(19) C2 (11) 129220 (13) UA

(98) а/с 3, м. Київ, 03037
(85) 2021-12-09
(74) Петров Андрій Володимирович, (UA)
(45) [2025-02-12]
(43) [2022-01-19]
(24) 2025-02-13
(22) 2020-05-08
(12) Патент України (на 20 р.)
(21) a202107060
(46) 2025-02-12

(86) PCT/IB2020/054381 2020-05-08
(30) 62/846,044 2019-05-10 US
(54) МАКРОЦИКЛІЧНІ ХЕЛАТОРИ ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ MACROCYCLIC CHELATORS AND METHODS OF USE THEREOF
(56) WO 2018/183906 A1, 04.10.2018 2 NIKKI A. THIELE et al. An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy. ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION. 16.10.2017. Vol. 56. No. 46, P. 14712-14717 3 WO 2018/187631 A1, 11.10.2018 2 MAGUIRE WF et al. Efficient 1-step radiolabeling of monoclonal antibodies to high specific activity with 225Ac for α-particle radioimmunotherapy of cancer. J Nucl Med. 30.06.2014. Vol. 55. No. 9. P. 1492-1498. doi: 10.2967/jnumed.114.138347 3 ROCA-SABIO A et al. Macrocyclic receptor exhibiting unprecedented selectivity for light lanthanides. J Am Chem Soc. 11.03.2009. Vol. 131. No. 9. P. 3331-3341. doi: 10.1021/ja808534w 3
(71) ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК. US ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. US JANSSEN BIOTECH, INC. US
(72) Салтер Рис US Салтер Рис US Salter, Rhys US Дудкін Вадім US Дудкин Вадим US Dudkin, Vadim US Сун Финбін ь US Сун Фэнбинь US Song, Fengbin US Чжан Вей US Чжан Вэй US Zhang, Wei US Ґолдберґ Шалом US Голдберг Шалом US Goldberg, Shalom US Кейт Джон US Кейт Джон US Keith, John US
(73) ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК. US ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. US JANSSEN BIOTECH, INC. US

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Ця заявка заявляє про перевагу пріоритету попередньої патентної заявки США № 62/846,044, поданої 10 травня 2019 р., яку в повному обсязі та для всіх цілей включено в цей документ шляхом посилання.

ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, ПОДАНИх В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

У цій заявці представлено перелік послідовностей, який подається в електронному вигляді через систему EFS-Web як перелік послідовностей у форматі ASCII з назвою файлу "JBI6072WOPCT1_SeqListing.txt" розміром 26 Кб, дата створення 1 травня 2020 р. Перелік послідовностей, що подається через систему EFS-Web, є частиною опису, і його в повному обсязі включено в цей документ шляхом посилання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Застосування радіонуклідів, що випромінюють альфа-частинки, для терапії онкологічних захворювань пов'язане з великою перспективою, завдяки їхньому поєднанню високої енергії з дією на короткій відстані, що забезпечує можливість потужного знищення, здебільшого за місцем локалізації пухлинних клітин (Kim, Y.S. and M.W. Brechbiel, An overview of targeted alpha therapy. Tumour Biol, 2012. 33(3): p. 573-90). Націлювана доставка альфа-випромінювачів із використанням антитіла, каркасного білка, ліганду невеликої молекули, аптамеру або іншого зв'язуючого фрагмента, специфічного для ракового антигена, забезпечує спосіб селективної доставки радіонукліда до пухлин з метою підвищення їхньої активності та пом'якшення нецільових ефектів. У звичайній практиці зв'язувальний фрагмент приєднується до хелатора, який зв'язується з альфа-випромінювальним радіоактивним металом для отримання радіоактивного комплексу. У багатьох таких прикладах для отримання продукту, відомого як радіоімунокон'югат, у вигляді націлювального ліганду використовують моноклональне антитіло (mAb).

Актиній-225 (^{225}Ac) - це альфа-випромінювальний радіоізотоп, який представляє особливий інтерес для медичного застосування (Miederer et al., Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. Adv Drug Deliv Rev, 2008. 60(12):71-82). Тривалість 10-денного періоду напіврозпаду ^{225}Ac є досить довгою, щоб сприяти виробництву радіокон'югатів, але досить короткою, щоб відповідати циркуляційній фармакокінетиці носіїв доставки, таких як антитіла. Зважаючи на це, радіоімунокон'югати ^{225}Ac представляють особливий інтерес. Крім того, ^{225}Ac розпадається в серії стадій, що в кінцевому рахунку приводить до випромінення 4 альфа-частинок та утворення стабільного ізотопу, ^{209}Bi, що тим самим збільшує його активність. Іншим радіоізотопом, що представляє інтерес для медичного застосування, є Лютецій-177 (^{177}Lu), який випромінює як гамма-опромінення, придатне для візуалізації, так і бета-опромінення середньої енергії, придатне для променевої терапії. Було встановлено, що пептиди, мічені ^{177}Lu, демонструють зменшене пошкодження нормальної тканини, і що мічення ^{177}Lu дає можливість використовувати один радіоактивно мічений агент як для терапії, так і для візуалізації (Kwekkeboom DJ, et al. [^{177}Lu-DOTA^{0},Tyr^{3}]octreotate: comparison with [^{111}In-DTPA^{0}]octreotide in patients. Eur J Nucl Med. 2001;28: p. 1319–1325). Інші радіоізотопи, які використовують в терапевтичних застосуваннях, включають, наприклад, бета- або альфа-випромінювачі, такі як, наприклад, ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{149}Tb, ^{152}Tb, ^{155}Tb, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{255}Fm і ^{227}Th. Інші радіоізотопи, які використовуються для візуалізаційних застосувань, включають гамма-випромінюючі радіоізотопи, такі як, наприклад, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{89}Zr та ^{111}In.

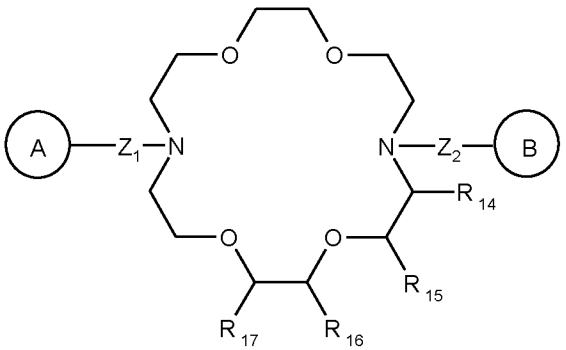
Нині найбільш широковживаним хелатором для Актинію-225 і лантанидів є DOTA (1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраоцтова кислота; тетраксатен), а попередні клінічні та доклінічні програми в основному використовували 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраоцтову кислоту (DOTA) для хелатування актинію. Однак відомо, що хелатування актинію за допомогою DOTA може бути складним (Deal, K.A., et al., Improved in vivo stability of actinium-225 macrocyclic complexes. J Med Chem, 1999. 42(15): p. 2988-92). Наприклад, DOTA дозволяє отримати коефіцієнт хелатування в кращому випадку >500:1 DOTA:Актиній-225 при приєднанні до лігандів націлювання, таких як білки або антитіла, і часто вимагає або суворих умов, або високих рівнів DOTA на антитіло. Інші макроциклічні хелатори для лантанідів і Актинію-225 були описані, наприклад, в публікації міжнародної патентної заявки WO 2018/183906; Thiele et al. "An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy" Angew. Chem. Int. Ed. (2017) 56, 14712-14717.; Roca-Sabio et al. "Macrocyclic Receptor Exhibiting Unprecedented Selectivity for Light Lanthanides" J. Am. Chem. Soc. (2009) 131, 3331-3341.

Сайт-специфічність стала ключовою сферою уваги при створенні кон'югату "антитіло-лікарський засіб" (ADC) (Agarwal, P. and C.R. Bertozzi, Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development, Bioconjug Chem, 2015. 26(2): p. 176–92), і було встановлено, що ефективність і безпечність ADC можуть бути підвищені за допомогою сайт-специфічних методів порівняно з випадковою кон'югацією. Вважається, що подібні переваги щодо безпечності й ефективності можуть бути досягнуті для радіоімунокон'югатів.

СТИСЛИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Відповідно, в цій галузі техніки існує потреба в нових хелаторах, які зв'язують радіометали, переважно альфа-випромінюючі радіометали, такі як Актиній-225 (^{225}Ac), і можуть бути використані для отримання стабільних радіоімунокон'югатів з високою питомою активністю і високим виходом. Винахід задовольняє цю потребу, забезпечуючи макроциклічний хелатор, здатний зв'язувати радіометали, такі як альфа-випромінюючі радіометали, зокрема ^{225}Ac, незалежно від питомої активності або більшості звичайних металевих домішок. Хелатори винаходу можна використовувати для отримання радіоімунокон'югатів, що мають високу стабільність in vitro та in vivo шляхом кон'югації з лігандом націлювання, таким як антитіло, білок, аптамер, мала молекула тощо, переважно сайт-специфічним способом, використовуючи "клік-хімію". Радіоімунокон'югати, отримані шляхом кон'югації хелатора винаходу з лігандом націлювання, можуть бути використані для цільової променевої терапії, наприклад, для цільової променевої терапії неопластичної клітини та/або цільового лікування неопластичного захворювання або розладу, включно з раком.

В одному загальному аспекті винахід відноситься до хелатору формули (I):



(I)

де:

кожне з кільця A і кільця B незалежно є 6-10-членним арилом або 5-10-членним гетероарилом, де кожне з кільця A і кільця B необов'язково заміщене одним або більше замісниками, незалежно вибраними з групи, що складається з галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, -CN, $-OC(O)N(R_{13})_2$ і X;

кожний з Z_1 і Z_2 незалежно являє собою $–(C(R_{12})_2)_m-$ або $–(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$;

кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний p незалежно дорівнює 0 або 1;

L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання;

кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом;

кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом;

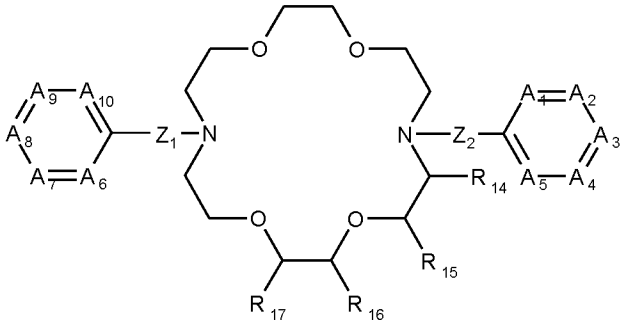
кожен із R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} незалежно являє собою водень, алкіл або X,

або альтернативно R_{14} і R_{15} та/або R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця, необов'язково заміщеного X;

за умови, що хелатор містить щонайменше один X, і коли X присутній на кільці A або кільці B, L_1 є лінкером або щонайменше один з R_{12} і R_{14}-R_{17} не є воднем.

В альтернативних варіантах здійснення передбачається, що кожне з кільця A і кільця B необов'язково заміщене гетероциклільним кільцем, таким як оксазолін.

