связями. Первый домен, расположенный на аминоконце каждой цепи, имеет переменную аминокислотную последовательность, обеспечивающую специфичность связывания антигена каждым отдельным антителом. Они известны как переменные области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей. Другие домены каждой цепи относительно инвариантны в аминокислотной последовательности и известны как константные области

тяжелой (CH) и легкой (CL) цепей. Легкие цепи обычно содержат одну переменную область (VL) и одну константную область (CL). Тяжелая цепь IgG включает переменную область (VH), первую константную область (CH1), шарнирную область, вторую константную область (CH2) и третью константную область (CH3). В антителах IgE и IgM тяжелая цепь включает дополнительную константную область (CH4).

[00120] Антитела, подходящие для использования в соответствии с настоящим изобретением, могут включать, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, верблужьи антитела, химерные антитела, одноцепочечные Fv (scFv), Fv с дисульфидными связями (sdFv), и антиидиотипические (анти-Id) антитела, и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются химерными. Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

[00121] Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, используемый в настоящем документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, scFv-фрагмент, dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546) и выделенную определяющую комплементарность область (CDR). В некоторых вариантах осуществления «антигенсвязывающий фрагмент» содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

[00122] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники для синтеза антител (см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Химерные антитела могут быть получены способами, описанными, например, в Morrison, 1985, *Science* 229:1202, а гуманизированные антитела способами, описанными, например, в патенте США № 6180370.

[00123] Дополнительные антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой биспецифичные антитела и поливалентные антитела, описанные, например, в Segal et al., *J. Immunol. Methods* 248:1-6 (2001); and Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991), или любую из описанных в настоящем документе молекул.

[00124] «Авимер» относится к мультимерному связывающему белку или пептиду,

сконструированному с использованием, например, перетасовки экзонов *in vitro* и фагового дисплея. Множественные связывающие домены соединены друг с другом, что приводит к большей аффинности и специфичности по сравнению с иммуноглобулиновыми доменами с одним эпитопом.

[00125] «Нанотела» представляют собой фрагменты антител, состоящие из одного мономерного переменного домена антитела. Нанотела также могут называться однодоменными антителами. Подобно антителам, нанотела способны избирательно связываться со специфичным антигеном. Нанотела могут представлять собой переменные домены тяжелой цепи или легкой цепи. Нанотела могут встречаться в природе или представлять собой биоинженерный продукт. Нанотела могут быть биологически сконструированы путем направленного мутагенеза или мутагенного скрининга (например, фагового дисплея, дрожжевого дисплея, бактериального дисплея, мРНК-дисплея, рибосомального дисплея). «Аффитела» представляют собой полипептиды или белки, сконструированные для связывания со специфичным антигеном. Таким образом, можно считать, что аффитела имитируют определенные функции антител.

[00126] Аффитела могут представлять собой сконструированные варианты В-домена в связывающей иммуноглобулин области стафилококкового белка А. Аффитела могут представлять собой сконструированные варианты Z-домена, В-домена, который имеет более низкую аффинность к Fab-области. Аффитела могут быть биологически сконструированы путем направленного мутагенеза или мутагенного скрининга (например, фагового дисплея, дрожжевого дисплея, бактериального дисплея, мРНК-дисплея, рибосомального дисплея).

[00127] Были созданы молекулы аффител, имеющие специфичное связывание с различными белками (например, инсулином, фибриногеном, трансферрином, фактором некроза опухоли- α , IL-8, gp120, CD28, сывороточным альбумином человека, IgA, IgE, IgM, HER2 и EGFR) и сродство (K_d) в диапазоне от мкМ до пМ. «Диантитела» представляют собой фрагменты антител с двумя сайтами связывания антигена, которые могут быть бивалентными или биспецифичными. См., например, Hudson et al., (2003). Одноцепочечные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь переменный домен тяжелой цепи антитела или его часть или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. Фрагменты антител могут быть получены различными методами, включая, помимо прочего, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными хозяевами (например, *E. coli* или фагами), как описано в настоящем документе.

[00128] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются мультиспецифичными, например, биспецифичными. Мультиспецифичные антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) включают моноклональные антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере для двух разных сайтов.

[00129] В некоторых вариантах осуществления предусмотрены варианты аминокислотной последовательности антител или их антигенсвязывающих фрагментов; например, варианты, которые способны связываться с FGFR3 человека и/или мутантным FGFR3 (таким как мутантный FGFR3, связанный с раком). Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Варианты аминокислотной последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Любая комбинация делеций, вставок и замен может быть использована для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, т.е. связыванием антигена.

[00130] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой ингибирующее антитело (также называемое «антагонистическим антителом») или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по меньшей мере частично ингибируют одну или несколько функций молекулы-мишени (например, FGFR3), как поясняется далее в настоящем документе.

[00131] Неограничивающие примеры ингибирующих антител включают гуманизированные моноклональные антитела, такие как MFGR1877S (CAS № 1312305-12-6; Genentech) (человеческое моноклональное антитело, также известное как вофатамаб, лиофилизированная форма которого также известна как B-701 или R3Mab); PRO-001 (Prochon); PRO-007 (Fibron); IMC-D11 (Imclone); и AV-370 (Aveo Pharmaceuticals). (См., например, патент США № 8410250; US 10208120; и публикации международных патентов №№ WO2002102972A2, WO2002102973A2, WO2007144893A2, WO2010002862A2, и WO2010048026A2.)

[00132] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой агонистическое антитело (также известное как стимулирующее антитело).

[00133] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не являются ни агонистами, ни антагонистами, или не были охарактеризованы как агонисты или антагонисты.

[00134] Дополнительные известные антитела к FGFR3 включают, например, мышинные моноклональные антитела, такие как, например, 1G6, 6G1 и 15B2 от Genentech (см., например, US 8410250), B9 (Sc-13121) (Santa Cruz Biotechnology), MAB766 (клон 136334) (R&D systems), MAB7661 (клон 136318) (R&D systems) и OTI1B10 (OriGene); кроличьи поликлональные антитела, такие как, например, ab10651 (Abcam); и кроличьи моноклональные антитела, такие как C51F2 (кат. № 4574) (Cell Signaling Technology).

[00135] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит специфичные определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления определяющие комплементарность области (CDR) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента фланкированы каркасными областями. Тяжелая или легкая цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего три CDR, обычно содержит четыре каркасных участка.

[00136] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антитела против FGFR3 или его связывающего антитело фрагмента содержит одну, две или три определяющие комплементарность области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, с аминокислотными последовательностями, показанными ниже, или CDR-область(и), имеющую(ие) аминокислотную(ые) последовательность(и), отличающуюся(и) на 1 или 2 аминокислоты от них:

CDR-H1:

GFTFTSTGIS (SEQ ID NO: 1)

CDR-H2:

GRIYPTSGSTNYADSV (SEQ ID NO: 2)

CDR-H3:

TYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEQ ID NO: 3) или

ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEQ ID NO: 4)

[00137] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи антитела FGFR3 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит одну, две или три определяющие комплементарность области (CDR), CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3, с аминокислотными последовательностями, показанными ниже, или CDR-область(и), имеющую(ие) аминокислотную(ые) последовательность(и), отличающуюся(и) на 1 или 2 аминокислоты от них:

CDR-L1:

RASQDVDTSLA (SEQ ID NO: 5)

CDR-L2:

SASFLYS (SEQ ID NO: 6)

CDR-L3:

QQSTGHPQT (SEQ ID NO: 7)

[00138] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую:

определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR-H1), имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты,

определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR-H2), имеющую

аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты, и

определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR-H3), имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты, и

(ii) легкую цепь, содержащую:

определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR-L1), имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты,

определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR-L2), имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты, и

определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR-L3), имеющую аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

или моноклональное антитело, распознающее тот же самый эпитоп на FGFR3.

[00139] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют последовательности CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6 и 7 без каких-либо вариаций. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3, и определяющие комплементарность области легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

[00140] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют последовательности CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6 и 7 без каких-либо вариаций. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 4, и определяющие комплементарность области легкой цепи CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

[00141] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антитела к FGFR3 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1, 2, 3 или 4 аминокислоты от нее, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 8:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT STGISWVRQ APGKGLEWVGR
IYPTSGSTNY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARTY

GIYDLYVDYT EYVMDYWGGQ TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP
 SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS
 LSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

[00142] В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи антитела к FGFR3 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1, 2, 3 или 4 аминокислоты от нее, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 9:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVD TSLAWYKQKP GKAPKLLIYS
 ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ STGHPQTFGQ
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 9)

[00143]

[00144] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, нацеливающий на FGFR3, представляет собой MFGR1877S (вофатамаб) или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00145] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR3 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет константу диссоциации (K_d) от 1 нМ до 10 нМ (включительно) или от 0,1 нМ до 1 нМ (включительно).

[00146] В одном варианте осуществления K_d измеряют с помощью анализа связывания антигена с радиоактивной меткой (радиоиммуноанализа, RIA), проводимого с использованием Fab-версии интересующего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и его антигена.

[00147] Согласно другому варианту осуществления, K_d измеряют с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса с иммобилизованным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой моноклональные антитела человека, направленные против эпитопа FGFR3 человека, как описано в настоящем документе.

[00148] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять

собой любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент природного и/или синтетического происхождения, например антитело млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления константный домен, если он присутствует, представляет собой константный домен человека. В некоторых вариантах осуществления переменный домен представляет собой переменный домен млекопитающего, например, гуманизированный или переменный домен антитела человека.

[00149] В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые в соответствии с данным раскрытием, представляют собой моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой рекомбинантные мышинные антитела, химерные, гуманизированные или полностью антитела человека, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) или их антигенсвязывающие фрагменты.

[00150] В некоторых вариантах осуществления они дополнительно связаны с другими фрагментами, например, для направленной доставки на лекарственных средств и визуализации.

[00151] В некоторых вариантах осуществления, например, для диагностических целей, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент метят, то есть связывают с маркирующей группой. Неограничивающие примеры подходящих меток включают радиоактивные метки, флуоресцентные метки, подходящие красители, ферментные метки, хромогены, хемилюминесцентные группы, биотинильные группы, определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером и т. д. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько меток ковалентно присоединены к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

[00152] Эти меченые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (также называемые «конъюгатами антител») можно, в частности, использовать в иммуногистохимических анализах или для молекулярной визуализации *in vivo*.

[00153] В некоторых вариантах осуществления, например, для терапевтических целей, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно конъюгируют с эффекторной группой, в частности, с терапевтической эффекторной группой, такой как цитотоксический агент или радиоактивный агент.

Полипептиды

[00154] Полипептиды включают, например, любой из множества гематологических агентов (включая, например, эритропоэтин, факторы свертывания крови и т.д.), интерфероны, колониестимулирующие факторы, антитела, ферменты и гормоны. Идентичность конкретного полипептида не предназначена для ограничения настоящего раскрытия, и любой интересующий полипептид может являться полипептидом в настоящих способах.

[00155] Эталонный полипептид, описанный в настоящем документе, может включать домен связывания мишени, который способен связываться с представляющей интерес мишенью (например, способен связываться с антигеном, например, FGFR3).

Например, полипептид, такой как антитело, может связываться с трансмембранным полипептидом (например, рецептором) или лигандом (например, фактором роста).

Модифицированные полипептиды

[00156] Полипептиды, подходящие для использования с композициями и способами по настоящему изобретению, могут иметь модифицированную аминокислотную последовательность. Модифицированные полипептиды могут быть по существу идентичны соответствующему эталонному полипептиду (например, аминокислотная последовательность модифицированного полипептида может иметь по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью эталонного полипептида). В некоторых вариантах осуществления модификация не нарушает в значительной степени желаемую биологическую активность (например, связывание с FGFR3). Модификация может уменьшить (например, по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 25%, 35%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95%), может не влиять или может повышать (например, по меньшей мере на 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200%, 500% или 1000%) биологическую активность исходного полипептида. Модифицированный полипептид может иметь или может оптимизировать характеристику полипептида, такую как стабильность *in vivo*, биодоступность, токсичность, иммунологическую активность, иммунологическую идентичность и конъюгирующие свойства.

[00157] Модификации включают модификации с помощью естественных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или с помощью методов химической модификации, известных в данной области. Модификации могут происходить в любом месте полипептида, включая остов полипептида, боковые цепи аминокислот и амино- или карбокси-конец. Один и тот же тип модификации может присутствовать в той же или в различной степени в нескольких сайтах данного полипептида, и полипептид может содержать более одного типа модификации. Полипептиды могут быть разветвленными в результате убиквитинирования, а также они могут быть циклическими, с разветвлениями или без них. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические полипептиды могут быть результатом посттрансляционных естественных процессов или могут быть получены синтетическим путем. Другие модификации включают пегилирование, ацетилирование, ацилирование, добавление ацетомидометильной (Acm) группы, АДФ-рибозилирование, алкилирование, амидирование, биотинилирование, карбамоилирование, карбоксиэтилирование, этерификацию, ковалентное присоединение к флавину, ковалентное присоединение к фрагменту гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение лекарственного средства, ковалентное присоединение маркера (например, флуоресцентного или радиоактивного), ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное связывание, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-

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

[00158] Модифицированный полипептид может также включать аминокислотную вставку, делецию или замену, как консервативную, так и неконсервативную (например, D-аминокислоты, дезаминокислоты) в полипептидной последовательности (например, если такие изменения существенно не изменяют биологическую активность полипептида). В частности, добавление одного или нескольких остатков цистеина к амино- или карбоксиконцу полипептида в настоящем документе может облегчить конъюгацию этих полипептидов, например, посредством дисульфидной связи. Например, полипептид можно модифицировать, включив один цистеиновый остаток на аминоконце или один цистеиновый остаток на карбоксиконце. Аминокислотные замены могут быть консервативными (т. е. когда остаток заменяется другим остатком того же общего типа или группы) или неконсервативным (т. е. когда остаток заменяется аминокислотой другого типа). Кроме того, природная аминокислота может быть заменена не встречающейся в природе аминокислотой (т.е. замена неприродной консервативной аминокислотой или замена неприродной неконсервативной аминокислотой).

[00159] Полипептиды, полученные синтетическим путем, могут включать замены аминокислотами, не кодируемыми ДНК в природе (например, не встречающейся в природе или неприродной аминокислотой). Примеры неприродных аминокислот включают D-аминокислоты, N-защищенные аминокислоты, аминокислоту, имеющую ацетиламинометильную группу, присоединенную к атому серы цистеина, пэгилированную аминокислоту, омега-аминокислоты с формулой $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, где n составляет 2-6, нейтральные неполярные аминокислоты, такие как саркозин, трет-бутилаланин, трет-бутилглицин, N-метилизолейцин и норлейцин. Фенилглицин может заменить Trp, Tyr или Phe; цитруллин и метионина сульфоксид являются нейтральными неполярными, цистеиновая кислота является кислотой, а орнитин является основной. Пролин может быть заменен гидроксипролином и сохранять свойства, придающие конформацию.

[00160] Аналоги могут быть получены путем заместительного мутагенеза и сохранять биологическую активность исходного полипептида. Примеры замен, идентифицированных как «консервативные замены», показаны в таблице 1. Если такие замены приводят к нежелательным изменениям, тогда вводят другие типы замен, обозначенные как «примерные замены» в таблице 1, или как далее описано в настоящем документе в отношении классов аминокислот, и проводят скрининг продуктов.

[00161] Таблица 1: Аминокислотные замены

Исходный остаток	Примеры замен	Консервативные замены
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val

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

[00162] Существенные модификации функции или иммунологической идентичности достигаются путем выбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде листа или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте и/или (с) объема боковой цепи.

Хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом

Хелатирующие фрагменты

[00163] Примеры подходящих хелатирующих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), DOTMA (1R,4R,7R,10R- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту), DOTAM (1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан), DOTPA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрапропионовую кислоту), DO3AM-уксусную кислоту (2-(4,7,10-трис(2-амино-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)уксусную кислоту), ангидрид DOTA-GA (2,2',2''-(10-(2,6-диоксотетрагидро-2H-пиран-3-ил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триил)триуксусной кислоты), DOTP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфоновую кислоту)), DOTMP (1,4,6,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраметиленфосфоновую кислоту), DOTA-4AMP (1,4,7,10-тетраазациклододекан-

1,4,7,10-тетракис(ацетамидометиленфосфоновую кислоту), СВ-ТЕ2А (1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-4,11-диуксусную кислоту), NOTA (1,4,7-триазабициклононан-1,4,7-триуксусную кислоту), NOTP (1,4,7-триазабициклононан-1,4,7-три(метиленфосфоновую кислоту), ТЕТРА (1,4,8,11-тетраазабициклотетрадекан-1,4,8,11-тетрапропионовую кислоту), ТЕТА (1,4,8,11-тетраазабициклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту), НЕНА (1,4,7,10,13,16-гексаазабициклогексадекан-1,4,7,10,13,16-гексауксусную кислоту), РЕРА (1,4,7,10,13-пентаазабициклопентадекан-N,N',N'',N''',N''''-пентауксусную кислоту), H₄остара (N,N'-бис(6-карбокси-2-пиридилметил)-этилендиамин-N,N'-диуксусную кислоту), H₂dedpa (1,2-[[6-(карбокси)-пиридин-2-ил]-метиламино]этан), H₆phospa (N,N'-(метиленфосфонат)-N,N'-[6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил]-метил-1,2-диаминоэтан), ТТНА (триэтилентетрамин-N,N,N',N'',N''', N''''-гексауксусную кислоту), DO2P (тетраазабициклододекандиметанфосфоновую кислоту), HP-DO3A (гидроксипропилтетраазабициклододекантриуксусную кислоту), EDTA (этилендиаминтетрауксусную кислоту), дефероксамин, ДТРА (диэтилентриаминпентауксусную кислоту), ДТРА-ВМА (диэтилентриаминпентауксусную кислоту-бисметиламид), октадентат-НОРО (октадентат гидрокси пиридины) или порфирины.

[00164] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты содержат комплекс металла с хелатирующим фрагментом. Например, хелатирующие группы могут использоваться в комбинациях хелатов с металлами, такими как марганец, железо и гадолиний, и изотопами (например, изотопами в общем диапазоне энергий от 60 до 10 000 кэВ), такими как любые из радиоизотопов и радионуклидов, обсуждаемых в настоящем документе.

[00165] В некоторых вариантах осуществления хелатирующие фрагменты применимы в качестве детектирующих агентов, и поэтому радиоиммуноконъюгаты, содержащие такие детектируемые хелатирующие фрагменты, могут использоваться в качестве диагностических или терапевтических агентов.

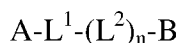
Радиоизотопы и радионуклиды

[00166] В некоторых вариантах осуществления комплекс металла содержит радионуклид. Примеры подходящих радиоизотопов и радионуклидов включают, но не ограничиваются ими, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁴⁷Sc, ⁵⁵Co, ⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ⁸²Rb, ⁸⁹Zr, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁹⁰Y, ⁹⁷Ru, ⁹⁹Tc, ^{99m}Tc, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ^{117m}Sn, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²⁰¹Tl, ²⁰³Pb, ²¹¹At, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²²⁷Th и ²²⁹Th.

[00167] В некоторых вариантах осуществления радионуклид представляет собой альфа-излучатель, например, аstat-211 (²¹¹At), висмут-212 (²¹²Bi), висмут-213 (²¹³Bi), актиний-225 (²²⁵Ac), радий-223 (²²³Ra), свинец-212 (²¹²Pb), торий-227 (²²⁷Th) или тербий-149 (¹⁴⁹Tb), или их производные. В некоторых вариантах осуществления альфа-излучатель представляет собой актиний-225 (²²⁵Ac) или его производные.

Линкер

[00168] В некоторых вариантах осуществления линкер имеет структуру, показанную в формуле I-b, как часть формулы I-b, в которой отсутствуют А и В:



Формула I-b

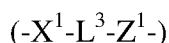
(А и В определены в формуле I-a).

[00169] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $-L^1-(L^2)_n-$, где:

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

n находится в диапазоне от 1 до 5 (включительно); и

каждый L^2 независимо имеет структуру:



Формула III

где:

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

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

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

[00170] В некоторых вариантах осуществления L^1 представляет собой замещенный C_1 - C_6 -алкил или замещенный C_1 - C_6 -гетероалкил, причем заместитель содержит гетероарильную группу (например, шестичленный азотсодержащий гетероарил).

[00171] В некоторых вариантах осуществления L^3 представляет собой замещенный C_1 - C_{50} -алкил или замещенный C_1 - C_{50} -гетероалкил, причем заместитель содержит гетероарильную группу (например, шестичленный азотсодержащий гетероарил).

[00172] В некоторых вариантах осуществления А представляет собой макроциклический хелатирующий фрагмент, содержащий одну или несколько гетероарильных групп (например, шестичленный азотсодержащий гетероарил).

Сшивающие группы

[00173] В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты содержат сшивающую группу вместо нацеливающей части или в дополнение к ней (например, В в формуле I содержит сшивающую группу).

[00174] Сшивающая группа представляет собой реакционноспособную группу, которая способна соединять две или несколько молекул ковалентной связью. Сшивающие группы можно использовать для присоединения линкера и хелатирующего фрагмента к

терапевтическому или нацеливающему фрагменту. Сшивающие группы также можно использовать для присоединения линкера и хелатирующего фрагмента к мишени *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления сшивающая группа представляет собой аминокислотную, метионин-реактивную или тиол-реактивную сшивающую группу или группу для сшивки с помощью сортазы. В некоторых вариантах осуществления сшивающая группа, реагирующая с аминокислотными или тиолами, содержит активированный сложный эфир, такой как сложный эфир гидроксисукцинимид, сложный эфир 2,3,5,6-тетрафторфенола, сложный эфир 4-нитрофенола или имидат, ангидрид, тиол, дисульфид, малеимид, азид, алкин, напряженный алкин, напряженный алкен, галоген, сульфат, галоацетил, амин, гидразид, диазирин, фосфин, тетразин, изотиоцианат или оксазиридин. В некоторых вариантах осуществления последовательность распознавания сортазой может включать концевую аминокислотную последовательность глицин-глицин-глицин (GGG) и/или LPTXG, где X представляет собой любую аминокислоту. Специалисту в данной области техники будет понятно, что использование сшивающих групп не ограничивается раскрытыми в настоящем документе конкретными конструкциями, а скорее может включать другие известные сшивающие группы.

Фармацевтические композиции

[00175] В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим радиоиммуноконъюгаты, раскрытые в настоящем документе. Такие фармацевтические композиции могут быть составлены для использования в различных системах доставки лекарств. Один или несколько физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей также могут быть включены в фармацевтическую композицию для надлежащего состава. Неограничивающие примеры подходящих составов, совместимых с настоящим раскрытием, включают составы, описанные в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарств см., например, в Langer (Science. 249:1527-1533, 1990).

[00176] Фармацевтические композиции могут быть составлены для любого из множества путей введения, обсуждаемых в настоящем документе (см., например, подраздел «Введение и дозировка» в настоящем документе). Введение с замедленным высвобождением предусмотрено с помощью таких средств, как депо-инъекции или разрушаемые имплантаты или компоненты. Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые включают агенты, раскрытые в настоящем документе (например, радиоиммуноконъюгаты), растворенные или суспендированные в приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе, например, воде, забуференной воде, физиологическом растворе или PBS, среди прочего. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества для достижения физиологических условий, такие как агенты, регулирующие pH и буферные агенты, агенты, регулирующие тоничность, смачивающие агенты или детергенты, среди прочего.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены для перорального введения и могут необязательно содержать инертные ингредиенты, такие как связующие вещества или наполнители, для приготовления стандартной лекарственной формы, такой как таблетка или капсула. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены для местного введения и могут необязательно содержать инертные ингредиенты, такие как растворители или эмульгаторы, для приготовления крема, мази, геля, пасты или глазных капель.

[00177] В некоторых вариантах осуществления предложенные фармацевтические композиции стерилизуют обычными способами стерилизации, например, они могут быть простерилизованы фильтрацией. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования в готовом виде или лиофилизированы. Лيوфилизированные препараты могут быть, например, объединены со стерильным водным носителем перед введением. рН препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно - от 5 до 9 или от 6 до 8, и наиболее предпочтительно - от 6 до 7, например, от 6 до 6,5. Полученные в результате композиции в твердой форме могут быть упакованы, например, в виде множества разовых доз, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеуказанного агента или агентов, например, в запечатанной упаковке таблеток или капсул. Фармацевтические композиции в твердой форме также могут быть упакованы в контейнер для меняющегося количества, например, в мягкий тюбик, предназначенный для крема или мази для местного применения.

Способы лечения

[00178] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим в себя введение субъекту радиоиммуноконъюгата по настоящему изобретению.

Субъекты

[00179] В некоторых раскрытых способах субъекту вводят терапию (например, включающую терапевтическое средство). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например, человека.

[00180] В некоторых вариантах осуществления субъект болен раком или подвержен риску развития рака. Например, у субъекта может быть диагностирован рак. Например, рак может являться первичным раком или метастатическим раком. Субъекты могут иметь любую стадию рака, например стадию I, стадию II, стадию III или стадию IV с вовлечением или без вовлечения лимфатических узлов и с метастазами или без них. Предложенные радиоиммуноконъюгаты и композиции могут предотвращать или уменьшать дальнейший рост рака и/или иным образом улучшать течение рака (например, предотвращать или уменьшать метастазирование). В некоторых вариантах осуществления субъект не болен раком, но идентифицирован как подверженный риску развития рака, например, из-за наличия одного или нескольких факторов риска, таких как воздействие окружающей среды, наличия одной или нескольких генетических мутаций или вариантов, семейного анамнеза и т.д. В некоторых вариантах осуществления у субъекта еще не

диагностирован рак.

[00181] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную раковую опухоль, например саркому или карциному.

[00182] В некоторых вариантах осуществления солидная раковая опухоль представляет собой аденокортикальную карциному, рак мочевого пузыря (например, уротелиальную карциному), рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, аденокарциному эндометрия, саркому Юинга, карциному желчного пузыря, глиому (например, мультиформную глиобластому), рак головы и шеи, рак печени, рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого или аденокарциному легкого), нейробластому, нейроэндокринный рак, рак поджелудочной железы (например, экзокринную карциному поджелудочной железы), рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, аденоидно-кистозный рак слюнных желез или сперматоцитарную семиному.

[00183] В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака печени и рака легких. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак печени.

[00184] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой несолитарную раковую опухоль, например, подвижный рак или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой миелому, например, множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз, например, острый миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому.

Введение и дозировка

[00185] Радиоиммуноконъюгаты и их фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, можно вводить любым из множества путей введения, включая системные и местные пути введения.

[00186] Системные пути введения включают парентеральные пути и энтеральные пути. В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты или их фармацевтические композиции вводят парентеральным путем, например, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, подкожно или внутрикожно. В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты или их фармацевтические композиции вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления радиоиммуноконъюгаты или их фармацевтические композиции вводят энтеральным путем, например, через желудочно-кишечный тракт или перорально.

[00187] Местные пути введения включают, но не ограничиваются ими, периопухолевые инъекции и внутриопухолевые инъекции.

[00188] Фармацевтические композиции можно вводить для планирования лучевой терапии, диагностики и/или терапевтического лечения. При введении для планирования

лучевой терапии или в диагностических целях радиоиммуноконъюгат можно вводить субъекту в диагностически эффективной дозе и/или в количестве, эффективном для определения терапевтически эффективной дозы. В терапевтических целях фармацевтические композиции можно вводить субъекту (например, человеку), уже страдающему от состояния (например, рака), в количестве, достаточном для излечения от или по меньшей мере для частичного купирования симптомов расстройства и его осложнений. Количество, достаточное для достижения этой цели, определяется как «терапевтически эффективное количество», то есть количество соединения, достаточное для существенного улучшения по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или состоянием здоровья. Например, при лечении рака терапевтически эффективным будет агент или соединение, которое уменьшает, предотвращает, задерживает, подавляет или останавливает любой симптом заболевания или состояния. Терапевтически эффективное количество агента или соединения не должно обеспечивать излечение заболевания или состояния, но может, например, обеспечить лечение заболевания или состояния таким образом, что начало заболевания или состояния отсрочено, затруднено или предотвращено, так что симптомы заболевания или состояния облегчаются, или изменяется продолжительность заболевания или состояния. Например, заболевание или состояние может стать менее тяжелым, и/или выздоровление индивидуума может ускориться. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят первую дозу радиоиммуноконъюгата или композиции в количестве, эффективном для планирования лучевой терапии, затем вводят вторую дозу или ряд доз радиоиммуноконъюгата или композиции в терапевтически эффективном количестве.

[00189] Эффективное количество может зависеть от тяжести заболевания или состояния и других характеристик субъекта (например, веса). Терапевтически эффективное количество раскрытых радиоиммуноконъюгатов и композиций для субъектов (например, млекопитающих, таких как люди) может быть определено специалистом в данной области техники с учетом индивидуальных различий (например, различий в возрасте, весе и состоянии субъекта).

[00190] В некоторых вариантах осуществления раскрытые радиоиммуноконъюгаты проявляют повышенную способность нацеливания на раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество раскрытых радиоиммуноконъюгатов ниже (например, меньше или равно примерно 90%, 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1%) от эквивалентной дозы для терапевтического эффекта неконъюгированного и/или немеченого радиоактивным изотопом нацеливающего фрагмента.

[00191] Однократное или многократное введение фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем документе, включая эффективное количество, может осуществляться с мощностью дозы и схемой, выбранными лечащим врачом. Доза и схема введения могут быть определены и скорректированы на основе тяжести заболевания или состояния субъекта, которые можно контролировать на протяжении всего курса лечения в

соответствии со способами, обычно практикуемыми клиницистами или описанными в настоящем документе.

[00192] Нижеследующие конкретные примеры следует рассматривать только как иллюстративные и никоим образом не ограничивающие остальную часть раскрытия.

Примеры

Пример 1. Общие материалы и способы

[00193] Лютеций-177 можно получить от Perkin Elmer в виде трихлорида лютеция в 0,05 н. растворе хлористоводородной кислоты; индий-111 в виде треххлористой соли может быть получен от Nordion; и актиний-225 можно получить в виде тринитрата актиния-225 от Oak Ridge National Laboratories.

[00194] Аналитическая ВЭЖХ-МС может быть выполнена с использованием системы ВЭЖХ-МС Waters Acquity, состоящей из Waters Acquity Binary Solvent Manager, Waters Acquity Sample Manager (образцы охлаждены до 10°C), Water Acquity Column Manager (температура колонки 30°C), детектора Waters Acquity Photodiode Array (мониторинг при 254 нм и 214 нм), TQD Waters Acquity с ионизацией электрораспылением и колонки Waters Acquity BEH C18, 2,1×50 (1,7 мкм). Препаративную ВЭЖХ можно проводить с использованием системы ВЭЖХ Waters, состоящей из насоса Waters 1525 Binary HPLC, детектора Waters 2489 UV/Visible Detector (мониторинг при 254 нм и 214 нм) и колонки Waters XBridge Prep Phenyl или C18 19×100 мм (5 мкм).

[00195] Способ ВЭЖХ-элюции 1: колонка Waters Acquity BEH C18 2,1×50 мм (1,7 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока=0,3 мл/мин; начальная концентрация=90% А, 3-3,5 мин=0% А, 4 мин=90% А, 5 мин=90% А.

[00196] Способ ВЭЖХ-элюции 2: колонка Waters XBridge Prep Phenyl 19×100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока: 10 мл/мин; начальная концентрация=80% А, 13 мин=0% А.

[00197] Способ ВЭЖХ-элюции 3: колонка Waters Acquity BEH C18 2,1×50 мм (1,7 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока=0,3 мл/мин; начальная концентрация=90% А, 8 мин=0% А, 10 мин=0% А, 11 мин=90% А, 12 мин=90% А.

[00198] Способ ВЭЖХ-элюции 4: колонка Waters XBridge Prep C18 OBD 19×100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока: 10 мл/мин; начальная концентрация=80% А, 3 мин=80% А, 13 мин=20% А, 18 мин=0% А.

[00199] Способ ВЭЖХ-элюции 5: колонка Waters XBridge Prep C18 OBD 19×100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока: 10 мл/мин; начальная концентрация=90% А, 3 мин=90% А, 13 мин=0% А, 20 мин=0% А.

[00200] Способ ВЭЖХ-элюции 6: колонка Waters XBridge Prep C18 OBD 19×100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока: 10 мл/мин; начальная концентрация=75% А, 13 мин=0% А, 15 мин=0% А.

[00201] Способ ВЭЖХ-элюции 7: колонка Waters XBridge Prep C18 OBD 19×100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока: 10 мл/мин; начальная концентрация=80% А, 12 мин=0% А, 15 мин=0% А.