В одному варіанті здійснення хелатор винаходу являє собою хелатор формули (II):



(II)

де:

A_1 являє собою N або CR_1 або відсутній;

A_2 являє собою N або CR_2;

A_3 являє собою N або CR_3;

A_4 являє собою N або CR_4;

A_5 являє собою N або CR_5;

A_6 являє собою N або CR_6 або відсутній;

A_7 являє собою N або CR_7;

A_8 являє собою N або CR_8;

A_9 являє собою N або CR_9;

A_{10} являє собою N або CR_{10};

за умови, що не більше трьох з A_1, A_2, A_3, A_4 та A_5 являють собою N, і не більше трьох з A_6, A_7, A_8, A_9 та A_{10} являють собою N;

кожен з R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} незалежно вибирають із групи, що складається з водню, галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, -CN, $-OC(O)N(R_{13})_2$ і -X,

або альтернативно будь-які два безпосередньо суміжні R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} взяті разом з атомами, до яких вони приєднані, для утворення п'яти або шестичленного заміщеного або незаміщеного карбоциклічного або азотвмісного кільця;

кожний з Z_1 і Z_2 незалежно являє собою $–(C(R_{12})_2)_m-$ або $–(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$;

кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний p незалежно дорівнює 0 або 1;

L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання;

кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом;

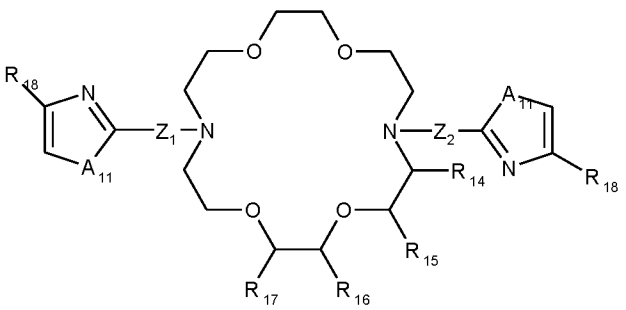
кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом;

кожен із R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} незалежно являє собою водень, алкіл або X,

або альтернативно R_{14} і R_{15} та/або R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця, необов'язково заміщеного X;

за умови, що хелатор містить щонайменшез один X, і коли будь-який з R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою X, тоді L_1 є лінкером.

В одному варіанті здійснення хелатор винаходу являє собою хелатор формули (III):



(III)

де:

кожний A_{11} незалежно являє собою O, S, NMe або NH;

кожний з Z_1 і Z_2 незалежно являє собою $–(C(R_{12})_2)_m-$ або $–(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$;

кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5;

кожен m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний p незалежно дорівнює 0 або 1;

L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання;

кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом;

кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом;

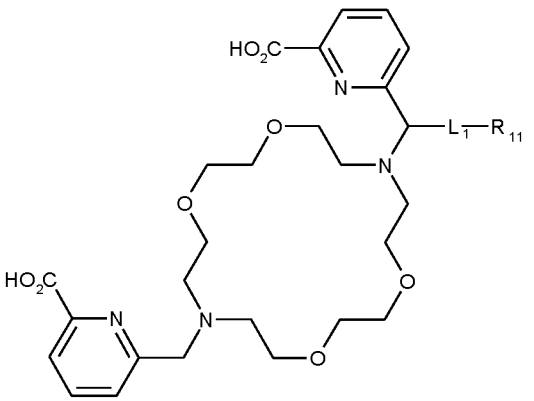
кожен із R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} незалежно являє собою водень, алкіл або X,

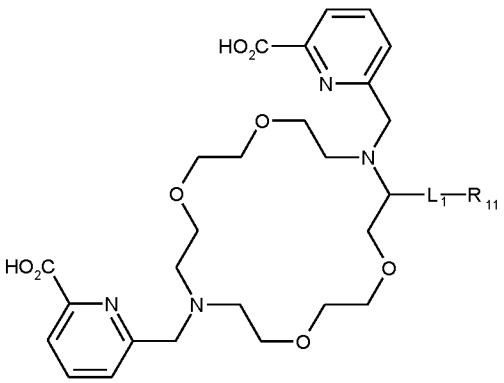
або альтернативно R_{14} і R_{15} та/або R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця, необов'язково заміщеного X;

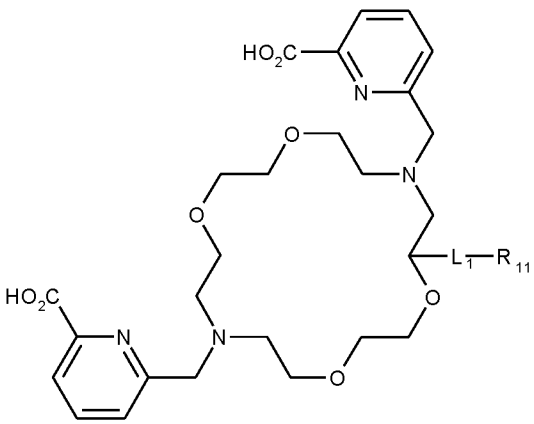
кожен R_{18} незалежно вибирають із групи, що складається з водню, галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, -CN, $-OC(O)N(R_{13})_2$ і -X,

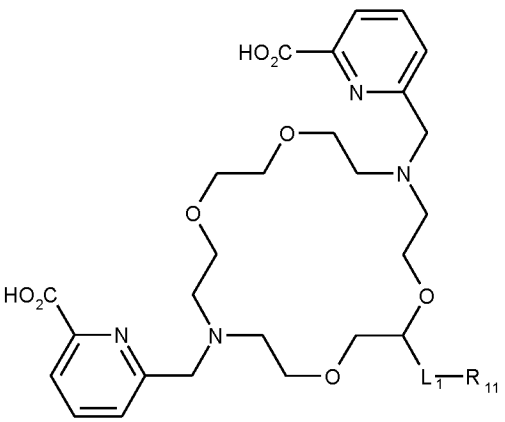
за умови, що хелатор містить щонайменше один X, і коли R_{18} являє собою X, тоді L_1 є лінкером або щонайменше один з R_{12} і R_{14}-R_{17} не є воднем.

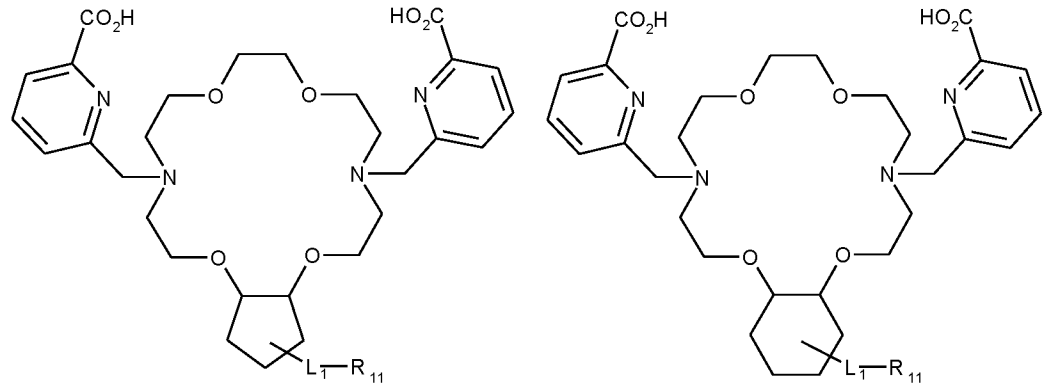
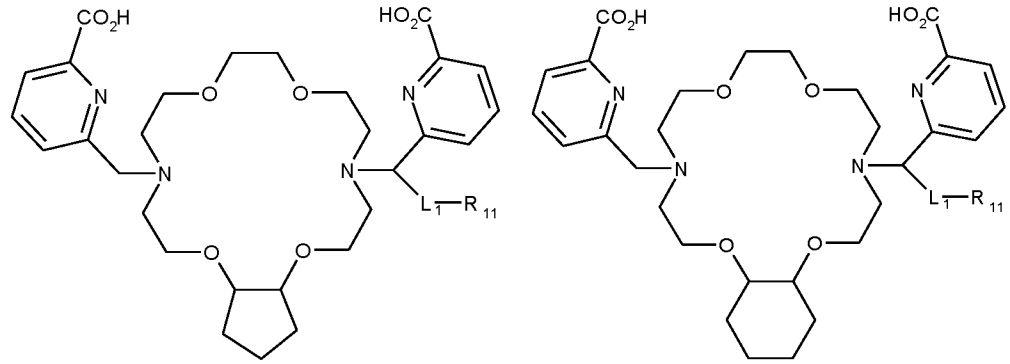
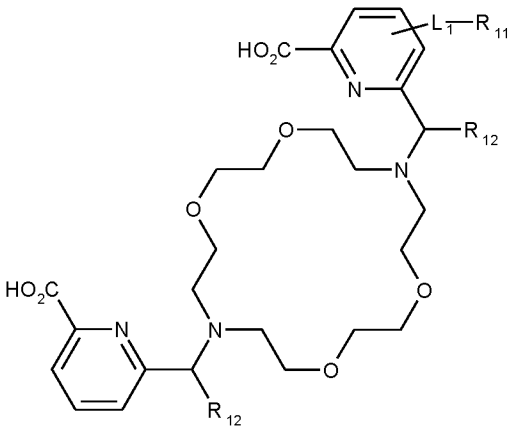
В конкретному варіанті здійснення хелатор являє собою:









де:

L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання; і

кожен R_{12} незалежно являє собою водень, $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$, за умови, що щонайменше один R_{12} являє собою $-CH_3$ або CH_2CH_3.

У деяких варіантах здійснення R_{11} є $–NH_2$, -NCS, -NCO, $-N_3$, алкінілом, циклоалкінілом, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеімідо, ацилгалогенідом, тетразином або транс-циклооктеном.

У певних варіантах здійснення R_{11} являє собою циклооктиніл або похідні циклооктинілу, вибране з групи, що складається з біциклононінілу (BCN), дифторованого циклооктинілу (DIFO), дибензоциклооктинілу (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктинонілу (BARAC), дибензоазациклооктинілу (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктинілу (DIMAC), дифторбензоциклооктинілу (DIFBO), монобензоциклооктинілу (MOBO) і тетраметоксидібензоциклооктинілу (TMDIBO).

У додаткових варіантах здійснення R_{11} являє собою DBCO або BCN.

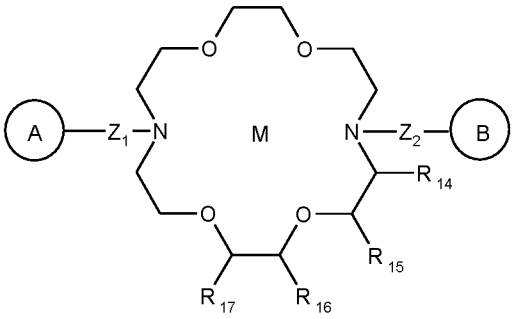
У деяких варіантах здійснення R_{11} містить ліганд націлювання, причому ліганд націлювання містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, каркасний білок, малу молекулу або аптамер.

У конкретних варіантах здійснення ліганд націлювання є антитілом або антигензв'язувальним

фрагментом.

В іншому аспекті винахід належить до комплексу радіометалу, що містить хелатор винаходу, що містить іон радіометалу, зв'язаний з хелатором за допомогою координатного зв'язку.

В одному варіанті здійснення радіометалевий комплекс винаходу має структуру формули (I-m):



(I-m)

де:

M являє собою іон радіометалу, бажано альфа-випромінюючий іон радіометалу;

кожне з кільця A і кільця B незалежно є 6-10-членним арилом або 5-10-членним гетероарилом, де кожне з кільця A і кільця B необов'язково заміщене одним або більше замісниками, незалежно вибраними з групи, що складається з галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, -CN, $-OC(O)N(R_{13})_2$ і X;

кожний з Z_1 і Z_2 незалежно являє собою $–(C(R_{12})_2)_m-$ або $–(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$;

кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний p незалежно дорівнює 0 або 1;

L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання;

кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом;

кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом;

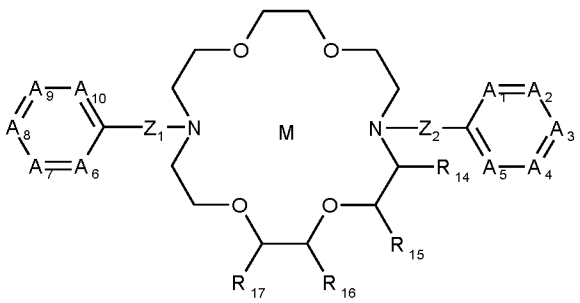
кожен із R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} незалежно являє собою водень, алкіл або X,

або альтернативно R_{14} і R_{15} та/або R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця, необов'язково заміщеного X;

за умови, що радіометалевий комплекс містить щонайменше однин X, і коли X присутній на кільці A або кільці B, L_1 є лінкером або щонайменше один з R_{12} і R_{14}-R_{17} не є воднем.