[00202] Способ ВЭЖХ-элюции 8: колонка Waters XBridge Prep C18 OBD 19×100 мм (5 мкм); подвижная фаза А: H₂O (0,1% об./об., ТФУ); подвижная фаза В: ацетонитрил (0,1% об./об., ТФУ); скорость потока: 10 мл/мин; начальная концентрация=90% А, 12 мин=0% А, 15 мин=0% А.

[00203] Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) может быть выполнена с использованием системы Waters, состоящей из насоса Waters 1525 Binary HPLC, детектора Waters 2489 UV/Visible (мониторинг при 280 нм), радиодетектора Bioscan Flow Count (FC-3300) и колонки TOSOH TSKgel G3000SWxl, 7,8×300 мм. Изократический метод SEC может иметь скорость потока, например мл/мин, с подвижной фазой, содержащей 0,1 М фосфата, 0,6 М NaCl, 0,025% азида натрия, pH=7.

[00204] MALDI-MS (режим положительных зарядов) можно проводить с использованием спектрометра MALDI Bruker Ultraflexxtreme Spectrometer.

[00205] Радиотонкослойная хроматография (радиоТСХ) может быть выполнена с помощью сканера изображений Bioscan AR-2000 и может быть проведена на хроматографической бумаге iTLC-SG со стеклянным микроволокном (Agilent Technologies, SGI0001) с использованием цитратного буфера (0,1 М, pH 5,5).

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

[00206] Бифункциональный хелат, 4-{[11-оксо-11-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)ундецил]карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1-ил]бутановая кислота (соединение В) может быть синтезирована по схеме, представленной на фиг. 2. К раствору 5-(трет-бутокси)-5-оксо-4-(4,7,10-трис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1-ил)пентановой кислоты (DOTA-GA-(tBu)₄, 50 мг, 0,07 ммоль) в ACN (2,0 мл) добавляют DSC (50 мг, 0,21 ммоль), затем пиридин (0,20 мл, 2,48 ммоль). Реакцию перемешивают при комнатной температуре в течение 1 часа. К реакционной смеси добавляют 11-аминоундекановую кислоту (70 мг, 0,36 ммоль), и затем раствор PBS (1,0 мл) при комнатной температуре. Реакцию перемешивают в течение 72 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтруют с помощью шприцевого фильтра и очищают непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием способа 6, получая промежуточное соединение 2-А.

[00207] К раствору промежуточного соединения 2-А (40 мг, 0,03 ммоль), TFP (90 мг, 0,54 ммоль) и EDC (40 мг, 0,27 ммоль) в ACN (1,0 мл) добавляют пиридин (0,05 мл, 50 мг, 0,62 ммоль) при комнатной температуре. Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 24 часов. Реакционную смесь очищают непосредственно препаративной ВЭЖХ с использованием способа 7, получая промежуточное соединение 2-В в виде воска после концентрирования с использованием быстрого испарителя Biotage V10.

[00208] Промежуточное соединение 2-В растворяют в DCM/TFA(1,0 мл/2,0 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение 24 часов. Реакционную смесь концентрируют потоком воздуха и очищают непосредственно препаративной ВЭЖХ с использованием способа 8, получая соединение В в виде прозрачного воска после концентрирования. Аликвоту анализируют ВЭЖХ-МС со способом элюции 3.

[0209] ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO- d_6) δ 7,99-7,88 (м, 1H), 7,82 (т, J=5,5 Гц, 1H), 3,78 (шир. с, 4H), 3,43 (шир. с, 12H), 3,08 (шир. с, 4H), 3,00 (м, 3H), 2,93 (шир. с, 3H), 2,77 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,30 (шир. с, 2H), 1,88 (шир. с, 2H), 1,66 (р, J=7,3 Гц, 2H), 1,36 (м, 4H), 1,32-1,20 (м, 9H).

Пример 3. Синтез конъюгата [^{225}Ac]-соединение В-анти-FGFR3

[00210] Соединение В (1 мкмоль) растворяют в растворе соляной кислоты (0,001 М). Аликвоту раствора соединения В (5 мкл, 70 нмоль) добавляют к раствору, содержащему антитело к FGFR3 (1,8 нмоль) в фосфатном буфере (pH 8). Через 3 часа при температуре окружающей среды полученный иммуноконъюгат очищают с помощью колонки, заполненной смолой Sephadex G-50. Иммуноконъюгат соединения В и анти-FGFR3 антитела (соединение В- анти-FGFR3) элюируют с колонки ацетатным буфером (pH 6,5).

[00211] Ac-225 (15 мкКи, 10 мкл) добавляют к раствору соединения В-анти-FGFR3 (300 мкг в ацетатном буфере (pH 6,5)). Реакцию радиоактивного мечения инкубируют при 30°C в течение 1 часа. Неочищенный продукт, [^{225}Ac]-соединение В-анти-FGFR3, очищают с помощью колонки, заполненной смолой Sephadex G-50, элюируя ацетатным буфером.

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

[00212] Бифункциональный хелат, 4-{[2-(2-{2-[3-оксо-3-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)пропокси]этоксис}этоксис)этил]карбамоил}-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил]бутановую кислоту (соединение С) синтезируют по схеме, представленной на фиг. 3.

[00213] К раствору 5-(трет-бутоксис)-5-оксо-4-(4,7,10-трис(2-(трет-бутоксис)-2-оксоэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1-ил)пентановой кислоты (DOTA-GA(tBu) $_4$, 100 мг, 0,143 ммоль) в ACN (8,0 мл) добавляют DSC (73 мг, 0,285 ммоль) и пиридин (0,80 мл,

9,89 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 90 мин при температуре окружающей среды. Этот раствор добавляют к полураствору аминок-ПЭГ3-кислоты (63 мг, 0,285 ммоль в 1,2 мл DMF) в круглодонной колбе на 100 мл. Через 4 часа при температуре окружающей среды реакционную смесь концентрируют досуха в токе воздуха. Неочищенный материал очищают способом ВЭЖХ-элюции 2 (неочищенное вещество растворяют в 6 мл 20% ACN/H₂O). Фракции, содержащие продукт, объединяют и концентрируют в вакууме, а затем совместно выпаривают с ACN (3×2 мл).

[00214] Во флакон, содержащий промежуточное соединение 1-A (82 мг, 60 мкмоль), добавляют ACN (2 мл), NEt₃ (50 мкл, 360 мкмоль, 6 экв.), HBTU (23 мг, 60 мкмоль, 1 экв.) и раствор TFP (50 мг, 300 мкмоль, 5 экв., растворенный в 250 мкл ACN). Полученный прозрачный раствор перемешивают при температуре окружающей среды в течение 3 часов. Реакционную смесь концентрируют досуха в потоке воздуха, затем разбавляют смесью ACN/H₂O (1:1, всего 3 мл) и очищают препаративной ВЭЖХ с использованием способа элюции 4. Фракции, содержащие продукт, объединяют и концентрируют в вакууме, а затем совместно выпаривали с ACN (3×2 мл). Промежуточное соединение 1-B получают в виде прозрачного осадка.

[00215] Во флакон, содержащий промежуточное соединение 1-B (67 мг, 64 мкмоль), добавляют DCM (2 мл) и TFA (2 мл). Полученный раствор перемешивают при температуре окружающей среды в течение 16 часов. Дополнительно добавляют TFA (2 мл) и реакционную смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 6 часов. Реакционную смесь концентрируют досуха в потоке воздуха, при этом неочищенный продукт полностью растворяют в смеси ACN/H₂O (1 мл 10% ACN/H₂O). Неочищенный реакционный раствор затем очищают препаративной ВЭЖХ с использованием способа элюции 5. Фракции, содержащие продукт, объединяют, замораживают и лиофилизируют. Соединение С получают в виде белого твердого вещества. Аликвоту анализируют ВЭЖХ-МС со способом элюции 3.

[00216] ¹H ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆) δ 7,97-7,91 (м, 2H), 3,77 (т, 2H, J=6,0 Гц), 3,58-3,55 (м, 2H), 3,53-3,48 (м, 8H), 3,44-3,38 (м, 10H), 3,23-3,08 (м, 11H), 3,02 (т, 2H, J=6,0 Гц), 2,93 (шир. с, 4H), 2,30 (шир. с, 2H), 1,87 (шир. с, 2H).

Пример 5. Синтез конъюгата [²²⁵Ac]-соединение С-анти-FGFR3

[00217] Соединение С (1 мкмоль) растворяют в растворе соляной кислоты (0,001 М). Аликвоту раствора соединения С (5 мкл, 70 нмоль) добавляют к раствору, содержащему антитело к FGFR3 (1,8 нмоль) в фосфатном буфере (pH 8). Через 3 часа при температуре окружающей среды полученный иммуноконъюгат очищают с помощью колонки, заполненной смолой Sephadex G-50. Иммуноконъюгат соединения С-анти-FGFR3 элюируют с колонки ацетатным буфером (pH 6,5). Идентичность элюатов можно подтвердить, например, с помощью MALDI-TOF.

[00218] Ac-225 (15 мкКи, 10 мкл) добавляют к раствору соединения С-анти-FGFR3 (300 мкг в ацетатном буфере (pH 6,5). Реакцию радиоактивного мечения инкубируют при 30°C в течение 1 часа. Неочищенный продукт, [²²⁵Ac]-соединение С-анти-FGFR3 очищают

с помощью колонки, заполненной смолой Sephadex G-50, элюируя ацетатным буфером.

Пример 6. Влияние конъюгатов [²²⁵Ac]-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в модели ксенотрансплантата рака мочевого пузыря

[00219] Конъюгаты [²²⁵Ac]-анти-FGFR3 тестируют с использованием линии клеток мочевого пузыря человека UM-UC-1, которая экспрессирует FGFR3 дикого типа. Клетки UM-UC-1 вводят мышам с ослабленным иммунитетом. После образования опухолей мышам вводят конъюгат [²²⁵Ac]-анти-FGFR3, контроль (например, только буфер PBS или другой носитель) или необязательно неконъюгированное анти-FGFR3 антитело.

[00220] Объем опухоли контролируют два раза в неделю с помощью штангенциркуля, и результаты сравнивают между группами лечения. Выживание записывается. Большее ингибирование роста опухоли и/или большая выживаемость в группах лечения конъюгатом [²²⁵Ac]-анти-FGFR3 указывает на повышенную эффективность.

Пример 7. Влияние конъюгатов [²²⁵Ac]-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в моделях ксенотрансплантата рака мочевого пузыря с FGFR3 дикого типа и мутантным FGFR3

[00221] В то время как FGFR3 дикого типа сверхэкспрессируется при некоторых видах рака, некоторые опухоли связаны с мутантным FGFR3. В этом примере конъюгаты [²²⁵Ac]-анти-FGFR3 тестируют с использованием различных линий клеток мочевого пузыря человека, которые экспрессируют либо дикий тип, либо мутантный FGFR3.

[00222] Клетки рака мочевого пузыря RT112, которые экспрессируют FGFR3 дикого типа, вводят голым мышам (nu/nu) и позволяют опухолям вырасти до среднего объема ~100-150 мм³. Животным два раза в неделю вводят носитель или конъюгат [²²⁵Ac]-анти-FGFR3. Необязательно, третьей группе животных вводят неконъюгированное антитело к FGFR3.

[00223] Опухоли измеряют два раза в неделю с помощью штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывают по формуле:

$$V=0,5 \times a \times b^2$$

где a и b - длина и ширина опухоли, соответственно.

[00224] Рост опухоли сравнивают между группами.

[00225] Для оценки эффектов конъюгатов [²²⁵Ac]-анти-FGFR3 на передачу сигналов FGFR3 лизаты опухолей собирали через 48 и 72 часа после обработки. Исследовали фосфорилирование и уровни общего белка FRS2α, АКТ и p44/42 MAPK (последующие медиаторы передачи сигналов FGFR3) в лизатах опухолей.

[00226] Кроме того, эффекты конъюгатов [²²⁵Ac]-анти-FGFR3 изучают на модели аллотрансплантата Ba/F3-FGFR3S249C. См., например, Qing et al., "Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice." J Clin Invest. 2009 May 1; 119(5): 1216-1229. (S249C является наиболее частой мутацией FGFR3, обнаруживаемой при раке мочевого пузыря). Рост опухоли и опухолевые лизаты оценивают, как указано выше для модели ксенотрансплантата RT112.

Пример 8. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в моделях ксенотрансплантата множественной миеломы

[00227] OPM2 и KMS11 представляют собой клеточные линии множественной миеломы t(4:14)+, несущие мутации K650E и Y373C FGFR3, соответственно. Конъюгаты [^{225}Ac]-анти-FGFR3 тестируют на моделях ксенотрансплантатов OPM2 и KMS11. Клетки размножают, и 15×10^6 клеток OPM2 или 20×10^6 клеток KMS11 имплантируют подкожно в бока мышей в объеме 0,2 мл в сбалансированном солевом растворе Хэнка (HBSS)/Matrigel (1:1 об./об.: BD Biosciences). Опухоли измеряют дважды в неделю штангенциркулем и рассчитывают объем опухоли, как описано в примере 7.

[00228] Когда опухоли достигают среднего размера 150-200 мм³, животных случайным образом распределяют в экспериментальную или контрольную группу. Каждый конъюгат [^{225}Ac]-анти-FGFR3 можно тестировать в отдельной группе лечения. Контрольная группа может включать мышей, которым вводили HBSS или другой носитель. Необязательно для сравнения включают одну или несколько групп лечения, в которых мышам вводят неконъюгированное анти-FGFR3 антитело (холодное антитело). Мышам во всех группах два раза в неделю внутрибрюшинно вводили соответствующие агенты для их группы.

[00229] Объем опухоли контролируют два раза в неделю с помощью штангенциркуля, и результаты сравнивают между группами лечения. Выживание записывается. Большее ингибирование роста опухоли и/или большая выживаемость в группах лечения конъюгатом [^{225}Ac]-анти-FGFR3 указывает на повышенную эффективность.

Пример 9. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в модели ксенотрансплантата рака печени

[00230] Конъюгаты [^{225}Ac]-анти-FGFR3 тестируют в модели ксенотрансплантата опухоли на основе клеточной линии рака печени (Huh7), по существу, как описано в примере 8.

Пример 10. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в модели ксенотрансплантата рака молочной железы

[00231] Конъюгаты [^{225}Ac]-анти-FGFR3 тестируют в модели ксенотрансплантата опухоли на основе клеточной линии рака молочной железы (Cal-51), по существу, как описано в примере 8.

Пример 11. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в модели ксенотрансплантата аденокарциномы толстого кишечника

[00232] Конъюгаты [^{225}Ac]-анти-FGFR3 тестировали на мышинной модели ксенотрансплантата аденокарциномы толстого кишечника MC38. FGFR3-положительные клетки MC38 размножают, и 1×10^6 клеток MC38 имплантируют подкожно в бока самкам мышей C57BL/6 в возрасте от 8 до 12 недель. При достижении опухолями среднего размера 80-120 мм³ животных подбирают по парам и распределяют в лечебную или контрольную группу. Каждый конъюгат [^{225}Ac]-анти-FGFR3 можно тестировать в

отдельной группе лечения. Контрольная группа может включать мышей, которым вводили фосфатно-солевой буфер (PBS). Необязательно для сравнения включают одну или несколько групп лечения, в которых мышам вводят неконъюгированное анти-FGFR3 антитело (холодное антитело). Мышам во всех группах можно вводить соответствующие агенты для их группы в соответствии с обычным графиком, например, еженедельно, два раза в неделю или три раза в неделю в течение одной или большего числа недель (например, 1, 2 или 3 недель) внутривенно или внутривентально.

[00233] Объем опухоли контролируют два раза в неделю с помощью штангенциркуля, и результаты сравнивают между группами лечения. Выживание записывается. Большее ингибирование роста опухоли и/или большая выживаемость в группах лечения конъюгатом [^{225}Ac]-анти-FGFR3 указывает на повышенную эффективность.

Пример 12. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на инфильтрацию иммунных клеток с использованием клеточной линии аденокарциномы

[00234] Клетки MC38 (аденокарциномы) имплантируют подкожно в бока самкам мышей C57BL/6 в возрасте от 8 до 12 недель. При достижении опухолями среднего размера 80-120 мм³ животных подбирают попарно и делят на основную и контрольную группы. Контрольная группа мышей получает PBS, группа (группы) лечения иммуноконъюгатом получает конъюгаты [^{225}Ac]-анти-FGFR3, а необязательная группа (группы) лечения антителом получает неконъюгированное антитело против FGFR3. Все группы получают лекарственное средство по одному и тому же пути и схеме введения: два раза в неделю внутривенно.

[00235] Через 7 дней лечения половину животных из каждой группы умерщвляют и собирают опухоли. После 14 дней лечения оставшуюся половину животных в каждой группе умерщвляют и собирают опухоли. Половину каждой опухоли обрабатывают для заливки парафином, а другую половину используют для приготовления суспензии отдельных клеток для анализов проточной цитометрией. Образцы для анализов проточной цитометрией окрашивают на CD8 и на маркеры Т-регуляторных клеток. Более высокое отношение CD8⁺ к регуляторным Т-клеткам может указывать на повышенную эффективность за счет инфильтрации иммунных клеток в опухоль.

Пример 13. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на развитие опухоли легкого

[00236] Конъюгаты [^{225}Ac]-анти-FGFR3 тестируют на двух моделях ксенотрансплантатов рака легкого у мышей: клетки карциномы легкого Madison 109 (M109) и карциномы легкого Льюиса, обе из которых являются FGFR3-положительными. 1×10^6 опухолевых клеток карциномы легкого Льюиса имплантируют подкожно в бока самкам мышей C57BL/6 в возрасте от 8 до 12 недель. Кроме того, 1×10^6 опухолевых клеток Madison 109 имплантируют подкожно в бока самкам мышей CR BALB/c в возрасте от 8 до 12 недель.

[00237] Когда опухоли достигают среднего размера 100-200 мм³, животных подбирают по парам и начинают лечение. Каждый конъюгат [^{225}Ac]-анти-FGFR3 можно

тестировать в отдельной группе лечения. Контрольная группа может включать мышей, которым вводили фосфатно-солевой буфер (PBS). Необязательно для сравнения включают одну или несколько групп лечения, в которых мышам вводят конъюгированное анти-FGFR3 антитело (холодное антитело). Мышам во всех группах можно вводить (внутривенно или внутривентально) соответствующие агенты для их группы в соответствии с обычным графиком, например, еженедельно, два раза в неделю или три раза в неделю. В этом примере мыши получают лечение в течение одной, двух или трех недель (см. ниже).

[00238] Опухоли измеряют с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и результаты сравнивают между группами лечения. Большее ингибирование роста опухоли в группах лечения конъюгатом [^{225}Ac]-анти-FGFR3 указывает на повышенную эффективность.

[00239] Через 7 дней лечения некоторых животных из каждой группы умерщвляют и собирают опухоли. После 14 дней лечения некоторых из оставшихся животных в каждой группе умерщвляют и собирают опухоли. Остальным животным продолжают вводить дозы до 21-го дня, когда их умерщвляют и собирают их опухоли. Половину каждой опухоли обрабатывают для заливки парафином, а другую половину замораживают в криобуфере Optimal Cutting Temperature (O.C.T.).

Пример 14. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на выживаемость

[00240] Выполняют примеры 12 и/или 13, за исключением того, что мышей не умерщвляют, а вместо этого отслеживают рост опухоли и выживаемость в течение по меньшей мере месяцев. Повышенная выживаемость в группах лечения конъюгатом [^{225}Ac]-анти-FGFR3 указывает на повышенную терапевтическую эффективность.

Пример 15. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость клеточных линий рака мочевого пузыря, включающих слитый FGFR3

[00241] Конъюгаты [^{225}Ac]-анти-FGFR3 тестируют в моделях ксенотрансплантата опухоли на основе одной или нескольких линий клеток рака мочевого пузыря, RT4, RT112, SW780 и UMUC-14, по существу, как описано в примере 8. Клетки RT4 и RT112 содержат слитый FGFR3-TACC3, клетки SW780 содержат слитый FGFR3-BAIAP2L1, и клетки UMUC-14 содержат FGFR3S249C.

Пример 16. Связывание конъюгата DOTA-анти-FGFR3 с раковыми клетками, экспрессирующими FGFR3

[00242] Настоящий пример демонстрирует связывание конъюгированного анти-FGFR3 с FGFR3-положительными раковыми клетками в субнаномолярных/пикомолярных диапазонах K_d.

[00243] Немеченый конъюгат DOTA-анти-FGFR3 синтезировали с использованием 1) чистого R-энантиомера соединения C (см. пример 4) (то есть R-энантиомера (2R)-2-[4,7,10-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1-ил]пентандиовой кислоты (R-DOTA-GA), соединенной через кислотный линкер PEG3 с активным эфиром 2,3,5,6-тетрафторфенола) и 2) MFGR1877S (вофатамаба), антитела к FGFR3. Связывание DOTA-

анти-FGFR3 с FGFR3-положительными линиями раковых клеток RT4 (мочевой пузырь), RT112 (мочевой пузырь) и HepG2 (печень) оценивали с помощью проточной цитометрии.

[00244] На фиг. 4А, 4В и 4С показаны кривые связывания для RT4, RT112 и HepG2, соответственно, а соответствующие аффинности связывания (K_d) приведены в таблице 2.

[00245] Таблица 2. Аффинность связывания конъюгата анти-FGFR3 с раковыми клетками FGFR3+

	K_d [нМ] RT4	K_d [нМ] RT112	K_d [нМ] HepG2
Конъюгат анти-FGFR3	0,448	0,248	0,279

Пример 17. Биораспределение in vivo конъюгата [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3

[00246] Мышиную модель ксенотрансплантата клеточной линии RT4 мышам Balb/c nude использовали для оценки биораспределения in vivo меченного радиоактивным изотопом конъюгата анти-FGFR3. Конъюгат [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 синтезировали с использованием чистого R-энантиомера соединения С (см. пример 4), MFGR1877S (вофатамаба) и лютеция-177.

[00247] Группам животных с опухолями внутривенно вводили [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3. Дозы содержали около 23 микрокюри (мкКи) активности на 2 мкг (0,1 мг/кг) антитела. Через 4 ч, 24 ч, 48 ч, 96 ч и 168 ч после инъекции животных подвергали эвтаназии для определения уровня радиоактивности в крови, почках, печени, легких, селезенке, коже, опухоли и хвосте ($n=3$ на временную точку).

[00248] Результаты выражали в виде процентной доли введенной дозы на грамм ткани (% ВД/г) и представляли на фиг. 5. [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 быстро выводился из крови и временно поглощался печенью, легкими и селезенкой. Поглощение опухолью составляло около 5% ВД/г во все моменты времени. Гипотетически, наблюдаемый уровень поглощения опухолью может быть связан с небольшим размером опухолей RT4 (около 50 мм³).

Пример 18. Биораспределение in vivo конъюгата [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 после предварительного введения холодного анти-FGFR3

[00249] Настоящий пример демонстрирует поглощение раскрытых в настоящее время радиоиммуноконъюгатов опухолевыми клетками с более низкими уровнями поглощения в нормальных тканях.

[00250] Мышиную модель ксенотрансплантата клеточной линии RT112 мышам Balb/c nude использовали для оценки биораспределения in vivo [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 после предварительного введения холодного (немеченого радиоактивным изотопом, неконъюгированного) антитела к FGFR3.

[00251] Группам мышей с опухолями внутривенно вводили [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3. Дозы содержали около 23 микрокюри (мкКи) активности на 2 мкг (0,1 мг/кг) антитела. Приблизительно за три часа до введения [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 половине мышей вводили 100 мкг холодного анти-FGFR3 (вофатамаба) путем внутрибрюшинной

инъекции. Через 4 ч, 24 ч, 48 ч и 96 ч после инъекции животных подвергали эвтаназии для определения уровня радиоактивности в крови, кишечнике (тонком и толстом), почках и надпочечниках, печени и желчном пузыре, легких, селезенке, коже, мочевой пузырь, моче и опухоли (n=3 на временную точку).

[00252] Результаты выражали в виде% ВД/г и представляли на фиг. 6А и 6В. Предварительное введение холодного анти-FGFR3 снижало клиренс радиоактивности из крови, уменьшало поглощение [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 нормальными тканями и повышало поглощение [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 опухолями.

Пример 19. Биораспределение in vivo меченых радиоактивным изотопом конъюгатов анти-FGFR3, введенных совместно с холодным анти-FGFR3

[00253] Настоящий пример демонстрирует поглощение раскрытых в настоящее время радиоиммуноконъюгатов опухолевыми клетками с более низкими уровнями поглощения в нормальных тканях. Более того, настоящий пример демонстрирует, что конъюгаты DOTA-анти-FGFR3, меченные различными радионуклидами, демонстрируют сходные профили биораспределения.

[00254] Конъюгат [^{111}In]-DOTA-анти-FGFR3 синтезировали с использованием чистого R-энантиомера соединения С (см. пример 4), MFGR1877S (вофатамба) и индия-111.

[00255] Мышиную модель ксенотрансплантата клеточной линии RT112 мышам Balb/c nude использовали для оценки биораспределения in vivo конъюгата [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 и конъюгатов [^{111}In]-DOTA-анти-FGFR3 при совместном введении с холодным анти-FGFR3.

[00256] Группам мышей с опухолями внутривенно вводили [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 с активностью около 22 микрокюри (мКи) на 2 мкг (0,1 мг/кг) антитела. Мышам также совместно вводили 50, 100 или 200 мкг холодного анти-FGFR3 посредством той же внутривенной инъекции. Через 24 ч и 96 ч после инъекции животных подвергали эвтаназии для определения уровней радиоактивности в крови, кишечнике, почках, печени, легких, селезенке, коже, мочевом пузыре, моче и опухоли (n=3 на временную точку).

[00257] Результаты выражали в виде% ВД/г и представляли на фиг. 7А-7С. Совместное введение 100 мкг или 200 мкг холодного анти-FGFR3 снижает клиренс радиоактивности из крови, снижает поглощение [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 нормальными тканями и увеличивает поглощение [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 опухолями.

[00258] Также было проведено исследование биораспределения с использованием [^{111}In]-DOTA-анти-FGFR3 в сочетании со 100 мкг холодного анти-FGFR3, аналогично тому, как описано для эксперимента по совместному введению [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 в этом примере. На фиг. 8А и 8В показаны результаты % ВД/г у мышей, которым вводили [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 (фиг. 8А) или [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3 (фиг. 8В) совместно с анти-FGFR3. Как [^{177}Lu]-DOTA-анти-FGFR3, так и [^{111}In]-DOTA-анти-FGFR3 показали хорошее поглощение опухолью с примерно 34%-37% ВД/г через 96 часов после введения дозы.

Пример 20. Влияние конъюгата [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в модели ксенотрансплантата рака мочевого пузыря

[00259] Настоящий пример демонстрирует терапевтическую эффективность конъюгата [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 на модели рака мочевого пузыря.

[00260] Конъюгат [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 синтезировали с использованием чистого R-энантиомера соединения С (см. пример 4), MFGR1877S (вофатамаба) и актиния-225.

[00261] Мышиную модель ксенотрансплантата клеточной линии RT112 мышам Balb/c nude использовали для оценки *in vivo* активности конъюгата [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 после предварительного введения холодного анти-FGFR3. Опухоли выращивали подкожно до объема около 150 мм³. Группам мышей с опухолями внутривенно вводили [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 (дозы 50 нКи, 100 нКи, 200 нКи или 400 нКи), холодные анти-FGFR3 или контрольные носители (n=5 на группу). За исключением мышей в контрольной группе, за 3 часа до введения [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 мышам внутрибрюшинно вводили с помощью инъекции 100 мкг холодного анти-FGFR3. Относительный объем опухоли (фиг. 9А) и относительный вес тела (фиг. 9В) оценивали вплоть до 28 дней после введения.

[00262] Как показано на фиг. 9А, введение 200 нКи или 400 нКи [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 значительно ингибировало рост опухоли. Одна мышь в группе 400 нКи потеряла 30% массы тела и была умерщвлена на 11-й день. Однако, как показано на фиг. 9В, в среднем у мышей в группах лечения не наблюдалось значительной потери веса по сравнению с мышами в контрольных группах, что свидетельствует о переносимости лечения и ограниченной токсичности.

Пример 21. Влияние конъюгатов [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 на рост опухоли и выживаемость в модели ксенотрансплантата рака мочевого пузыря

[00263] Настоящий пример демонстрирует терапевтическую эффективность конъюгата [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 на модели рака мочевого пузыря.

[00264] Мышиную модель ксенотрансплантата клеточной линии RT112 мышам Balb/c nude использовали для оценки *in vivo* активности конъюгата [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 с совместным введением холодного анти-FGFR3. Опухоли давали расти подкожно примерно до 150 мм³ в объеме. Группам мышей с опухолями внутривенно вводили [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 (50 нКи, 100 нКи, 200 нКи или 400 нКи) совместно со 100 мкг анти-FGFR3. Контрольные группы получали только холодное анти-FGFR3 или носитель в качестве контроля. n=5 на группу. Относительный объем опухоли (фиг. 10А) и относительный вес тела (фиг. 10В) оценивали вплоть до 28 дней после введения.

[00265] Как показано на фиг. 10А, воздействие 200 нКи или 400 нКи [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 значительно ингибировало рост опухоли, а воздействие более низких доз (50-100 нКи) [^{225}Ac]-DOTA-анти-FGFR3 приводило к некоторому ингибированию роста опухоли.

[00266] В группе лечения 400 нКи две мыши значительно потеряли в весе и были

умерщвлены, а остальные три мышцы не пострадали. Однако мышцы в других лечебных группах не продемонстрировали существенной потери веса по сравнению с мышцами в контрольных группах. (См. фиг. 10В).

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00267] Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дальнейшие модификации, и данная заявка предназначена для охвата любых вариантов, применений или адаптаций изобретения, в общем следующих принципам изобретения, и включая такие отступления от настоящего раскрытия, которые относятся к известной или общепринятой практике в области техники, к которой относится изобретение, и которые могут быть применены к изложенным выше существенным признакам.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Радиоиммуноконъюгат, имеющий следующую структуру:

A-L-B

Формула I-a

где А представляет собой хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом,

где В представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3, и

где L представляет собой линкер.

2. Радиоиммуноконъюгат по п.1, где А представляет собой комплекс металла с хелатирующим фрагментом.

3. Радиоиммуноконъюгат по п.2, где комплекс металла содержит радионуклид.

4. Радиоиммуноконъюгат по п.3, где радионуклид представляет собой альфа-излучатель.

5. Радиоиммуноконъюгат по п.4, где радионуклид представляет собой альфа-излучатель, выбранный из группы, состоящей из астата-211 (^{211}At), висмута-212 (^{212}Bi), висмута-213 (^{213}Bi), актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), свинца-212 (^{212}Pb), тория-227 (^{227}Th) и тербия-149 (^{149}Tb) или их производных.

6. Радиоиммуноконъюгат по п.5, где радионуклид представляет собой ^{225}Ac или его производное.

7. Радиоиммуноконъюгат по п.1, где L имеет структуру $\text{L}^1-(\text{L}^2)_n$ -, показанную в формуле I-b:

$\text{A-L}^1-(\text{L}^2)_n\text{-B}$

Формула I-b

где:

А представляет собой хелатирующий фрагмент или его комплекс с металлом;

В представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3;

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

n находится в диапазоне от 1 до 5 (включительно); и

каждый L^2 независимо имеет структуру:

$(-\text{X}^1-\text{L}^3-\text{Z}^1-)$

Формула III

где:

X^1 представляет собой $\text{C}=\text{O}(\text{NR}^1)$, $\text{C}=\text{S}(\text{NR}^1)$, $\text{OC}=\text{O}(\text{NR}^1)$, $\text{NR}^1\text{C}=\text{O}(\text{O})$, $\text{NR}^1\text{C}=\text{O}(\text{NR}^1)$, $-\text{CH}_2\text{PhC}=\text{O}(\text{NR}^1)$, $-\text{CH}_2\text{Ph}(\text{NH})\text{C}=\text{S}(\text{NR}^1)$, O или NR^1 ; и каждый R^1 независимо представляет собой H, необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил, необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_6$ -гетероалкил или необязательно замещенный арил или гетероарил, где $\text{C}_1\text{-C}_6$ -алкил может быть замещен оксо-группой ($=\text{O}$), гетероариллом или их комбинацией;

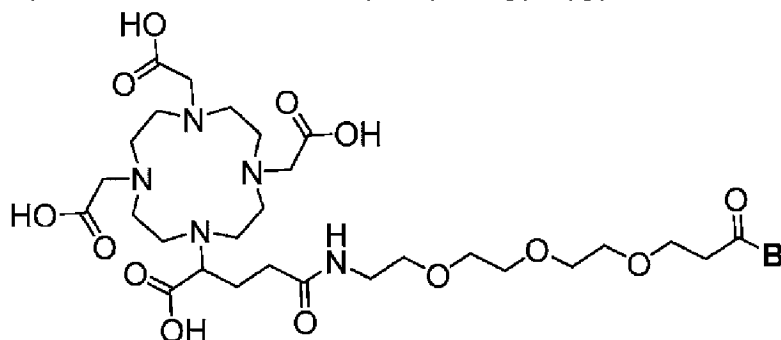
L^3 представляет собой необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_{50}$ -алкил или необязательно замещенный $\text{C}_1\text{-C}_{50}$ -гетероалкил; и

Z^1 представляет собой CH_2 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{OC}=\text{O}$, $\text{NR}^1\text{C}=\text{O}$ или NR^1 , где R^1

представляет собой водород или необязательно замещенный C₁-C₆-алкил или пирролидин-2,5-дион.