В альтернативних варіантах здійснення передбачається, що кожне з кільця A і кільця B необов'язково заміщене гетероциклільним кільцем, таким як оксазолін.

В одному варіанті здійснення радіометалевий комплекс винаходу являє собою радіометалевий комплекс формули (II-m):



(II-m)

де:

M являє собою іон радіометалу, бажано альфа-випромінюючий іон радіометалу;

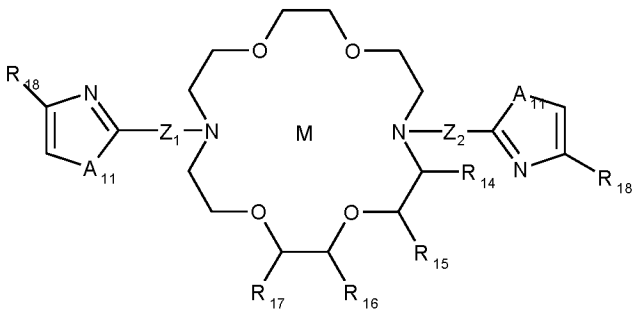
A_1 являє собою N або CR_1 або відсутній;

A_2 являє собою N або CR_2;

A_3 являє собою N або CR_3;

A_4 являє собою N або CR_4;

A_5 являє собою N або CR_5;
A_6 являє собою N або CR_6 або відсутній;
A_7 являє собою N або CR_7;
A_8 являє собою N або CR_8;
A_9 являє собою N або CR_9;
A_{10} являє собою N або CR_{10};
за умови, що не більше трьох з A_1, A_2, A_3, A_4 та A_5 являють собою N, і не більше трьох з A_6, A_7, A_8, A_9 та A_{10} являють собою N;
кожен з R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} незалежно вибирають із групи, що складається з водню, галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, -CN, $-OC(O)N(R_{13})_2$ і -X,
або альтернативно будь-які два безпосередньо суміжні R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} взяті разом з атомами, до яких вони приєднані, для утворення п'яти або шестичленного заміщеного або незаміщеного карбоциклічного або азотвмісного кільця;
кожний з Z_1 і Z_2 незалежно являє собою $-(C(R_{12})_2)_m-$ або $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;
кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$;
кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5;
кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5;
кожний p незалежно дорівнює 0 або 1;
L_1 відсутній або являє собою лінкер;
R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання;
кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом;
кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом;
кожен із R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} незалежно являє собою водень, алкіл або X,
або альтернативно R_{14} і R_{15} та/або R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця, необов'язково заміщеного X;
за умови, що радіометалевий комплекс містить щонайменше один X, і коли будь-який з R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою X, тоді L_1 є лінкером або щонайменше один або R_{12} і R_{14}-R_{17} не є воднем.
В одному варіанті здійснення радіометалевий комплекс винаходу являє собою радіометалевий комплекс формули (III-m):



(III-m)

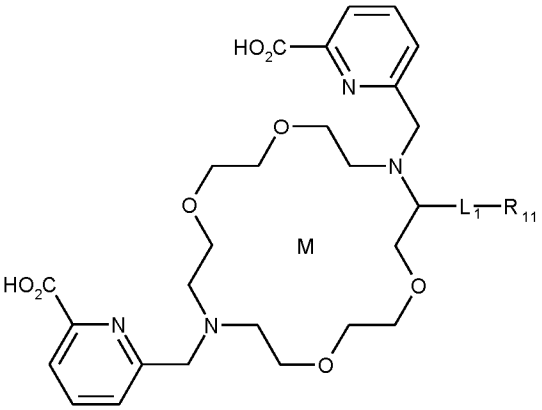
де:
M являє собою іон радіометалу, бажано альфа-випромінюючий іон радіометалу;
кожний A_{11} незалежно являє собою O, S, NMe або NH;
кожний з Z_1 і Z_2 незалежно являє собою $-(C(R_{12})_2)_m-$ або $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;
кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$;
кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5;
кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5;
кожний p незалежно дорівнює 0 або 1;
L_1 відсутній або являє собою лінкер;
R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання;
кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом;
кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом;
кожен із R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} незалежно являє собою водень, алкіл або X,
або альтернативно R_{14} і R_{15} та/або R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця, необов'язково заміщеного X; і
кожен R_{18} незалежно вибирають із групи, що складається з водню, галогену, алкілу, алкенілу,

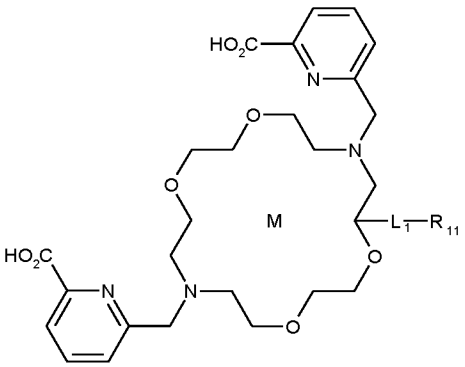
циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, -OR_{13}, -SR_{13}, -$(CH_2)_pCOOR_{13}$, -$OC(O)R_{13}$, -$N(R_{13})_2$, -$CON(R_{13})_2$, -NO_2, -CN, -$OC(O)N(R_{13})_2$ і -X,

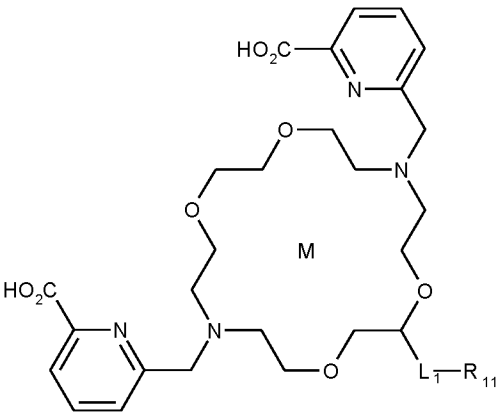
за умови, що радіометалевий комплекс містить щонайменше один X, і коли R_{18} являє собою X, тоді L_1 є лінкером або щонайменше один з R_{12} і R_{14}-R_{17} не є воднем.

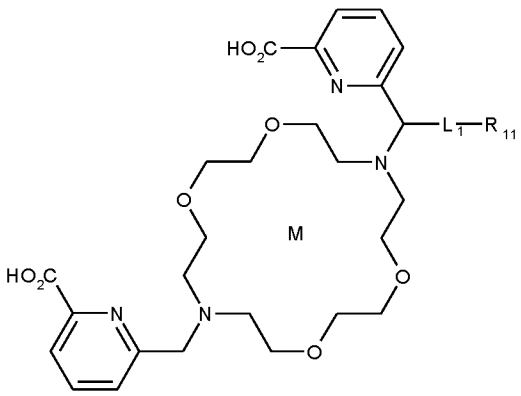
У деяких варіантах здійснення альфа-випромінюючий іон радіометалу є Актинієм-225 (^{225}Ac).

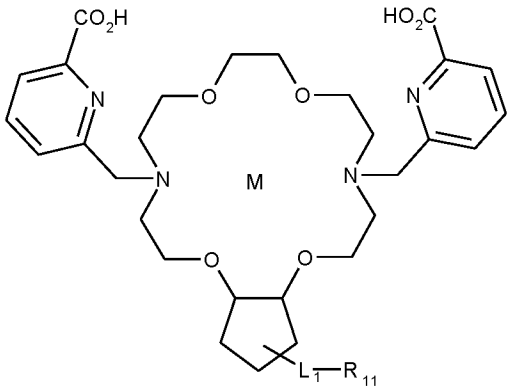
В конкретних варіантах здійснення радіометалевий комплекс винаходу вибирають з групи, що складається з:

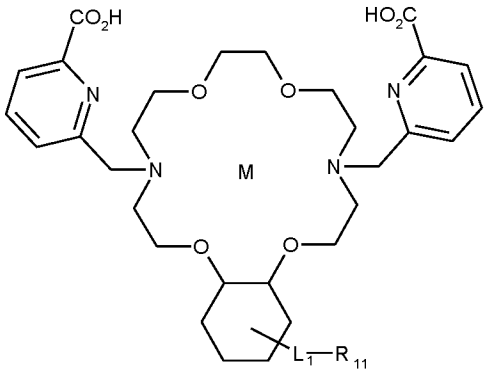


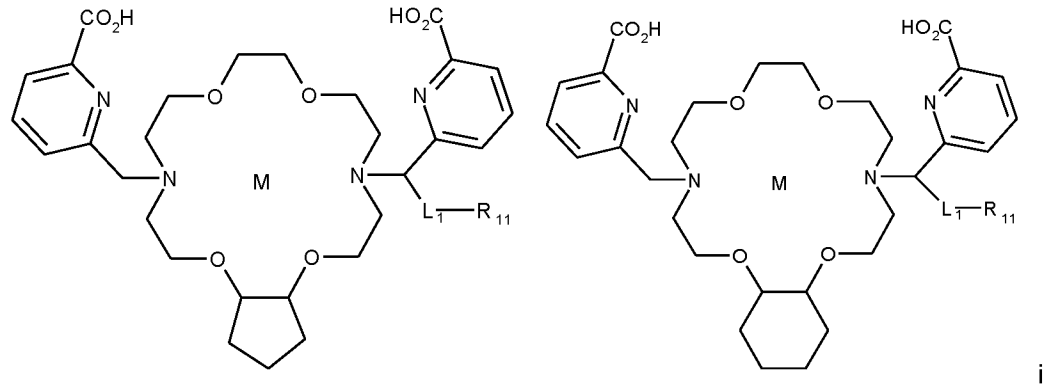




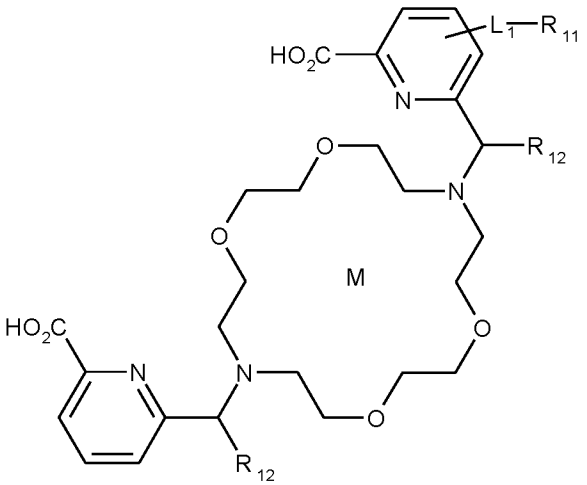








і



де:

M являє собою іон радіометалу, бажано альфа-випромінюючий іон радіометалу, більш бажано Актиній-225 (^{225}Ac), L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання; і

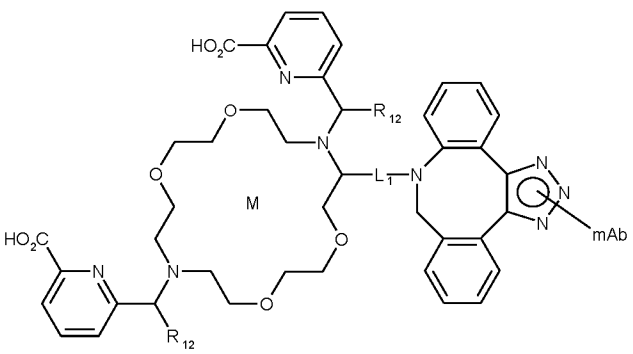
кожен R_{12} незалежно являє собою водень, $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$, за умови, що щонайменше один R_{12} являє собою $-CH_3$ або CH_2CH_3.