8. Радиоиммуноконъюгат по п.7, где L³ представляет собой C₅-C₂₀-полиэтиленгликоль C5-C20.

9. Радиоиммуноконъюгат по п.7 или его фармацевтически приемлемая соль, где радиоиммуноконъюгат имеет следующую структуру:



где В представляет собой фрагмент, нацеливающий на FGFR3.

10. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.1-9, где молекула, нацеливающая на FGFR3, имеет размер по меньшей мере 100 кДа.

11. Радиоиммуноконъюгат по п.10, где молекула, нацеливающая на FGFR3, имеет размер по меньшей мере 150 кДа.

12. Радиоиммуноконъюгат по п.11, где молекула, нацеливающая на FGFR3, имеет размер по меньшей мере 200 кДа.

13. Радиоиммуноконъюгат по п.12, где молекула, нацеливающая на FGFR3, имеет размер по меньшей мере 250 кДа.

14. Радиоиммуноконъюгат по п.13, где молекула, нацеливающая на FGFR3, имеет размер по меньшей мере 300 кДа.

15. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.1-14, где фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться с FGFR3 человека.

16. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.1-15, где фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться с FGFR3 дикого типа.

17. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.1-15, где фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться с мутантным FGFR3.

18. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.17, где фрагмент, нацеливающий на FGFR3, способен связываться как с FGFR3 дикого типа, так и с мутантным FGFR3.

19. Радиоиммуноконъюгат по п.17 или 18, где мутантный FGFR3 содержит точечную мутацию.

20. Радиоиммуноконъюгат по п.19, где точечная мутация связана с раком.

21. Радиоиммуноконъюгат по п.20, где точечный мутант выбирают из группы, состоящей из FGFR3^{Y375C}, FGFR3^{R248C}, FGFR3^{S249C}, FGFR3^{G372C}, FGFR3^{K652E}, FGFR3^{K652Q}, FGFR3^{K652M} и их комбинаций.

22. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.16-21, где мутантный FGFR3 содержит

слитый FGFR3.

23. Радиоиммуноконъюгат по п.22, где слитый FGFR3 выбирают из группы, состоящей из FGFR3-TACC3, FGFR3-CAMK2A, FGFR3-JAKMOP1, FGFR3-TNIP2, FGFR3-WHSC1, FGFR3-BAIAP2L1 и их комбинаций.

24. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.1-23, где фрагмент, нацеливающий на FGFR3, содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

25. Радиоиммуноконъюгат по п.24, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

26. Радиоиммуноконъюгат по п.24 или 25, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), выбранную из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

27. Радиоиммуноконъюгат по п.26, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или

или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; или

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

31. Радиоиммуноконъюгат по п.30, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

32. Радиоиммуноконъюгат по п.24 или 25, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) переменный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или

аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и
 CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или
 аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

33. Радиоиммуноконъюгат по п.32, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) переменный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

34. Радиоиммуноконъюгат по п.32 или 33, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4; и

(ii) переменный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

35. Радиоиммуноконъюгат по п.34, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4; и
 (ii) переменный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере две CDR, выбранные из группы, состоящей из:

CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

36. Радиоиммуноконъюгат по п.35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4, или аминокислотную последовательность, отличающуюся на 1 или 2 аминокислоты от SEQ ID NO: 3 или 4;

и

(ii) переменный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от нее на 1 или 2 аминокислоты.

37. Радиоиммуноконъюгат по п.36, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4;

и

(ii) переменный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

38. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.27-37, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(ii) переменный домен легкой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

39. Радиоиммуноконъюгат по п.38, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(ii) переменный домен легкой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

40. Радиоиммуноконъюгат по п.39, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(ii) переменный домен легкой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

41. Радиоиммуноконъюгат по п.40, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) переменный домен тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и

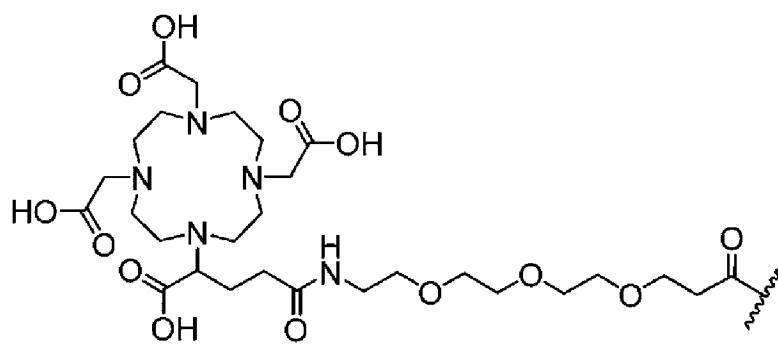
(ii) переменный домен легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

42. Радиоиммуноконъюгат по п.41, где антитело представляет собой MFGR1877S (вофатамаб).

43. Радиоиммуноконъюгат по любому из пп.1-42, где после введения радиоиммуноконъюгата или его композиции млекопитающему доля радиации, выводимой кишечным путем, почечным путем или обоими путями, по меньшей мере в 2 раза превышает долю радиации, выводимой тем же путем (путями) сопоставимым млекопитающим, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат.

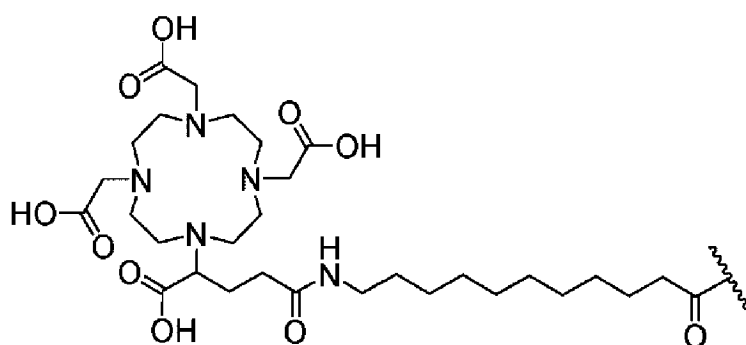
44. Радиоиммуноконъюгат по п.43, где после введения радиоиммуноконъюгата или его композиции млекопитающему доля радиации, выводимой кишечным путем, почечным путем или обоими путями, по меньшей мере в 3 раза превышает долю радиации, выводимой тем же путем (путями) у сопоставимого млекопитающего, которому вводили эталонный радиоиммуноконъюгат.

45. Радиоиммуноконъюгат по п.1, где A-L- представляет собой комплекс металла с соединением, выбранным из группы, состоящей из:



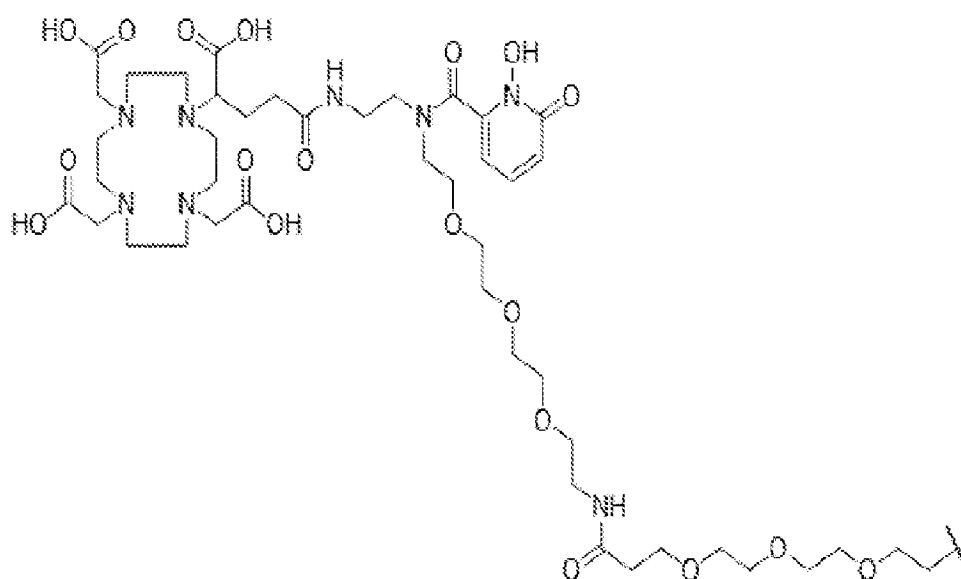
(i)

(Соединение 1),



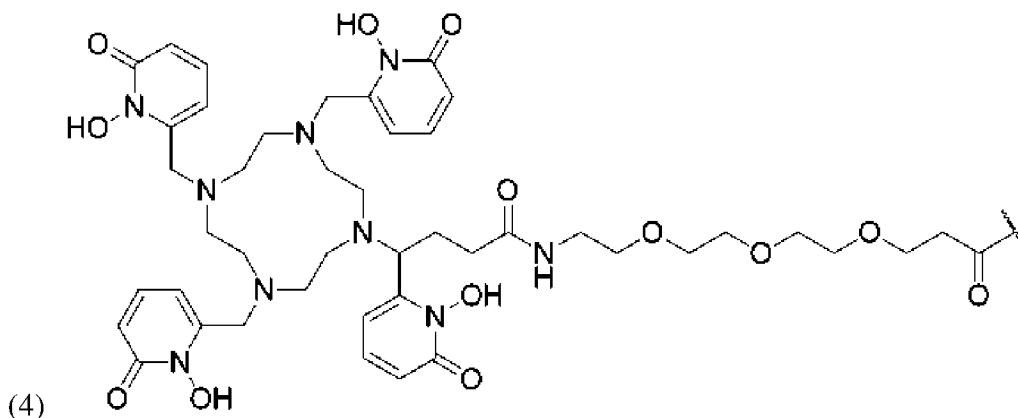
(ii)

(Соединение 2),



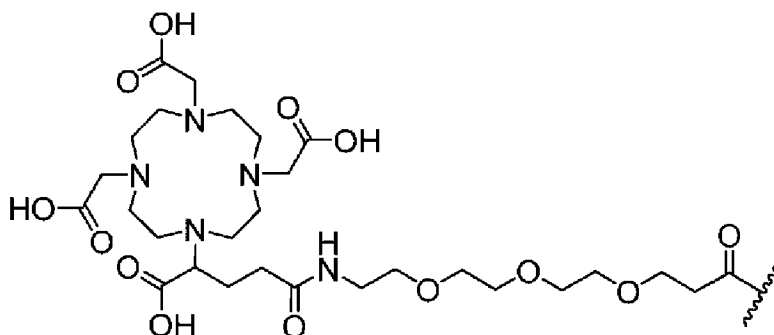
(iii)

(Соединение 3) и



(Соединение 4).

46. Радиоиммуноконъюгат по п.45, где A-L- представляет собой комплекс металла с:



(Соединение 1)

47. Радиоиммуноконъюгат по п.46, где комплекс металла содержит радионуклид.

48. Радиоиммуноконъюгат по п.47, где радионуклид представляет собой альфа-излучатель.

49. Радиоиммуноконъюгат по п.48, где радионуклид представляет собой альфа-излучатель, выбранный из группы, состоящей из астата-211 (^{211}At), висмута-212 (^{212}Bi), висмута-213 (^{213}Bi), актиния-225 (^{225}Ac), радия-223 (^{223}Ra), свинца-212 (^{212}Pb), тория-227 (^{227}Th) и тербия-149 (^{149}Tb) или их производных.

50. Радиоиммуноконъюгат по п.49, где радионуклид представляет собой ^{225}Ac или его производное.

51. Радиоиммуноконъюгат по п.50, где фрагмент, нацеливающий на FGFR3, содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

52. Радиоиммуноконъюгат по п.51, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными.

53. Радиоиммуноконъюгат по п.52, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4;
и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

54. Радиоиммуноконъюгат по п.52, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

55. Радиоиммуноконъюгат по п.54, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

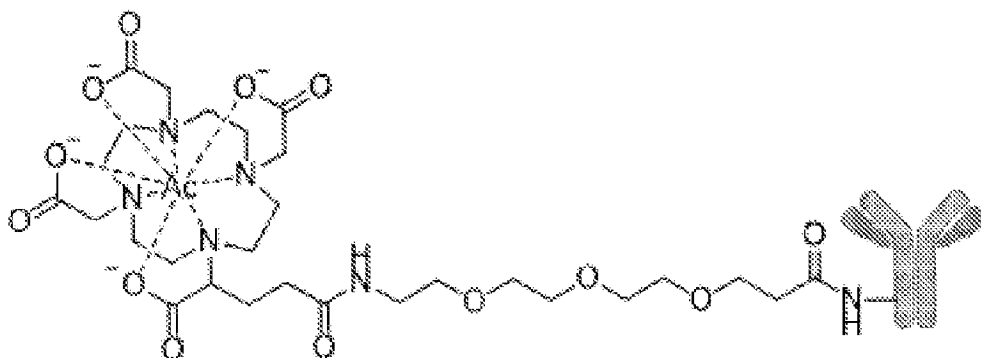
(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и

(ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

56. Радиоиммуноконъюгат по п.55, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой MFGR1877S (вофатамаб) или его антигенсвязывающий фрагмент.

57. Радиоиммуноконъюгат по п.56, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой MFGR1877S (вофатамаб).

58. Радиоиммуноконъюгат по п.46, где указанный радиоиммуноконъюгат имеет следующую структуру:



где

представляет собой MFGR1877S (вофатамаб), где аминогруппа NH-,

присоединенная к показанному выше антителу, относится к остатку лизина, который является частью антитела.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая радиоиммуноконъюгат по любому из пп.1-58 и фармацевтически приемлемый носитель.

60. Способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество радиоиммуноконъюгата по любому из пп.1-58.

61. Способ по п.60, где субъектом является млекопитающее.

62. Способ по п.61, где млекопитающим является человек.

63. Способ по любому из пп.60-62, где рак представляет собой солидную раковую опухоль.

64. Способ по п.63, где солидная раковая опухоль представляет собой аденокортикальную карциному, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, аденокарциному эндометрия, саркому Юинга, карциному желчного пузыря, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, нейробластому, нейроэндокринный рак, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, аденоидно-кистозный рак слюнных желез или сперматоцитарную семиному.

65. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря.

66. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой глиому.

67. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой нейробластому.

68. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

69. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой рак молочной железы.

70. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой рак головы и шеи.

71. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой рак печени.

72. Способ по п.64, где солидная раковая опухоль представляет собой рак легкого.

73. Способ по любому из пп.60-62, где рак представляет собой несолидную раковую опухоль.

74. Способ по п.73, где рак представляет собой подвижный рак или гематологический рак.

75. Способ по п.74, где рак представляет собой миелому.

76. Способ по п.75, где миелома представляет собой множественную миелому.

77. Способ по п.74, где рак представляет собой лейкемию.

78. Способ по п.74, где рак представляет собой лимфому.

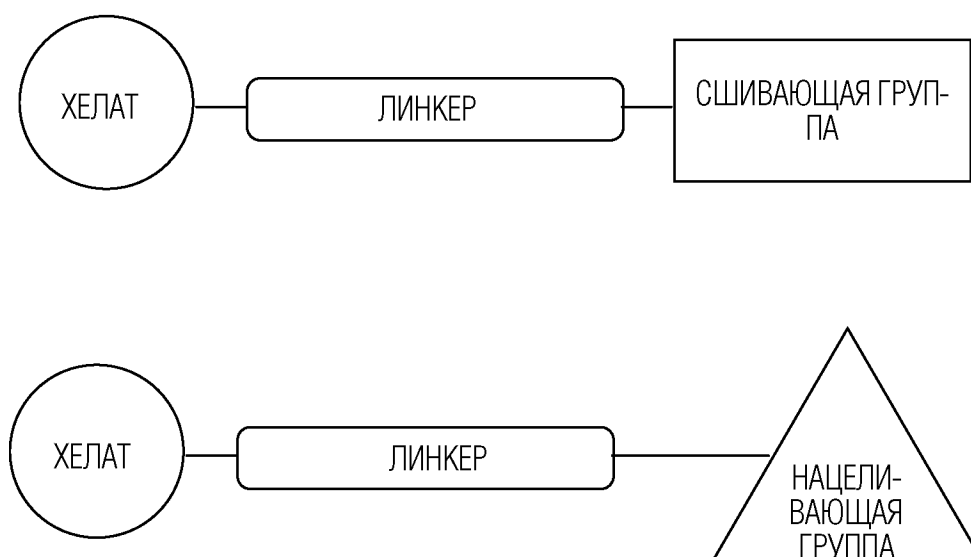
79. Способ по любому из пп.60-78, где фармацевтическую композицию вводят

системно.