В іншому загальному аспекті винахід належить до імунокон'югату, що містить хелатор винаходу, ковалентно зв'язаний через R_{11} з лігандом націлювання, переважно антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

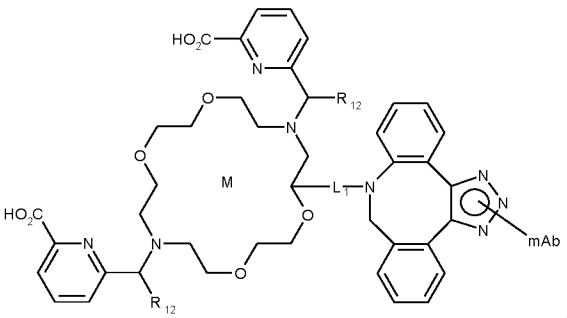
У ще одному загальному аспекті винахід належить до радіоімунокон'югату, що містить радіометалевий комплекс винаходу ковалентно зв'язаний через R_{11} з лігандом націлювання, переважно антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

В одному варіанті здійснення радіоімунокон'югат містить радіометалевий комплекс винаходу, ковалентно зв'язаний з лігандом націлювання, зокрема з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, через триазоловий фрагмент.

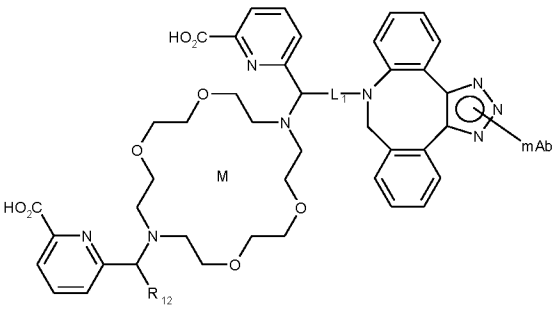
В конкретному варіанті здійснення радіоімунокон'югат винаходу вибирають із групи, що складається з:



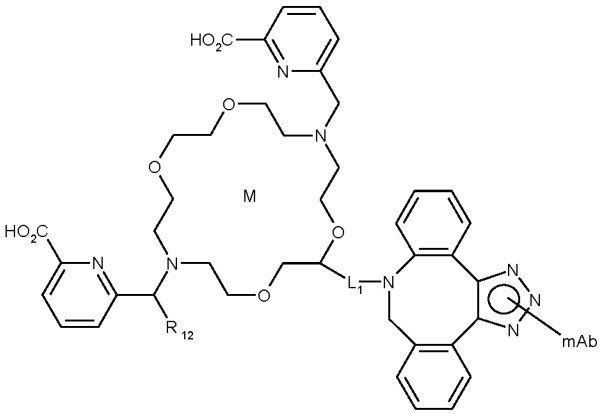
,



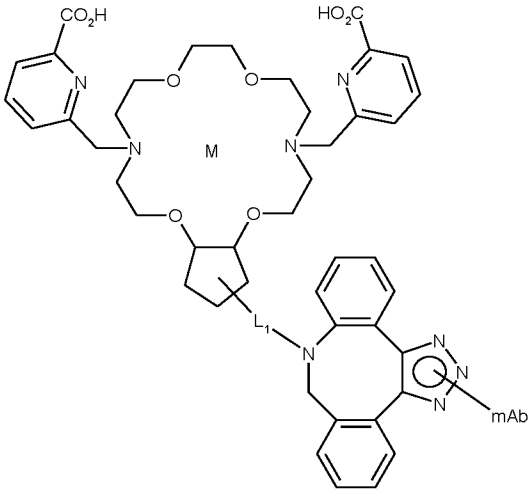
,


HO2C
N
O
N
L1
N
N
N
mAb
M
HO2C
N
O
N
R12

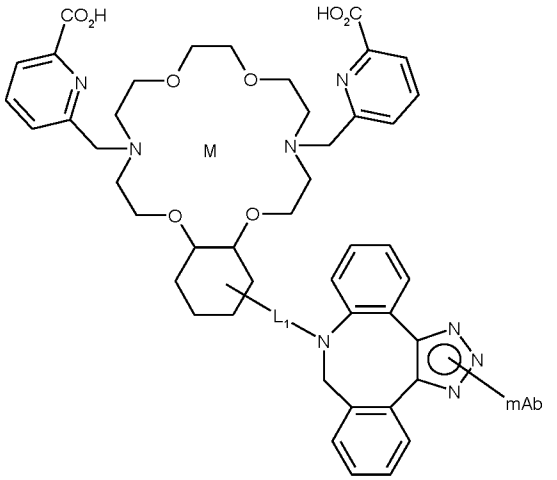
,


HO2C
N
O
N
M
HO2C
N
N
O
O
L1
N
N
N
mAb
R12

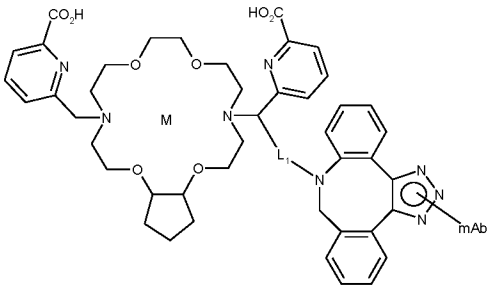
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
mAb

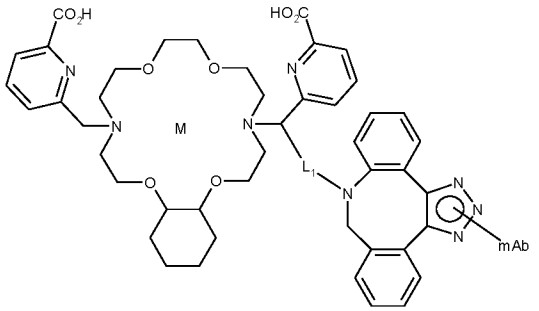
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
mAb

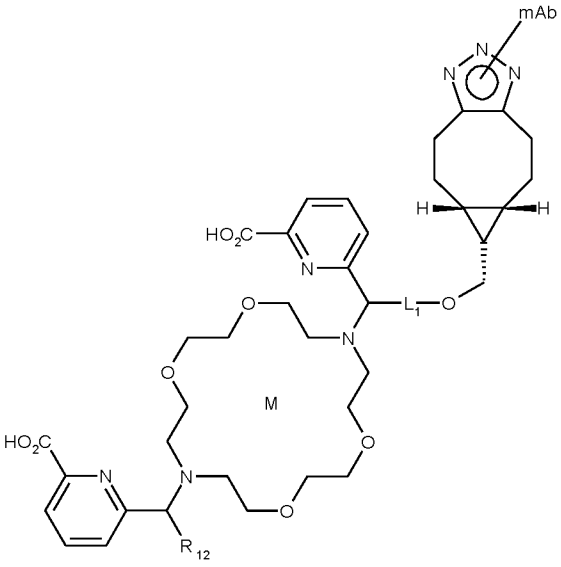
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
mAb

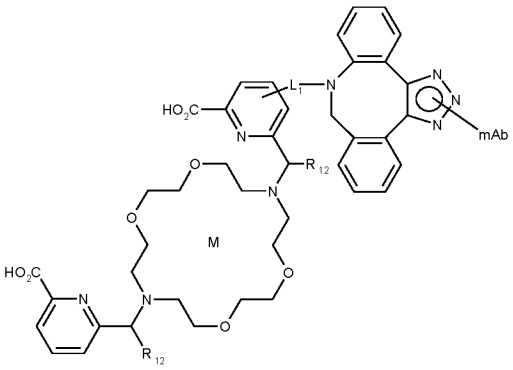
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
mAb

,



та



,

де L_1 являє собою лінкер; mAb - це антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, переважно mAb - це антитіло або антигензв'язувальний фрагмент, який специфічно зв'язується з пухлинною клітиною, більш переважно з пухлинним антигеном, вибраним із групи, що складається з простатоспецифічного мембранного антигену (PSMA), BCMA, Her2, EGFR, KLK2, CD19, CD22, CD30, CD33, CD79b і Нектин-4; і кожен R_{12} є незалежно воднем, $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$, за умови, що щонайменше один R_{12} є $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$.

В іншому загальному аспекті винахід належить до способів отримання імунокон'югату або радіоімунокон'югату за винаходом, що включає ковалентне зв'язування хелатора або радіометалевого комплексу винаходу з лігандом націлювання переважно через R_{11} хелатора або комплексу радіометалу з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

У конкретному варіанті здійснення спосіб отримання радіоімунокон'югату за винаходом включає метод "одноетапного прямого радіоактивного мічення" (наприклад, як показано на ФІГ. 2C), який включає:

(i) забезпечення модифікованого поліпептиду, що містить поліпептид (наприклад, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент), ковалентно зв'язаний з першим партнером клік-реакції (наприклад, азидогрупою);

(ii) забезпечення хелаторного комплексу, що містить хелатор за цим винаходом, ковалентно зв'язаний з другим партнером клік-реакції (наприклад, алкінільною групою або циклоалкінільною групою);

(iii) контактування модифікованого поліпептиду з хелаторним комплексом в умовах, які дозволяють першому партнеру клік-реакції (наприклад, азидогрупі) реагувати з другим партнером клік-реакції (наприклад, алкінільною групою або циклоалкінільною групою) з утворенням таким чином комплексу поліпептид-хелатор (тобто імунокон'югату); і

(iv) контактування комплексу поліпептид-хелатор з іоном радіометалу для отримання таким чином радіоімунокон'югату (де радіоімунокон'югат містить поліпептид, мічений іоном радіометалу, наприклад модифіковане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, мічений альфа-випромінюючим іоном радіометалу, зв'язаним з іоном радіометалу через координатне зв'язування).

Відповідно до конкретних варіантів здійснення стадію (iv) виконують без умов відсутності металу. Переважно спосіб реалізовують специфічним для сайту способом, як описано в цьому документі.

В альтернативному варіанті реалізації спосіб отримання радіоімунокон'югату за винаходом включає метод "клік-радіомічення" (наприклад, як показано на ФІГ. 2D):

(i) забезпечення модифікованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, ковалентно зв'язаний з азидогрупою;

(ii) забезпечення радіокомплексу за винаходом, що містить альфа-випромінюючий іон радіометалу, зв'язаний з хелатором за допомогою координатного зв'язку, де хелатор ковалентно зв'язаний з алкінільною групою або циклоалкінільною групою; і

(iii) контактування модифікованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента з радіокомплексом в умовах, які дозволяють азидогрупі реагувати з алкінільною групою або циклоалкінільною групою для отримання радіоімунокон'югату.

У деяких варіантах здійснення циклоалкінільна група являє собою циклооктиніл або похідні циклооктинілу, вибране з групи, що складається з біциклононінілу (BCN), дифторованого циклооктинілу (DIFO), дибензоциклооктинілу (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктинонілу (BARAC),

дибензоазациклооктинілу (DIBAC), диметоксиазациклооктинілу (DIMAC), дифторбензоциклооктинілу (DIFBO), монобензоциклооктинілу (MOBO) і тетраметоксидибензоциклооктинілу (TMDIBO).

У ще одному загальному аспекті винахід належить до фармацевтичної композиції, що містить радіоімунокон'югат винаходу і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтична композиція може містити одну або кілька фармацевтично прийнятних допоміжних речовин.

Ще в одному загальному аспекті винахід належить до способів використання радіоімунокон'югатів і фармацевтичних композицій винаходу для цільової променевої терапії.

В одному варіанті здійснення пропонується спосіб селективного націлення на неопластичні клітини для променевої терапії у суб'єкта, який цього потребує, причому спосіб включає введення суб'єкту фармацевтичної композиції за винаходом.