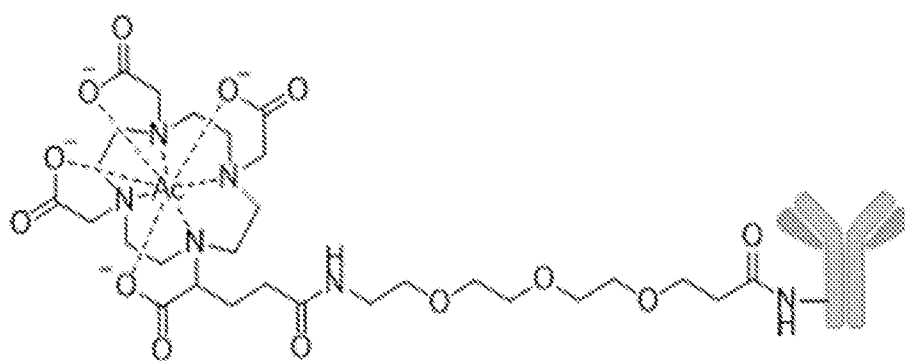
- 80. Способ по п.79, где фармацевтическую композицию вводят парентерально.
- 81. Способ по п.80, где фармацевтическую композицию вводят внутривенно.
- 82. Способ по п.80, где фармацевтическую композицию вводят внутриартериально.
- 83. Способ по п.80, где фармацевтическую композицию вводят внутрибрюшинно.
- 84. Способ по п.80, где фармацевтическую композицию вводят подкожно.
- 85. Способ по п.80, где фармацевтическую композицию вводят внутрикожно.
- 86. Способ по п.79, где фармацевтическую композицию вводят энтерально.
- 87. Способ по п.86, где фармацевтическую композицию вводят через желудочно-кишечный тракт.
- 88. Способ по п.86, где фармацевтическую композицию вводят перорально.
- 89. Способ по любому из пп.60-78, где фармацевтическую композицию вводят местно.
- 90. Способ по п.89, где фармацевтическую композицию вводят периопухолевой инъекцией.
- 91. Способ по п.89, где фармацевтическую композицию вводят внутриопухолевой инъекцией.

По доверенности

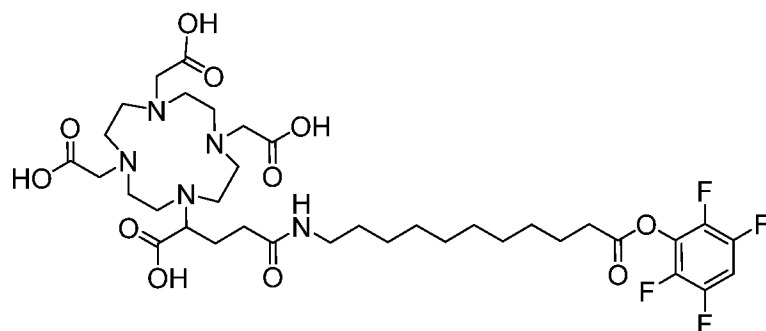
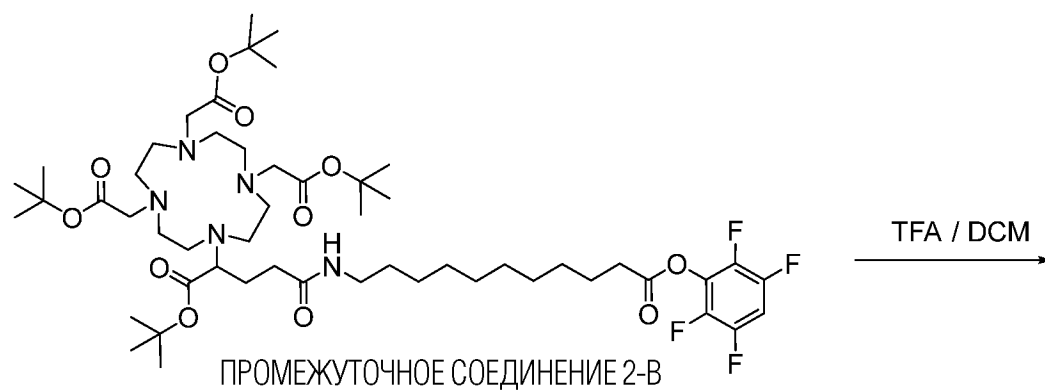
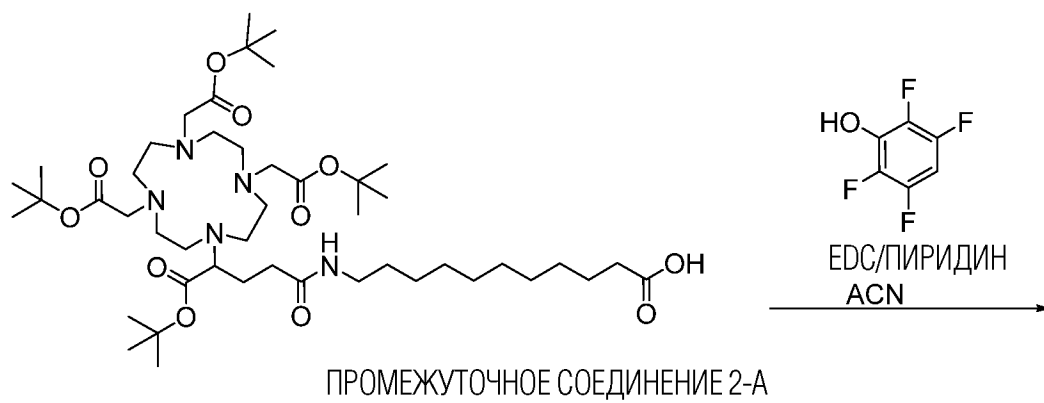
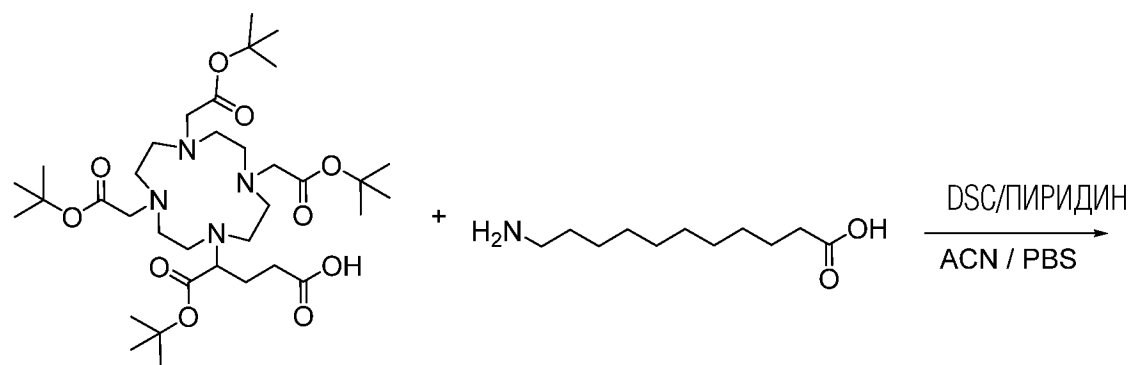
1/13



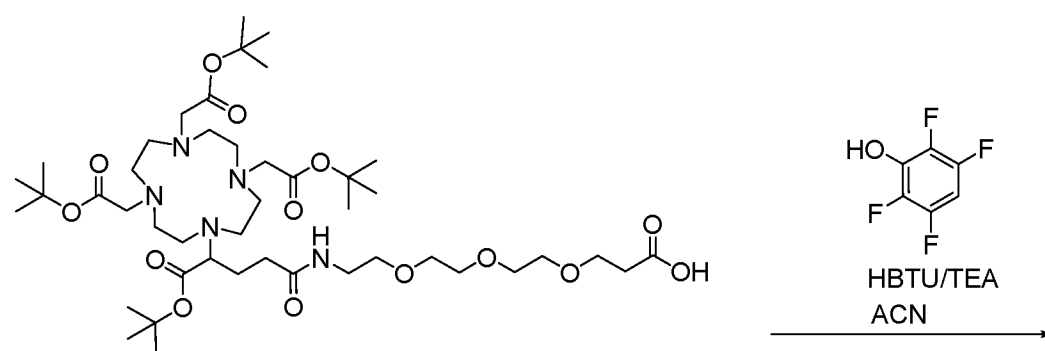
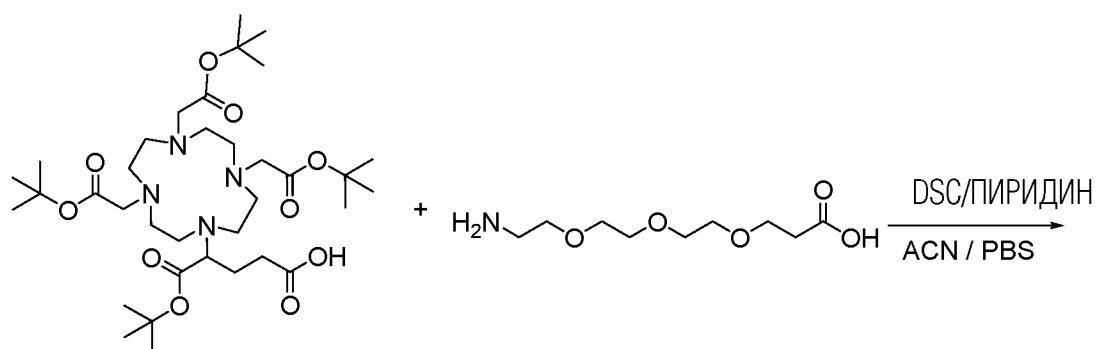
ФИГ. 1А



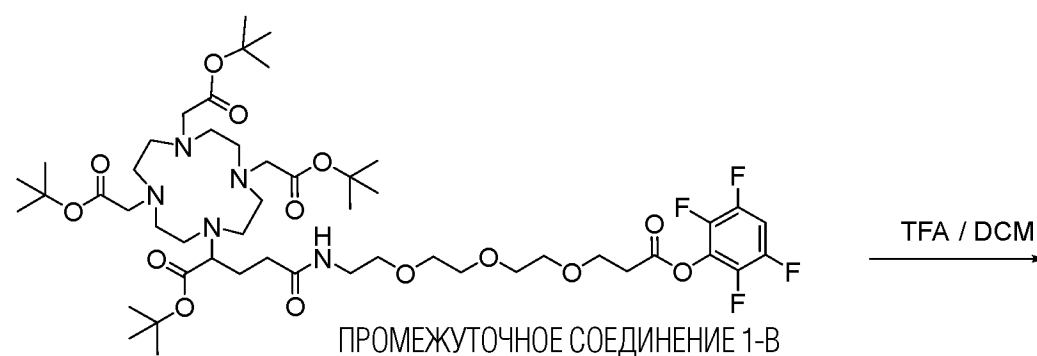
ФИГ. 1В



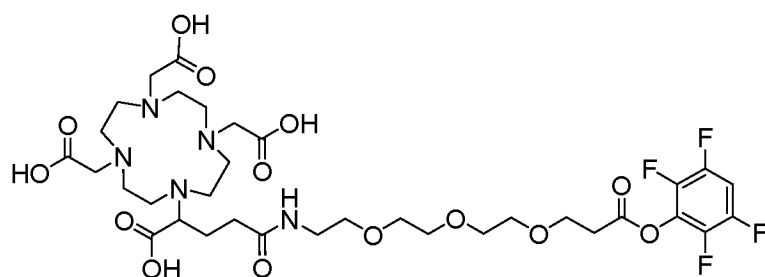
ФИГ. 2



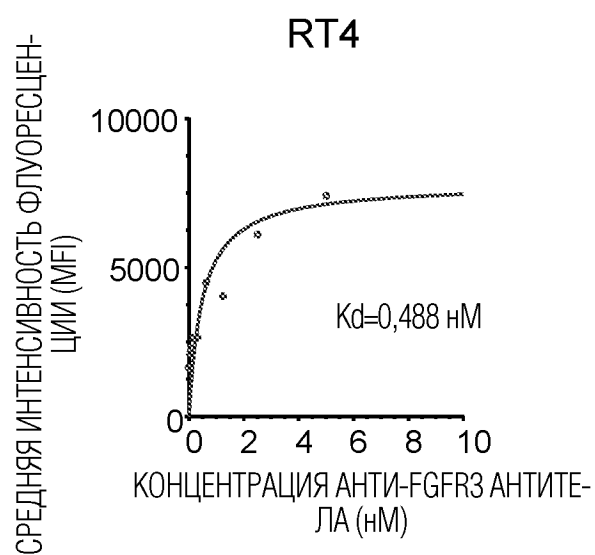
ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 1-A



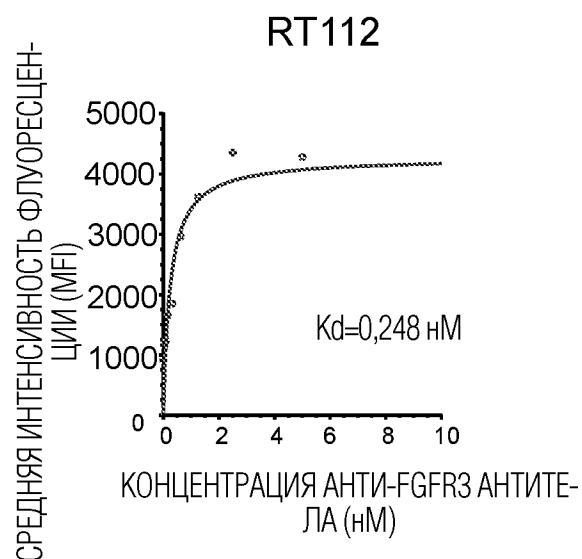
ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ 1-B