В одному варіанті здійснення пропонується спосіб лікування неопластичного захворювання або розладу у суб'єкта, який цього потребує, причому спосіб включає введення суб'єкту фармацевтичної композиції за винаходом.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ФІГУР

Попередній короткий виклад суті винаходу, а також подальший детальний опис винаходу будуть краще зрозумілі в разі прочитання спільно з графічними зображеннями, що додаються. Слід розуміти, що винахід не обмежується точними варіантами здійснення, показаними на графічних зображеннях.

Нижче наведено опис графічних зображень:

На Фіг. 1A-1B представлені хроматограми BEPX з тесту хелатування з La^{3+}, описаного в прикладі 1; На Фіг. 1A представлені хроматограми BEPX H2bp18c6-бензилфенілу до змішування (зверху) і після змішування з La^{3+}; зсув часу утримування з 14,137 хвилини до 12,047 хвилини після змішування з La^{3+} вказує на швидке хелатування La^{3+}H2bp18c6-бензилфенілом; На Фіг. 1B представлені хроматограми BEPX H2bp18c6-бензил-ізопентилу до змішування (зверху) і після змішування з La^{3+}; зсув часу утримування з 17,181 хвилини до 15,751 хвилини після змішування з La^{3+} вказує на швидке хелатування La^{3+}H2bp18c6-бензил-ізопентилом; і

на Фіг. 2 представлене схематичне зображення радіоактивного мічення антитіла для отримання радіоімунокон'югату відповідно до варіантів здійснення винаходу за допомогою методів випадкової кон'югації (наприклад, способів мічення залишків лізину, залишків цистеїну тощо) або сайт-специфічних методів кон'югації (наприклад, глікан-специфічні методи, методи кон'югаційної мітки або методи сконструйованого цистеїну); Фіг. 2A схематично ілюструє випадкову кон'югацію за допомогою одноетапного прямого радіомічення; Фіг. 2B схематично ілюструє випадкову кон'югацію за допомогою клік-радіомічення; Фіг. 2C схематично ілюструє сайт-специфічну кон'югацію за допомогою одноетапного прямого радіомічення; і

Фіг. 2D схематично ілюструє специфічну для сайту кон'югацію за допомогою клік-радіомічення.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У розділі "Рівень техніки" і в усьому описі наводяться або описані різні публікації, статті та патенти; кожне з цих посилань включено в повному обсязі в цей документ шляхом посилання. Обговорення документів, актів, матеріалів, пристроїв, виробів тощо, включених у цей опис, призначене для забезпечення контексту винаходу. Таке обговорення не є визнанням того, що будь-які або всі ці питання є частиною попереднього рівня щодо будь-яких винаходів, розкритих або заявлених.

Якщо не вказано інше, усі технічні й наукові терміни, використані в цьому документі, мають те саме значення, яке зазвичай розуміє звичайний фахівець у галузі, до якої належить цей винахід. В іншому випадку певні терміни, які цитовані в цьому документі, мають значення, наведені в описі. Усі патенти, опубліковані патентні заявки й публікації, цитовані в цьому документі, включені до нього шляхом посилання, як ніби вони були викладені тут повністю.

Слід відзначити, що у цьому винаході й у формулі винаходу форми однини включають форми множини, крім випадків, коли контекст чітко вимагає іншого тлумачення.

У цьому описі та формулі винаходу, якщо контекст не вимагає іншого, під терміном "містить" і варіантами, такими як "який містить" і "включає", слід розуміти, що вони означають включення вказаного елемента або стадії, або групи елементів або стадій, але не виключають будь-який інший елемент або стадію, або групу елементів або стадій. Термін "який містить", що використовується в цьому документі, може замінятися терміном "складається з" або "включає", або іноді, у разі використання в цьому документі, терміном "має".

Термін "який складається з", що використовується в цьому документі, охоплює будь-який елемент, стадію або інгредієнт, не зазначені в пункті формули винаходу. Термін "по суті складається з", що використовується в цьому документі, не виключає матеріалів або стадій, які не впливають істотно на основні та нові характеристики пункту формули винаходу. Будь-який із зазначених вище термінів "який містить", "складається з", "включає" та "має", коли він використовується в цьому документі в контексті аспекту або варіанту здійснення винаходу, може замінятися терміном "складається з" або "по суті складається з" для різних обсягів винаходу.

Під сполучником "і/або", що використовується в цьому документі між декількома перерахованими елементами, розуміється охоплення як окремих, так і комбінованих варіантів. Наприклад, коли два

елемента з'єднані сполучником "і/або", перший варіант стосується застосовності першого елемента без другого. Другий варіант стосується застосовності другого елемента без першого. Третій варіант стосується застосовності першого та другого елементів разом. Будь-який із цих варіантів вважається таким, що підпадає під визначення, і тому відповідає вимозі терміну "і/або", що використовується в цьому документі. Одночасне застосування більше ніж одного з варіантів також вважається таким, що підпадає під це значення, і тому відповідає вимозі терміну "і/або".

З метою полегшити розуміння документа читачем заявки, опис було розділено на різні параграфи чи розділи, або на різні варіанти здійснення цієї заявки. Ці розділення не слід розглядати як від'єднання сутності параграфу або розділу, або варіантів здійснення від сутності за іншим параграфом або розділом, або варіантами здійснення. Навпаки, фахівець у даній галузі зрозуміє, що опис має широке застосування й охоплює всі комбінації різних розділів, параграфів і пропозицій, які можна розглядати. Обговорення будь-якого варіанту здійснення призначене бути лише зразком і не покликане припускати, що обсяг винаходу, включаючи формулу винаходу, обмежений цими прикладами.

Якщо не зазначено інше, будь-яке числове значення, наприклад концентрація або діапазон концентрацій, описане в цьому документі, слід розуміти як модифіковане в усіх випадках терміном "приблизно". Таким чином, числове значення зазвичай включає ± 10 % представленого значення. Наприклад, опис "10-кратне" включає 9-кратне і 11-кратне. У контексті цього документа використання числового діапазону безпосередньо включає всі можливі піддіапазони, усі індивідуальні числові значення в межах цього діапазону, включно з цілими числами в таких діапазонах і частками значень, якщо контекст чітко не вказує інше.

У контексті цього документа "суб'єкт" означає будь-яку тварину, переважно ссавця, найбільш переважно людину, якій буде введено або вже введено радіоімунокон'югат за винаходом. У контексті цього документа термін "ссавець" охоплює всіх ссавців. Приклади ссавців включають, серед іншого, корів, коней, овець, свиней, кішок, собак, мишей, щурів, кролів, морських свинок, приматів, що не є людиною (NHP), таких як мавпи або людиноподібні мавпи, і людей тощо, більш переважно людину.

Використовуваний тут термін "алкіл" означає насичений, одновалентний, нерозгалужений або розгалужений вуглеводневий ланцюг. Приклади алкільних груп включають, але не обмежуються ними, метил (Me), етил (Et), пропіл (наприклад, н-пропіл, ізопропіл), бутил (наприклад, н-бутил, ізобутил, трет-бутил) і пентил (наприклад, н-пентил, ізопентил, неопентил) тощо.

Термін "циклоалкіл" стосується моно- або поліциклічної алкільної групи, що має від 3 до 12, більш переважно від 3 до 8 атомів вуглецю в кільці (-ях). Приклади моноциклічних циклоалкільних кілець включають, але не обмежуються ними, циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогексил, циклогептил, циклооктил тощо.

У контексті цього документа термін "алкокси" стосується групи -O-алкіл або групи -OR, в якій є R-алкіл, де алкіл є таким, як визначено вище. Алкоксигрупа приєднана до вихідної молекули через атом кисню. Приклади алкокси включають, але не обмежуються ними, метокси, етокси, пропокси (наприклад, н-пропокси, ізопропокси), бутокси (наприклад, н-бутокси, ізобутокси, трет-бутокси), пентилокси (наприклад, н-пентилокси, ізопентилокси, неопентилокси) тощо. Алкоксигрупа може бути незаміщеною або заміщеною одним або більше відповідними замісниками. Аналогічно терміни "алкілтіо" або "тіоалкокси" стосуються групи -SR, в якій R являє собою алкіл, приєднаний до вихідної молекули через сірчаний місток, наприклад, -S-метил, -S-етил тощо. Типові приклади алкілтіо включають, але не обмежуються ними, $-SCH_3$, $-SCH_2CH_3$ тощо.

У контексті цього документа термін "галоген" означає фтор, хлор, бром або йод. Відповідно, термін "гало" означає фтор, хлор, бром або йод.

Терміни "гідрокси" і "гідроксил" можуть бути взаємозамінні і стосуються –OH.

Термін "карбокси" стосується –COOH.

Термін "ціано" стосується –CN.

Термін "нітро" стосується $-NO_2$.

Термін "ізотіоціанат" стосується -N=C=S.

Термін "ізоціанат" стосується -N=C=O.

Термін "азидо" стосується $-N_3$.

Термін "алкеніл" стосується прямого або розгалуженого вуглеводневого ланцюга, що має щонайменше два атоми вуглецю, наприклад, від 2 до 10 атомів вуглецю, і містить щонайменше один подвійний зв'язок між двома атомами вуглецю. Алкеніл може мати один вуглець-вуглецевий подвійний зв'язок або кілька вуглець-вуглецевих подвійних зв'язків, наприклад, 2, 3, 4 або більше вуглецевих подвійних зв'язків. Приклади алкенільних груп включають, але не обмежуються ними, метеніл, етеніл, пропеніл, бутеніл тощо.

Термін "циклоалкеніл" стосується моно- або поліциклічної алкільної групи, що має від 3 до 12, більш переважно від 3 до 8, атомів вуглецю в кільці (-ях) і містить щонайменше один подвійний зв'язок між двома атомами вуглецю. Циклоалкеніл може мати один вуглець-вуглецевий подвійний зв'язок або кілька вуглець-вуглецевих подвійних зв'язків, наприклад, 2, 3, 4 або більше вуглецевих подвійних

зв'язків. Приклади циклоалкенільних груп включають, але не обмежуються ними, циклопропеніл, циклобутеніл, циклогептеніл, циклогексеніл тощо.

Використовувані тут терміни "алкініл", "алкінова група" або "алкіновий фрагмент" стосується прямого або розгалуженого вуглеводневого ланцюга, що має щонайменше два атоми вуглецю, наприклад, від 2 до 10 атомів вуглецю, і містить щонайменше один потрійний зв'язок між двома атомами вуглецю. Алкінільна група може бути кінцевою алкінільною групою або циклічною алкінільною групою. Кінцевий алкін має щонайменше один атом водню, з'єднаний з атомом вуглецю з потрійним зв'язком. "Циклічний алкін" або "циклоалкініл" - це циклоалкільне кільце, яке містить щонайменше один потрійний зв'язок між двома атомами вуглецю. Приклади циклічних алкінів або циклоалкінільних груп включають, але не обмежуються ними, циклооктин і похідні циклооктину, такі як біциклононін (BCN), дифторований циклооктин (DIFO), дибензоциклооктин (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктинон (BARAC), дибензоазациклооктин (DIBAC), диметоксиазациклооктин (DIMAC), дифторбензоциклооктин (DIFBO), монобензоциклооктин (MOBO) і тетраметокси DIBO (TMDIBO).

Термін "аміно" стосується $–NH_2$. Термін "алкіламіно" стосується аміногрупи, в якій один або обидва атоми водню, приєднані до азоту, заміщені алкільною групою. Алкіламінова група може бути представлена як $-NR_2$, в якій кожен R незалежно є воднем або алкільною групою. Наприклад, до складу алкіламіну входять метиламін ($-NHCH_3$), диметиламін ($-N(CH_3)_2$), $-NHCH-_2CH_3$тощо. Термін "аміноалкіл" у контексті цього документа передбачає як розгалужені, так і прямі насичені аліфатичні вуглеводневі групи, заміщені однією або більше аміногрупами. Типові приклади аміноалкільних груп включають, але не обмежуються ними, $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$ і $–CH_2CH(NH_2)CH_3$.