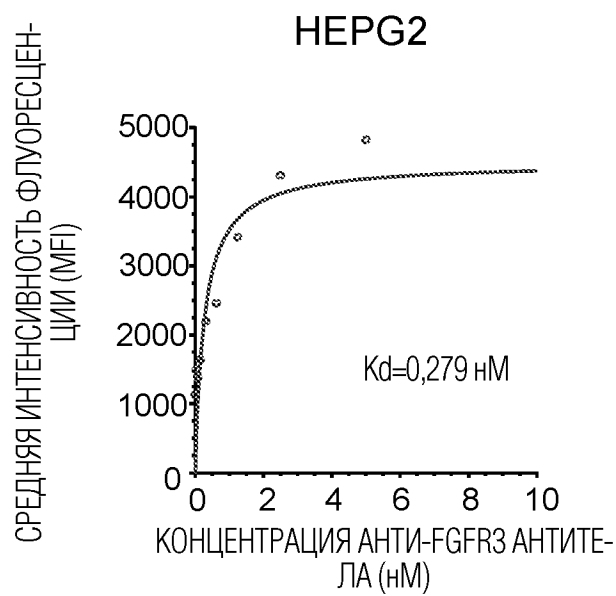
ФИГ. 3



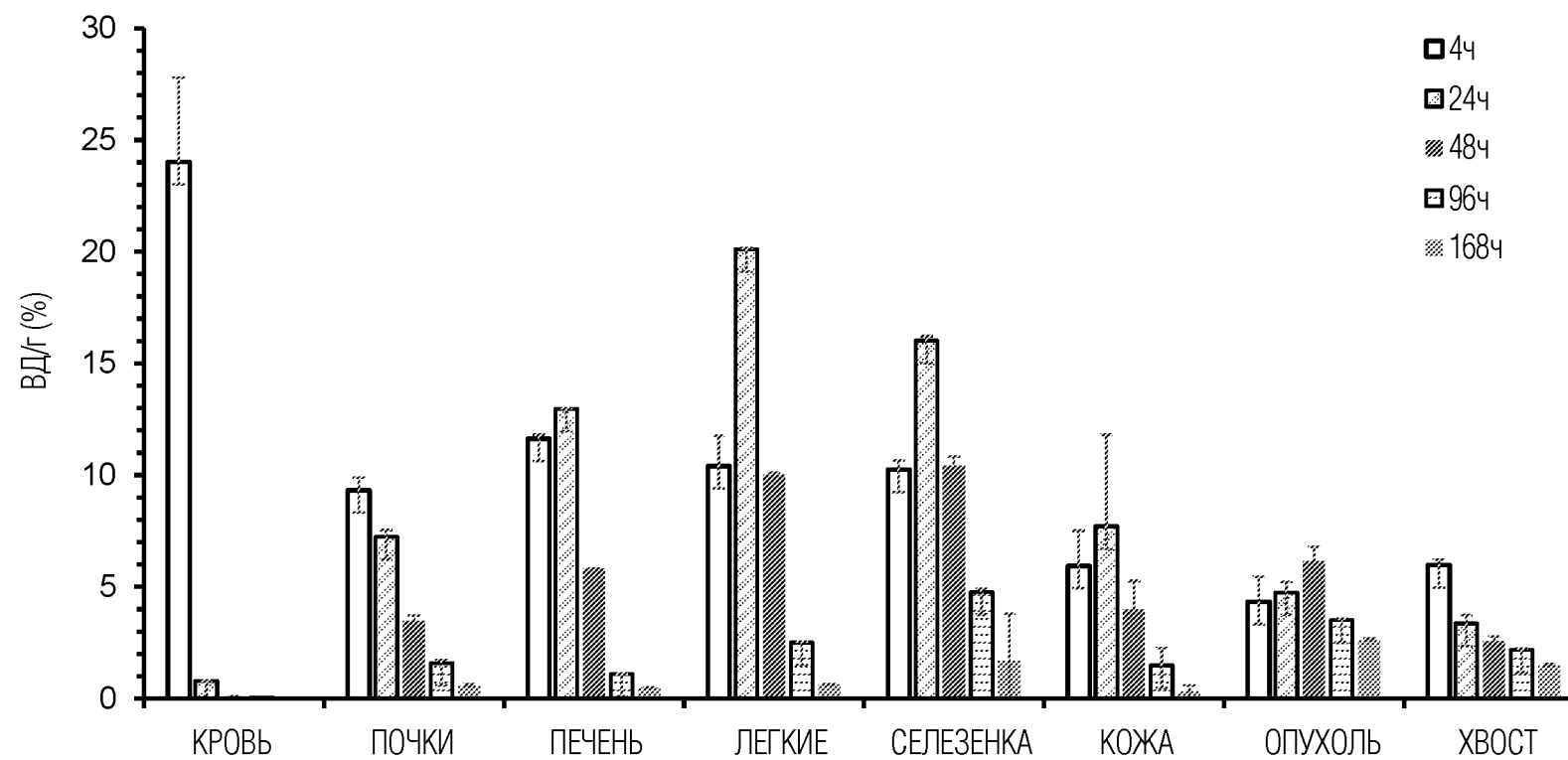
ФИГ. 4А



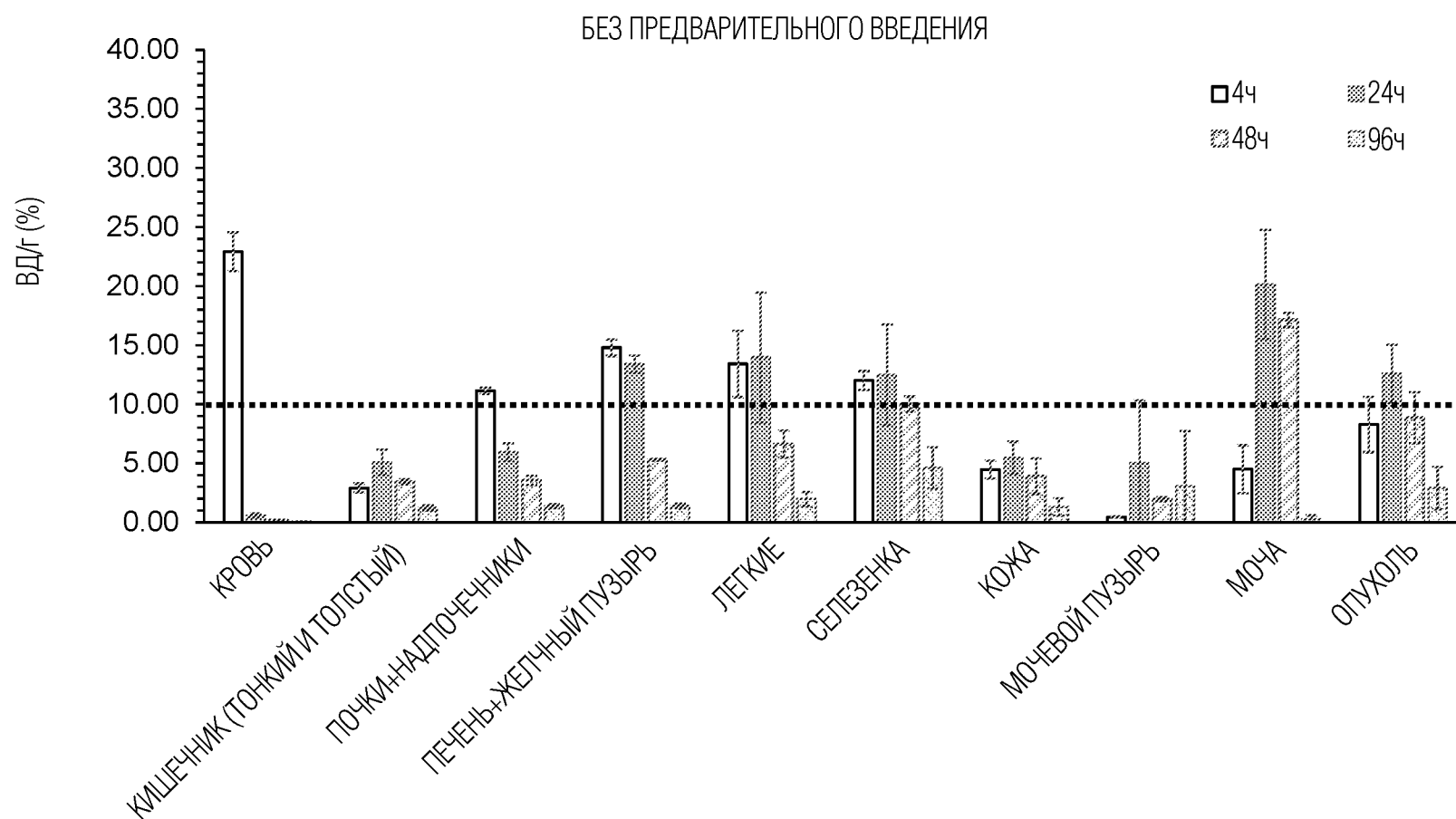
ФИГ. 4В



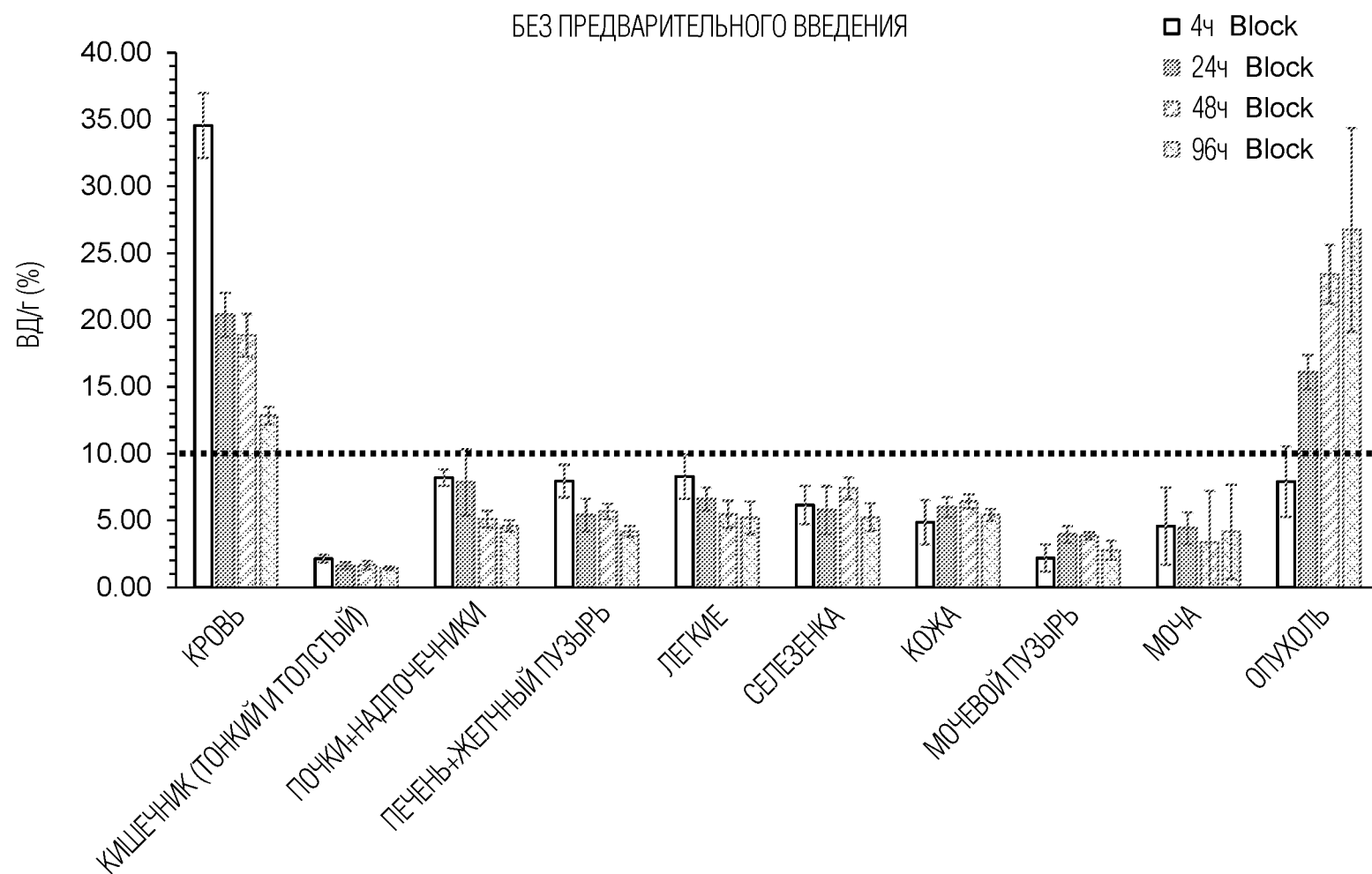
ФИГ. 4С



ФИГ. 5



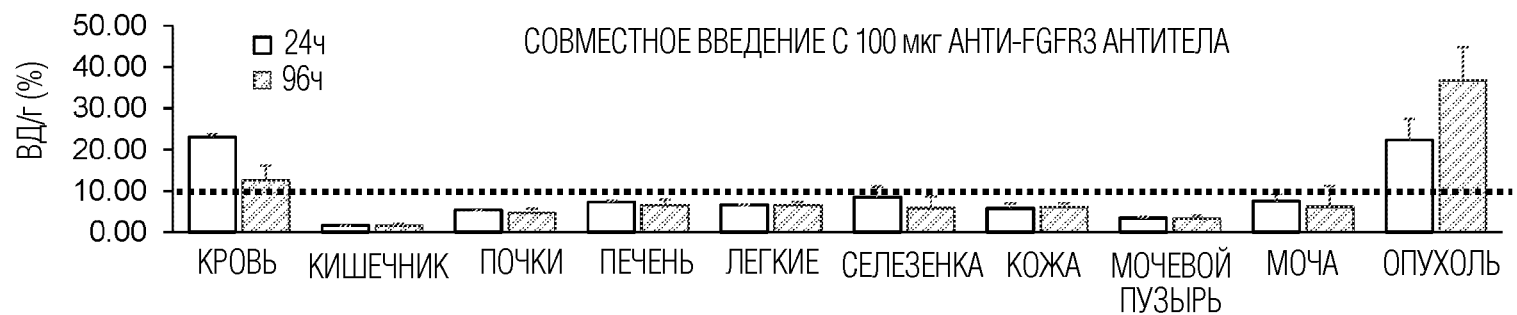
ФИГ. 6А



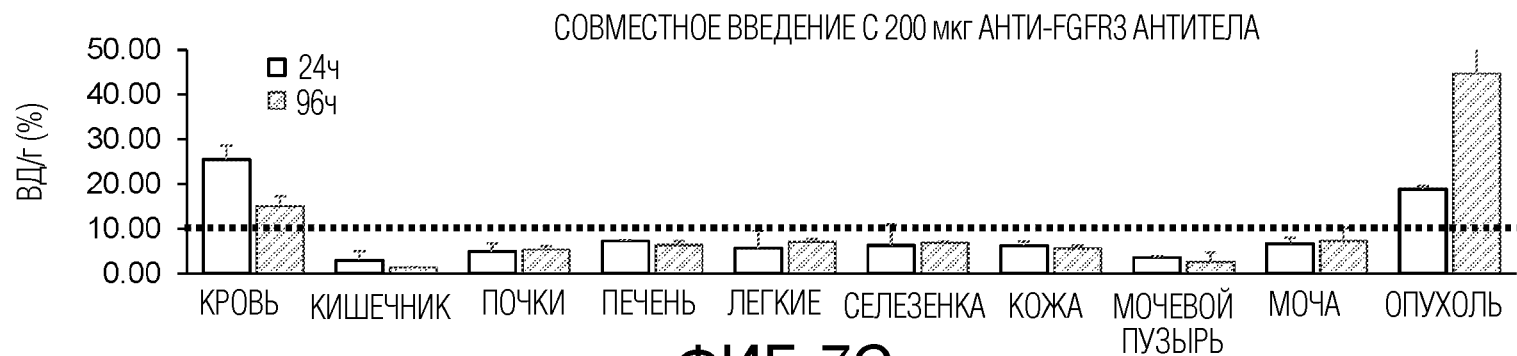
ФИГ. 6В



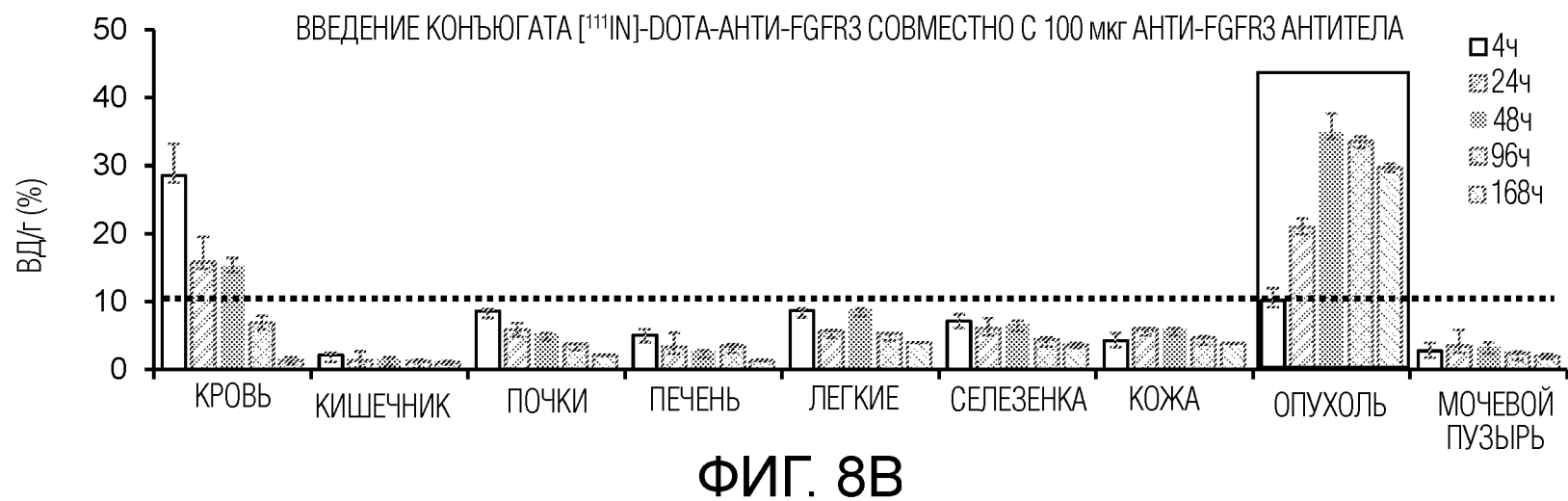
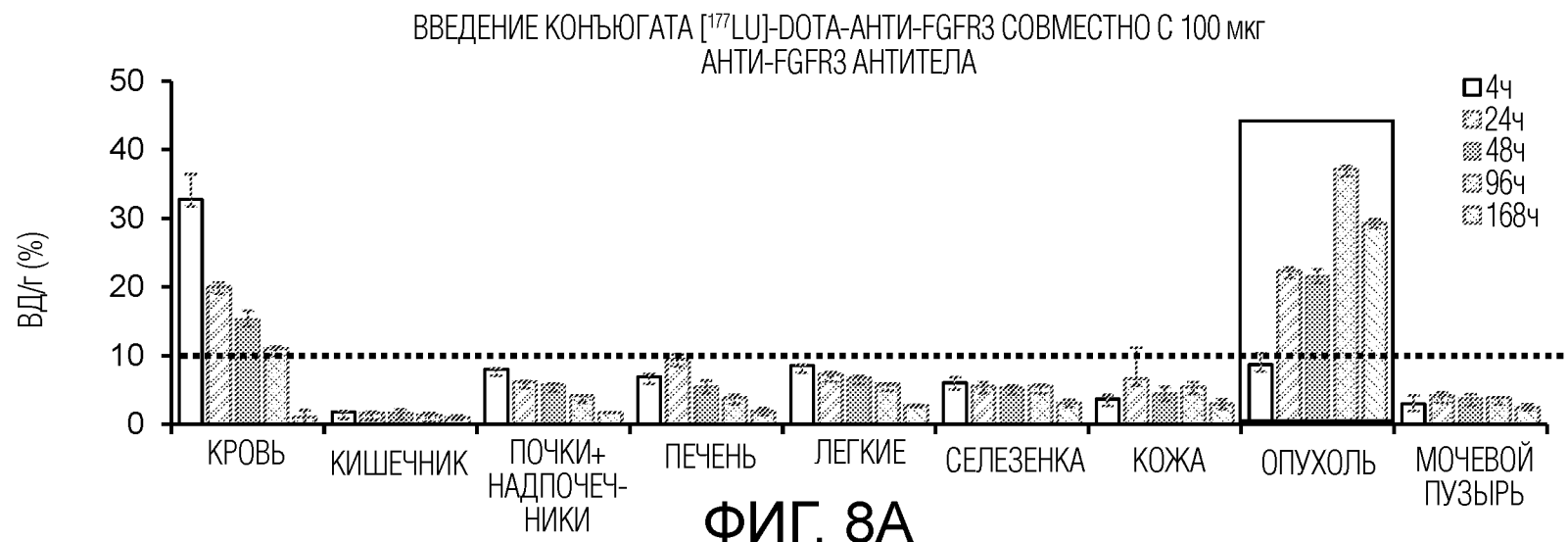
ФИГ. 7А