У контексті цього документу термін "амід" стосується$–C(O)N(R)_2$, де кожен R є незалежно алкільною групою або воднем. Приклади амідів включають, але не обмежуються ними, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHCH_3$ і $–C(O)N(CH_3)_2$.

Терміни "гідроксилалкіл" і "гідроксиалкіл" використовуються взаємозамінно і стосуються алкільної групи, заміщеної однією або більше гідроксильними групами. Алкіл може бути аліфатичним вуглеводнем з розгалуженим або прямим ланцюгом. Приклади гідроксилалкілу включають, але не обмежуються ними, гідроксилметил ($-CH_2OH$), гідроксилетил ($-CH_2CH2OH$) тощо.

Використовуваний тут термін "арил" є групою, яка містить будь-яку ароматичну групу на основі вуглецю, включно з, але не обмежуючись ними, фенілом, нафтилом, антраценілом, фенантранілом і таке інше. Арильні фрагменти добре відомі та описані, наприклад, у Lewis, R. J., ed., Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 13th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997). Арильна група може являти собою одну кільцеву структуру (моноциклічна) або містити кілька кільцевих структур (поліциклічна), які є конденсованими кільцевими структурами. Переважно арильна група являє собою моноциклічну арильну групу.

У контексті цього документу термін "гетероцикліл" включає стабільні моноциклічні та поліциклічні вуглеводні, які містять щонайменше один гетероатомний член кільця, такий як сірка, кисень або азот. У контексті цього документу термін "гетероарил" включає стабільні моноциклічні та поліциклічні ароматичні вуглеводні, які містять щонайменше один гетероатомний член кільця, такий як сірка, кисень або азот. Гетероарил може бути моноциклічним або поліциклічним, наприклад біциклічним або трициклічним. Кожне кільце гетероциклічної або гетероарильної групи, що містить гетероатом, може містити один або два атоми кисню або сірки та/або від одного до чотирьох атомів азоту за умови, що загальна кількість гетероатомів в кожному кільці складає чотири або менше і кожне кільце має щонайменше один атом вуглецю. Гетероарильні групи, які є поліциклічними, наприклад біциклічними або трициклічними, повинні включати щонайменше одне повністю ароматичне кільце, але інше конденсоване кільце або кільця можуть бути ароматичними або неароматичними. Гетероциклільна або гетероарильна група може бути приєднана до будь-якого доступного атома азоту або вуглецю будь-якого кільця гетероциклільної або гетероарильної групи. Переважно термін "гетероарил" стосується 5- або 6-членних моноциклічних груп і 9- або 10-членних біциклічних груп, які мають щонайменше один гетероатом (O, S або N) щонайменше в одному з кілець, де кільце, що містить гетероатом, переважно має 1, 2 або 3 гетероатоми, більш переважно 1 або 2 гетероатоми, вибрані з O, S та/або N. Гетероатом(и) азоту гетероарилу може бути заміщеним або незаміщеним. Крім того, гетероатом(и) азоту та сірки гетероарилу можуть бути необов'язково окиснені (тобто $N→O$ та $S(O)_r$, де r дорівнює 0, 1 або 2).

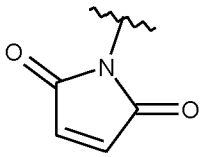
Термін "естер" стосується $-C(O)_2R$, де R є алкілом.

Термін "карбамат" стосується $-OC(O)NR_2$, де кожен R незалежно є алкілом або воднем.

Термін "альдегід" стосується -C(O)H.

Термін "карбонат" стосується -OC(O)OR, де R є алкілом.

Термін "малеімід" стосується групи з хімічною формулою $H_2C_2(CO)_2NH$. Термін "малеімідо" стосується малеімідної групи, ковалентно зв'язаної з іншою групою або молекулою. Переважно малеімідогрупа є N-зв'язаною, наприклад:



Термін "ацил-галогенід" стосується -C(O)X, де X є галогеном (наприклад, Br, Cl). Типові ацилгалогеніди включають ацилхлорид (-C(O)Cl) і ацилбромід (-C(O)Br).

У контексті цього документа термін "заміщений" означає, що щонайменше один атом водню заміщений неводневою групою за умови, що всі нормальні валентності зберігаються і що заміщення призводить до стабільної сполуки. Коли конкретна група є "заміщеною", ця група може мати один або більше замісників, переважно від одного до п'яти замісників, більш переважно від одного до трьох замісників, найбільш переважно від одного до двох замісників, незалежно вибраних зі списку замісників. Термін "незалежно", коли використовується щодо замісників, означає, що коли можливо більше одного з таких замісників, такі замісники можуть бути однаковими або різними. Будь-яка з груп замісників, описаних тут (наприклад, алкіл, циклоалкіл, алкокси, алкеніл, циклоалкеніл, алкініл, циклоалкініл, арил, гетероцикліл, гетероарил тощо) може бути незаміщеною або заміщеною одним або більше відповідними замісниками. Приклади відповідних замісників включають, але не обмежуються ними, алкіл, галоген, гідрокси, алкокси, амід, алкілтіо, аміно, алкіламіно, аміноалкіл, гідроксиалкіл, гідроксил, карбоксил тощо.

Відповідно до умов, що використовуються в галузі:



використовують в структурних формулах у цьому документі для зображення зв'язку, який є точкою приєднання фрагменту, функціональної групи або замісника до ядра, вихідної або основної структури, такої як хелатор або ліганд націлювання.

Коли будь-яка змінна зустрічається більше одного разу в будь-якій складовій або формулі сполуки, її визначення у кожному випадку не залежить від визначення у кожному іншому випадку. Таким чином, наприклад, якщо показано, що група заміщена 0–3 групами R, тоді зазначена група може бути необов'язково заміщена групами R в кількості до трьох, і у кожному випадку R вибирають незалежно від визначення R.

Коли показано, що зв'язок із замісником перетинає зв'язок, що з'єднує два атоми в кільці, тоді такий замісник може бути зв'язаний з будь-яким атомом у кільці.

Термін "іон радіометалу" або "іон радіоактивного металу", що використовується в цьому документі, стосується одного або більше ізотопів елементів, які випромінюють частинки та/або фотони. У винаході може бути використаний будь-який іон радіометалу, відомий фахівцям у цій галузі. Приклади іонів радіометалів, придатних для використання у винаході, включають, але не обмежуються ними, ^{32}P, ^{47}Sc, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}As, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{111}In, ^{117}Sn, ^{131}I, ^{149}Tb, ^{152}Tb, ^{155}Tb, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{227}Th і ^{255}Fm. Переважно іон радіометалу є "терапевтичним випромінювачем", що означає іон радіометалу, який корисний у терапевтичних застосуваннях. Приклади терапевтичних випромінювачів включають, але не обмежуються ними, бета- або альфа-випромінювачі, такі як ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{149}Tb, ^{152}Tb, ^{155}Tb, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{255}Fm і ^{227}Th. Переважно іон радіометалу, що використовується у винаході, є альфа-випромінюючим іоном радіометалу, таким як Актиній-225 (^{225}Ac).

У контексті цього документа термін "хелатор" або "хелатуючий агент" стосується хімічної сполуки, з якою метал, переважно радіометал, може бути хелатований за допомогою координатного зв'язку. У типовому варіанті здійснення хелатор являє собою макроциклічне кільце, що містить один або більше гетероатомів, наприклад, кисень та/або азот як атоми кільця. Переважно хелатором є похідні 4,13-діаза-18-краун-6.

Термін "комплекс радіометалу" у контексті цього документу стосується комплексу, що містить іон радіометалу, зв'язаний з хелатором. Як правило, іон радіометалу зв'язується з хелатором або координується з ним за допомогою координатного зв'язку. Гетероатоми макроциклічного кільця можуть брати участь у координатному зв'язуванні іона радіометалу з хелатором. Хелатор може бути заміщений однією або більше групами замісників, і одна або більше груп замісників можуть також брати участь у координаційному зв'язуванні іона радіометалу з хелатором на додаток до або

альтернативно до гетероатомів макроциклічного кільця.

Термін "клік-хімія" у контексті цього документа стосується хімічної філософії, введеної Шарплесом, що описує розділ хімії, розроблений для швидкого і надійного створення ковалентних зв'язків шляхом з'єднання невеликих блоків, що містять реакційноздатні групи (див. Kolb, et al., Angewandte Chemie International Edition (2001) 40: 2004-2021). "Клік-хімія" не стосується конкретної реакції, а відноситься до поняття, яке включає, серед іншого, реакції, що імітують природні реакції. У деяких варіантах здійснення реакції "клік-хімії" є модульними, широкими за обсягом, дають високі хімічні виходи, генерують інертні побічні продукти, є стереоспецифічними, проявляють велику термодинамічну рушійну силу для сприяння реакції з одним продуктом реакції та/або можуть відбуватись у фізіологічних умовах. У деяких варіантах здійснення реакція "клік-хімії" може відбуватись у простих умовах реакції з використанням легкодоступних вихідних матеріалів і реагентів, з використанням нетоксичних розчинників або з використанням розчинника, який є безпечним або легко видаляється, наприклад води, та/або забезпечує просте виділення продукту нехроматографічними методами, такими як кристалізація або дистиляція.

Реакции клік-хімії використовують реакційноздатні групи, які рідко зустрічаються в природних біомолекулах і є хімічно інертними щодо біомолекул, але коли партнери клік-реакції реагують разом, реакція може відбуватися ефективно в біологічно релевантних умовах, наприклад в умовах клітинної культури, наприклад, за відсутності надлишку тепла та/або агресивних реагентів. Як правило, для хімічних клік-реакцій потрібні щонайменше дві молекули, що включають партнерів клік-реакції, які можуть реагувати один з одним. Таких партнерів клік-реакції, які реагують один з одним, іноді в цьому документі називають парами груп приєднання клік-хімії або парами клік-хімії. У деяких варіантах здійснення партнерами клік-реакції є азид і напружений алкін, наприклад циклоалкін, такий як циклооктин або похідні циклооктину, або будь-який інший алкін. В інших варіантах здійснення партнерами клік-реакції є реакційноздатні дієни та придатні тетразинові дієнофіли. Наприклад, транс-циклооктен, норборнен або бісциклононен можна парувати з відповідним тетразиновим дієнофілом у вигляді пари клік-реакції. Ще в інших варіантах здійснення тетразоли можуть виступати як приховані джерела нітрильних імінів, які можуть утворювати пари з неактивованими алкенами в присутності ультрафіолетового світла для створення пари клік-реакції, що називається "фото-клік" реакційною парою. В інших варіантах здійснення партнерами клік-реакції є цистеїн і малеїмід. Наприклад, цистеїн із пептиду (наприклад, GGGC) може вступати в реакцію з малеїмідом, який з'єднується з хелатувальним агентом (наприклад, NOTA). Інші відповідні групи приєднання клік-хімії відомі фахівцям у цій галузі (див., наприклад, Spicer et al., Selective chemical protein modification. Nature Communications. 2014; 5: p. 4740). В інших варіантах здійснення партнерами клік-реакції є компоненти лігування Штаудінгера, такі як фосфін і азид. В інших варіантах здійснення партнерами клік-реакції є компоненти реакції Дільса-Альдера, такі як дієни (наприклад, тетразин) і алкени (наприклад, транс-циклооктен (TCO) або норборнен). Приклади партнерів клік-реакції описані в US20130266512 та WO2015073746, відповідний опис партнерів клік-реакції з обох документів включено до цього опису шляхом посилання.

Відповідно до кращих варіантів здійснення реакція клік-хімії використовує азидну групу та алкінову групу, більш переважно напружену алкінову групу, наприклад циклоалкін, такий як циклооктин або похідні циклооктину, у якості пари клік-хімії або партнерів реакції. У таких здійсненнях реакція клік-хімії являє собою циклоприєднання Хюсгена або 1,3-диполярне циклоприєднання між азидним (-N_3) та алкіновим фрагментом з утворенням 1,2,3-триазолового лінкера. Реакції "клік-хімії" між алкінами й азидами зазвичай вимагають додавання мідного каталізатора для активації реакції 1,3-циклоприєднання й відомі як реакції циклоприєднання азиду-алкіну, каталізовані міддю (CuAAC). Однак реакції "клік-хімії" між циклооктином або похідними циклооктину й азидами, як правило, не потребують додавання мідного каталізатора, а, натомість, відбуваються за допомогою азид-алкінового циклоприєднання за сприяння напруження кільця (SPAAC) (Debets, M.F., et al., Bioconjugation with strained alkenes and alkynes. Acc Chem Res, 2011. 44(9): p. 805-15).

Термін "ліганд націлювання", який використовується в цьому документі, стосується будь-якої молекули, яка забезпечує підвищену спорідненість до вибраної мішені, наприклад антигену, клітини, типу клітини, тканини, органу, ділянки тіла або компартменту (наприклад, клітинний, тканинний або органний компартмент). Ліганди націлювання включають, але не обмежуються ними, антитіла або їхні антигензв'язувальні фрагменти, малі молекули, аптамери, поліпептиди і каркасні білки. Переважно ліганд націлювання є поліпептидом, більш переважно антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, сконструйованим доменом або білком каркаса.

Термін "поліпептид", що використовується в цьому документі, відноситься до полімеру, який складається з амінокислотних залишків, споріднених природних структурних варіантів та їхніх синтетичних неприродних аналогів, зв'язаних через пептидні зв'язки. Термін відноситься до поліпептиду будь-якого розміру, структури або функції. Зазвичай поліпептид має довжину щонайменше трьох амінокислот. Поліпептид може бути природним, рекомбінантним або синтетичним або будь-якою їхньою комбінацією. Синтетичні поліпептиди можуть бути синтезовані, наприклад, за

допомогою автоматизованого синтезатора поліпептидів. Відповідно до переважних варіантів здійснення поліпептид являє собою антитіло, переважно моноклональне антитіло або його фрагмент, такий як його антигензв'язувальний фрагмент. Відповідно до переважних варіантів здійснення антитіло або його фрагмент є специфічним для ракового антигена. Відповідно до переважних варіантів здійснення поліпептид є сконструйованим доменом або каркасним білком.

Термін "антитіло" або "імуноглобулін", що використовується в цьому документі, застосовується в широкому сенсі та включає молекули імуноглобуліну або антитіла, включно з поліклональними антитілами, моноклональними антитілами, у тому числі мишачими, людськими, адаптованими до людини, гуманізованими та химерними моноклональними антитілами та їхніми антигензв'язувальними фрагментами.

Загалом антитіла являють собою білки або пептидні ланцюги, які виявляють специфічність зв'язування зі специфічним антигеном, іменованим у цьому документі як "мішень". Структури антитіл добре відомі. Імуноглобуліни можна віднести до п'яти основних класів, а саме IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, залежно від амінокислотної послідовності константного домену важких ланцюгів. IgA й IgG додатково підрозділяють на ізотипи IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 й IgG4. Антитіла, що використовуються у винаході, можуть належати до будь-якого з п'яти основних класів або відповідних підкласів. Легкі ланцюги антитіл будь-якого виду хребетних можна віднести до одного з двох чітко відмінних типів, а саме каппа й лямбда, на основі амінокислотних послідовностей їхніх константних доменів. Відповідно до конкретних варіантів здійснення антитіла, що використовуються у винаході, включають константні ділянки важкого та/або легкого ланцюга мишачих або людських антитіл. Кожен із чотирьох підкласів IgG має різні біологічні функції, відомі як ефекторні функції. Ці ефекторні функції, як правило, опосередковуються через взаємодію з Fc рецептором (FcγR) або шляхом зв'язування C1q та фіксації комплементу. Зв'язування з FcγR може призводити до антитілозалежного клітиноопосередкованого цитолізу, тоді як зв'язування з факторами комплементу може призводити до опосередкованого комплементом клітинного лізису. Антитіло, корисне для цього винаходу, може зовсім не мати або мати мінімальну ефекторну функцію, але зберігати свою здатність зв'язувати FcRn.

Термін "антигензв'язувальний фрагмент", що використовується в цьому документі, відноситься до фрагмента антитіла, такого як, наприклад, діатіло, Fab, Fab", F(ab")2, Fv-фрагмент, стабілізований дисульфідним зв'язком Fv-фрагмент (dsFv), $(dsFv)_2$, біспецифічний dsFv (dsFv-dsFv"), стабілізоване дисульфідним зв'язком діатіло (ds антитіло), молекула одноланцюгового антитіла (scFv), однодоменне антитіло (sdab), димер scFv (бівалентне діатіло), мультиспецифічне антитіло, утворене з частини антитіла, яке містить одну або більше CDR, однодоменне антитіло верблюда, нанотіло, доменне антитіло, бівалентне доменне антитіло або будь-який інший фрагмент антитіла, який зв'язується з антигеном, але не містить повної структури антитіла. Антигензв'язувальний фрагмент здатен зв'язуватися з тим самим антигеном, з яким зв'язується вихідне антитіло або фрагмент вихідного антитіла. Термін "одноланцюгове антитіло", що використовується в цьому документі, відноситься до звичайного одноланцюгового антитіла в цій галузі, яке містить варіабельну область важкого ланцюга й варіабельну область легкого ланцюга, з'єднані коротким пептидом, який містить від приблизно 15 до приблизно 20 амінокислот. Термін "однодоменне антитіло", що використовується в цьому документі, відноситься до звичайного однодоменного антитіла в цій галузі, яке містить варіабельну область важкого ланцюга й константну область важкого ланцюга або яке містить лише варіабельну область важкого ланцюга.

Термін "каркас" або "каркасний білок", що використовується в цьому документі, відноситься до будь-якого білка, який має цільовий зв'язувальний домен і може зв'язуватися з мішенню. Каркас містить "каркасну структуру", яка значною мірою структурована, і "зв'язувальний домен", який створює контакт із ціллю та забезпечує специфічне зв'язування. Зв'язувальний домен каркаса не повинен визначатися однією суцільною послідовністю каркаса. У певних випадках каркас може бути частиною більшого зв'язувального білка, який сам по собі може бути частиною мультимерного зв'язувального білка, який містить кілька каркасів. Деякі зв'язувальні білки можуть бути бі- або мультиспецифічними, оскільки вони можуть зв'язуватися з двома або більше різними епітопами. Каркас можна отримувати з одноланцюгового антитіла, або ж він може не бути похідним антитіла.

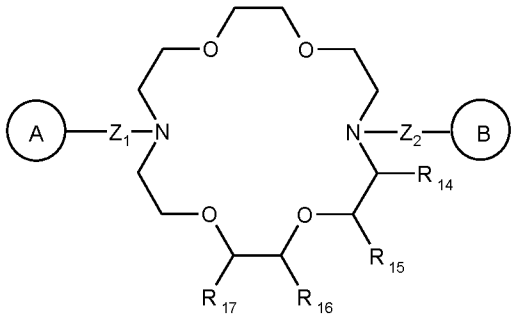
Термін "аптамер", що використовується в цьому документі, відноситься до одноланцюгового олігонуклеотиду (одноланцюгової молекули ДНК або РНК), який може специфічно зв'язуватися зі своєю мішенню з високою афінністю. Аптамер можна використовувати як молекулу, націлювану на різні органічні та неорганічні речовини.

Термін "низькомолекулярний ліганд", що використовується в цьому документі, відноситься до органічної сполуки з низькою молекулярною масою. Низькомолекулярні ліганди, що використовується в цьому документі, можуть відноситись до сполук, які мають розмір менше ніж приблизно 1000 дальтон, і можуть бути синтезовані в лабораторії або виявлені в природі.

Хелатори

В одному загальному аспекті винахід стосується хелатору, переважно хелатору, до якого радіометали можуть бути хелатовані за допомогою координатного зв'язку. Відповідно до варіантів

здійснення винаходу хелатор має структуру формули (I):



(I)

де:

кожне з кільця A і кільця B незалежно є 6-10-членним арилом або 5-10-членним гетероарилом, де кожне з кільця A і кільця B необов'язково заміщене одним або більше замісниками, незалежно вибраними з групи, що складається з галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, -CN, $-OC(O)N(R_{13})_2$ і X;

кожний з Z_1 і Z_2 незалежно являє собою $–(C(R_{12})_2)_m-$ або $–(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$;

кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5;

кожний p незалежно дорівнює 0 або 1;

L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання;

кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом;

кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом;

кожен із R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} незалежно являє собою водень, алкіл або X,

або альтернативно R_{14} і R_{15} та/або R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця, необов'язково заміщеного X;

за умови, що хелатор містить щонайменше один X, і коли X присутній на кільці A або кільці B, L_1 є лінкером або щонайменше один з R_{12} і R_{14}-R_{17} не є воднем.

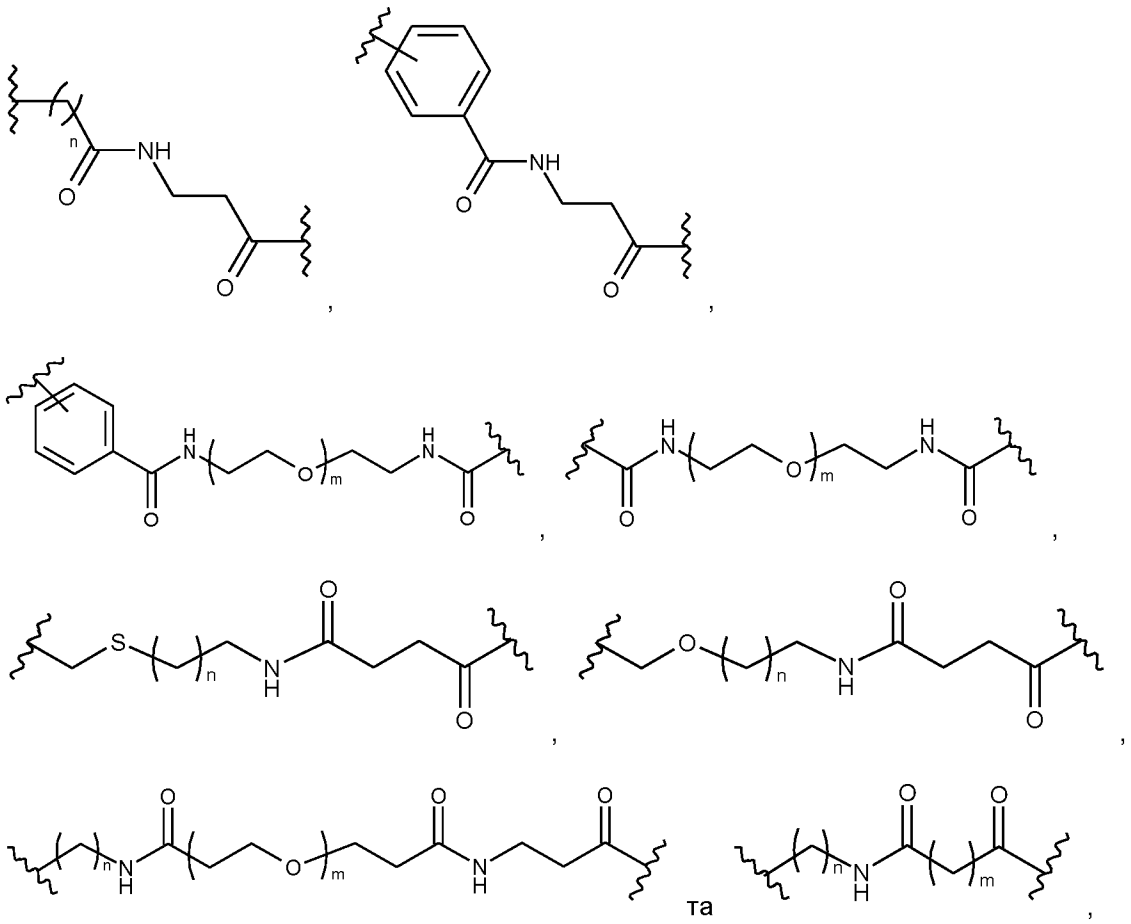
Відповідно до варіантів здійснення винаходу хелатор містить щонайменше одну групу X, де X являє собою $-L_1-R_{11}$, де L_1 відсутній або є лінкером, а R_{11} є електрофільним фрагментом або нуклеофільним фрагментом або R_{11} містить ліганд націлювання. Коли R_{11} являє собою нуклеофільний або електрофільний фрагмент, такий фрагмент можна використовувати для приєднання хелатора до ліганду націлювання прямо або опосередковано через лінкер.