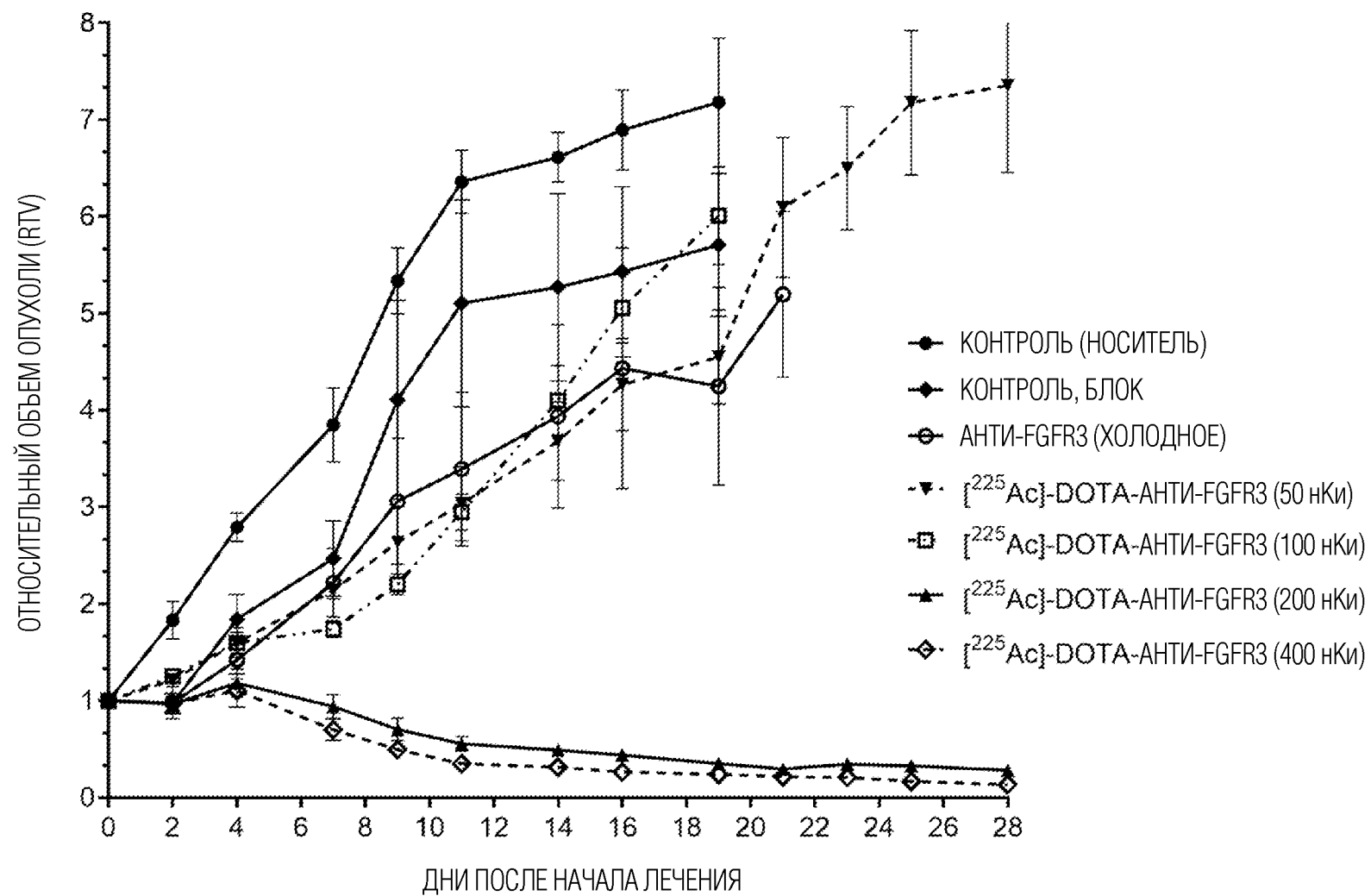


ФИГ. 7В

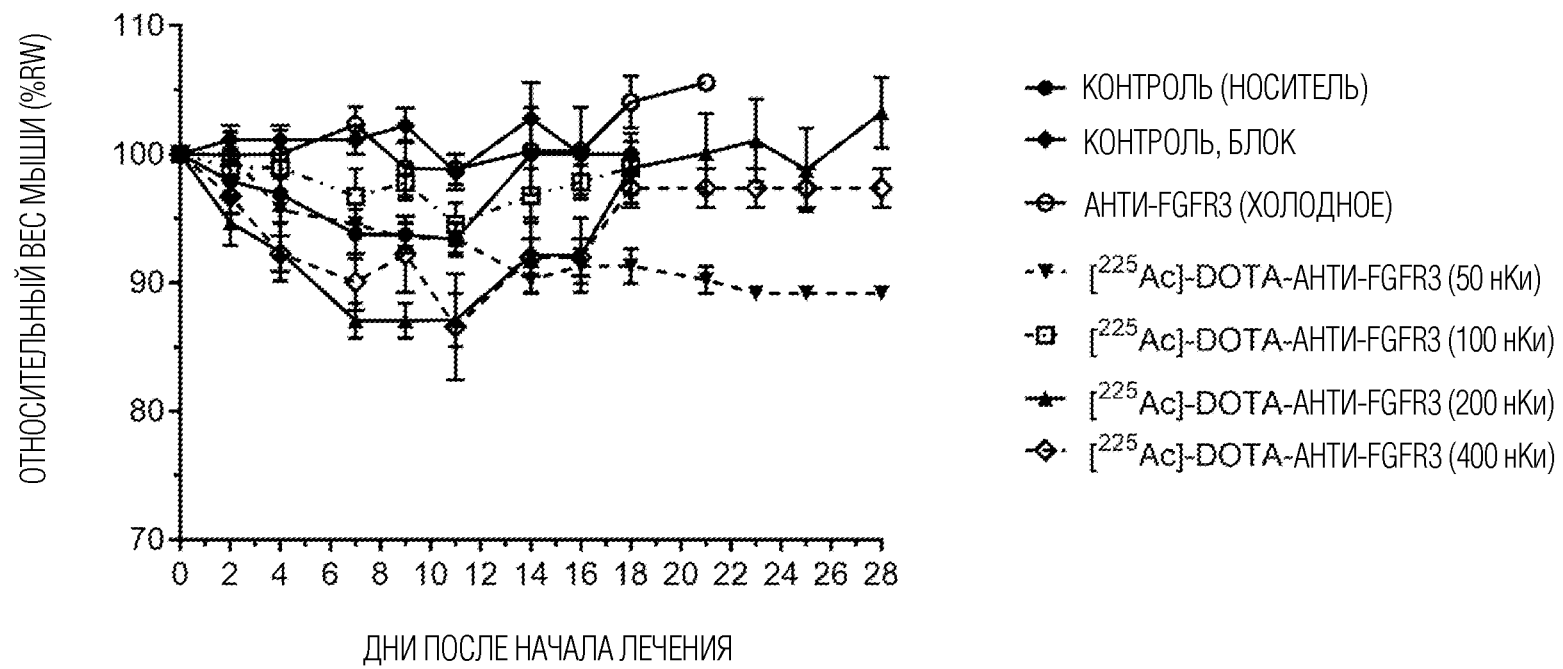


ФИГ. 7С

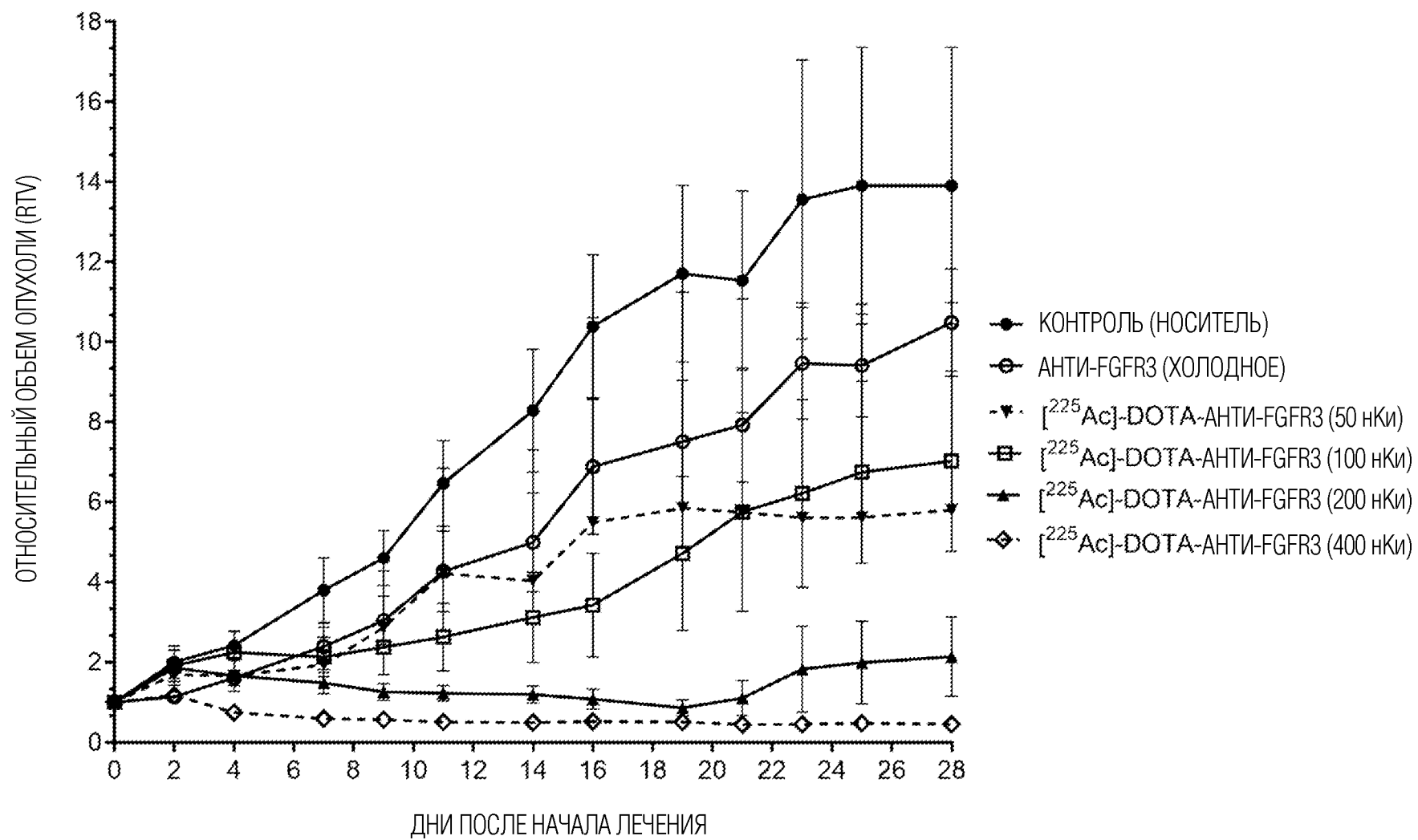




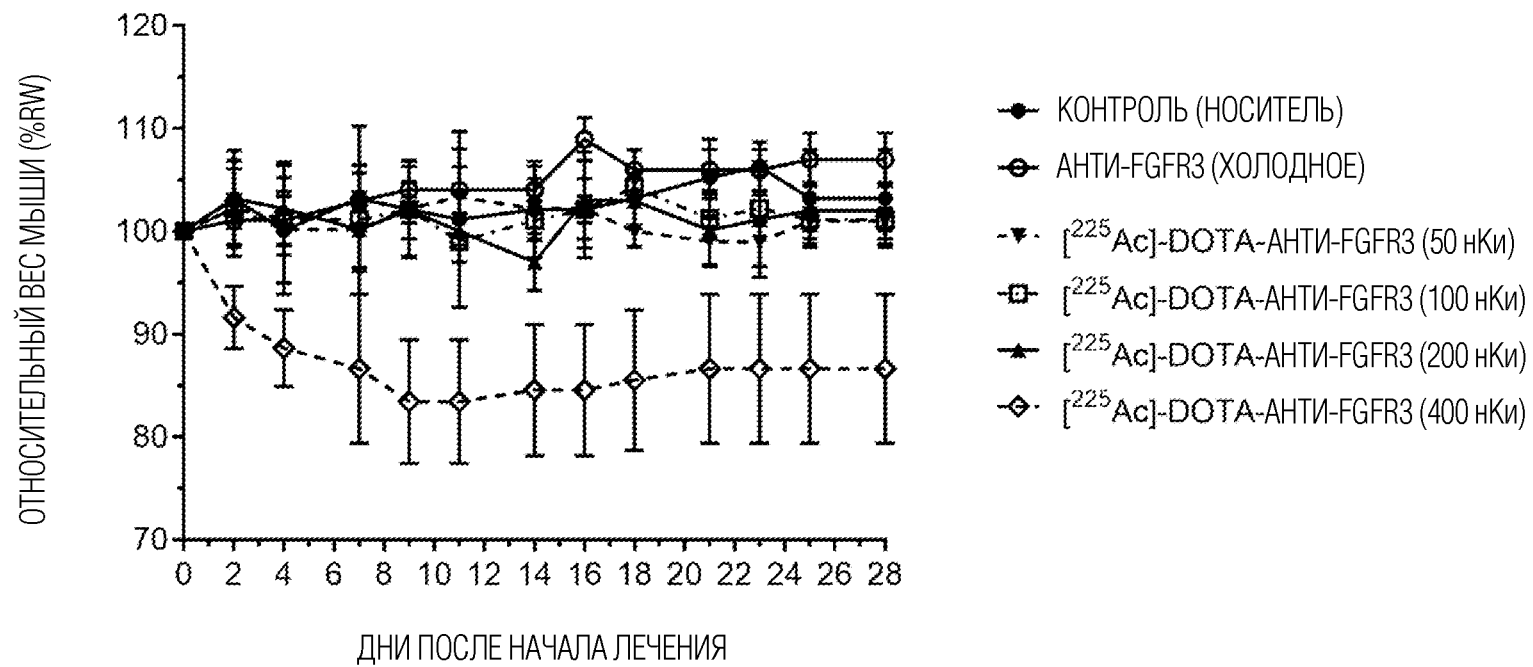
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



ФИГ. 10А



ФИГ. 10В