У певних варіантах здійснення хелатор містить одну групу X, і переважно L_1 групи X є лінкером.

Хелатор винаходу може бути заміщений на X у будь-якому з атомів вуглецю макроциклічного кільця, у положенні Z_1 або Z_2 або в кільці A або кільці B, за умови, що коли кільце або кільце B містить групу X, L_1 являє собою лінкер або щонайменше один з R_{12} та R_{14}-R_{17}- не є воднем (тобто щонайменше один з атомів вуглецю Z_1, Z_2 та/або атомів вуглецю макроциклічного кільця заміщений, наприклад, алкільною групою, такою як метил або етил). Переважно заміщення в таких положеннях не впливає на ефективність хелатування іонів радіометалів, зокрема ^{225}Ac, і в деяких варіантах здійснення заміщення можуть підвищити ефективність хелатування.

У деяких варіантах здійснення L_1 відсутній. Коли L_1 відсутній, R_{11} безпосередньо зв'язується (наприклад, за допомогою ковалентного зв'язку) з хелатором.

У деяких варіантах здійснення L_1 є лінкером. У контексті цього документа термін "лінкер" стосується хімічної частини, яка приєднує хелатор до нуклеофільної частини, електрофільної частини або ліганду націлювання. У винаході може використовуватись будь-який відповідний лінкер, відомий фахівцям у цій галузі з огляду цього винаходу. Лінкери можуть містити, наприклад, заміщений або незаміщений алкіл, заміщений або незаміщений гетероалкільний фрагмент, заміщений або незаміщений арил або гетероарил, лінкер поліетиленгліколю (PEG), пептидний лінкер, лінкер на основі цукру або лінкер, здатний розщеплюватися, такий як дисульфідний зв'язок або сайт розщеплення протеазою, такий як валін-цитрулін-p-амінобензил (PAB). Приклади лінкерних структур, придатних для використання у винаході, включають, але не обмежуються ними:



де n дорівнює цілому числу від 0 до 10, переважно цілому числу від 1 до 4; і m дорівнює цілому числу від 0 до 12, переважно цілому числу від 0 до 6.

У деяких варіантах здійснення. R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент. Терміни "нуклеофільний фрагмент" або "нуклеофільна група" стосуються функціональної групи, яка віддає електронну пару для утворення ковалентного зв'язку в хімічній реакції. Терміни "електрофільний фрагмент" або "електрофільна група" належить до функціональної групи, яка приймає електронну пару для утворення ковалентного зв'язку в хімічній реакції. Нуклеофільні групи реагують з електрофільними групами, і навпаки, в хімічних реакціях з утворенням нових ковалентнх зв'язків. Реакція нуклеофільної групи або електрофільної групи хелатора винаходу з лігандом націлювання або іншим хімічним фрагментом (наприклад, лінкером), що містить відповідного партнера реакції, дозволяє ковалентне зв'язування цільового ліганду або хімічної частини з хелатором винаходу.

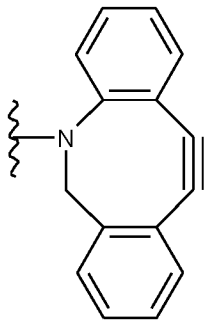
Типові приклади нуклеофільних груп включають, але не обмежуються ними, азиди, аміни та тіоли. Типові приклади електрофільних груп включають, але не обмежуються ними, амінових реакційнохдатних групи, тіолових реакційноздатних групи, алкініли та циклоалкініли. Амінова реакційноздатна група переважно реагує з первинними амінами, включно з первинними амінами, які існують на N-кінці кожного поліпептидного ланцюга і в бічному ланцюзі залишків лізину. Приклади амінових реакційноздатних груп, придатних для використання у винаході, включають, але не обмежуються ними, N-гідроксисукцинімід (NHS), заміщений NHS (такий як, сульфо-NHS), ізотіоціанат (-NCS), ізоціанат (-NCO), естери, карбонову кислоту, ацилгалогеніди, аміди, алкіламіди та тетра- і перфторфеніловий естер. Тіолова реакційноздатна група реагує з тіолами або сульфгідрилами, переважно тіолами, присутніми в бічному ланцюзі цистеїнових залишків поліпептидів. Приклади тіолових реакційноздатних груп, придатних для використання у винаході, включають, але не обмежуються ними, акцептори Майкла (наприклад, малеімід), галогенацетил, ацилгалогеніди, активовані дисульфіди і фенілоксадіазолсульфон.

У конкретних варіантах здійснення R_{11} являє собою $–NH_2$, -NCS (ізотіоціанат), -NCO (ізоціанат), $-N_3$ (азидо), алкініл, циклоалкініл, карбонову кислоту, естер, амідо, алкіламід, малеімідо, ацилгалогенід, тетразин або транс-циклооктен, більш конкретно -NCS, -NCO, $-N_3$, алкініл, циклоалкініл, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеімідо, ацилгалогенід (наприклад, -C(O)Cl, -C(O)Br), тетразин або транс-циклооктен, де кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом.

У деяких варіантах здійснення R_{11} являє собою алкінільну, циклоалкінільну або азидогрупу, що дозволяє приєднати хелатор до ліганду націлювання або іншого хімічного фрагмента (наприклад, лінкеру) за допомогою реакції клік-хімії. У таких варіантах здійснення реакція клік-хімії, яка може бути здійснена, являє собою циклоприєднання Хюсгена або 1,3-диполярне циклоприєднання між азидо (-N_3) та алкінільною або циклоалкінільною групою з утворенням 1,2,4-триазолового лінкера або фрагмента. В одному варіанті здійснення хелатор містить алкінільну або циклоалкінільну групу, а цільовий ліганд або інший хімічний фрагмент містить азидогрупу. В іншому варіанті здійснення хелатор містить азидогрупу, а ліганд націлювання або інший хімічний фрагмент містить алкінільну або циклоалкінільну групу.

У певних варіантах здійснення R_{11} являє собою алкінільну групу, більш переважно кінцеву алкінільну групу або циклоалкінільну групу, яка реагує з азидною групою, зокрема, за допомогою штамового азид-алкінового циклоприєднання (SPAAC). Приклади циклоалкінільних груп, які можуть реагувати з азидними групами через SPAAC, включають, але не обмежуються ними, циклооктиніл або біциклононініл (BCN), дифторований циклооктиніл (DIFO), дибензоциклооктиніл (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктиноніл (BARAC), дибензоазациклооктиніл (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктиніл (DIMAC), дифторбензоциклооктиніл (DIFBO), монобензоциклооктиніл (MOBO) і тетраметоксидибензоциклооктиніл (TMDIBO).

У конкретному варіанті здійснення R_{11} являє собою дибензоазациклооктиніл (DIBAC, DBCO, ADIBO), який має таку структуру:



.

У таких варіантах здійснення, в яких R_{11} являє собою DBCO, DBCO може бути ковалентно зв'язаним з хелатором безпосередньо або опосередковано через лінкер і переважно приєднаним до хелатора опосередковано через лінкер.

У деяких варіантах здійснення R_{11} містить ліганд націлювання. Ліганд націлювання може бути зв'язаний з хелатором безпосередньо за допомогою ковалентного зв'язку або опосередковано через лінкер. Лігандом націлювання може бути поліпептид, наприклад антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, маленька молекула, аптамер або білок каркаса тощо. У кращих варіантах цільовий ліганд являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, наприклад моноклональне антитіло (mAb) або його антигензв'язувальний фрагмент, що специфічно зв'язує антиген, пов'язаний з неопластичним захворюванням або розладом, таким як раковий антиген, який може бути простатоспецифічним мембранним антигеном (PSMA), BCMA, Her2, EGFR, KLK2, CD19, CD22, CD30, CD33, CD79b або Нектином-4.

Відповідно до варіантів здійснення винаходу кожне з кільця A і кільця B незалежно являє собою 6-10-членний арил або 5-10-членний гетероарил. В альтернативних варіантах здійснення передбачається, що кожне з кільця A і кільця B необов'язково заміщене гетероциклільним кільцем, таким як оксазолін. Кожне з кільця A та кільця B може бути необов'язково та незалежно заміщене однією або більше групами замісників, незалежно вибраних із групи, що складається з галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, -OR_{13}, -SR_{13}, -$(CH_2)_pCOOR_{13}$, -$OC(O)R_{13}$, -$N(R_{13})_2$, -$CON(R_{13})_2$, -NO_2, -CN-$OC(O)N(R_{13})_2$ та X. Приклади 6-10 членних арильних груп, придатних для цієї мети, включають, але не обмежуються ними, феніл і нафтил. Приклади 5-10-членних гетероарильних груп, придатних для цієї мети, включають, але не обмежуються ними, піридиніл, тіазоліл, ізотіазоліл, оксазоліл, ізоксазоліл та імідазоліл. Приклади відповідних замісників 5-10-членних гетероарильних і 6-10-членних арильних груп включають, але не обмежуються ними, -COOH, тетразоліл і -CH_2COOH. У кращих варіантах здійснення група замісника являє собою -COOH або тетразоліл, який є ізостером -COOH.

У певних варіантах здійснення кожне з кільця A і кільця B незалежно і необов'язково заміщене однією або більше карбоксильними групами, включно з, але не обмежуючись ними, -COOH і -CH_2COOH.

У певних варіантах здійснення кожне з кільця A і кільця B незалежно і необов'язково заміщене

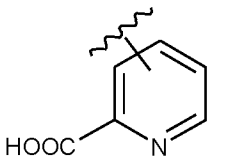
тетразолілом.

В одному варіанті здійснення кільце A і кільце B є однаковими, наприклад, і кільце A, і кільце B є піридинілом. В іншому варіанті кільце A і кільце B є різними, наприклад, одне з кільця A і кільця є піридинілом, а інше являє собою феніл.

У конкретному варіанті здійснення і кільце A, і кільце B є піридинілом, заміщеним -COOH.

У конкретному варіанті здійснення і кільце A, і кільце B є піридинілом, заміщеним тетразолілом.

В іншому конкретному варіанті здійснення і кільце A, і кільце B є групами піколінової кислоти, що мають наступну структуру:



.

Відповідно до варіантів здійснення винаходу кожен з Z_1 та Z_2 незалежно являє собою $–(C(R_{12})_2)_m-$ або $–(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$; кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$; кожен R_{12} незалежно є воднем, алкілом, циклоалкілом, арилом, гетероциклілом або гетероарилом; кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5; і кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{12} незалежно є воднем або алкілом, більш переважно воднем, $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{12} являє собою водень.

У деяких варіантах здійснення і Z_1, і Z_2 являють собою $–(CH_2)_m-$, де кожен m переважно дорівнює 1. У таких варіантах здійснення атом вуглецю макроциклічного кільця, кільця A або кільця B заміщений групою X.

У деяких варіантах здійснення один з Z_1 та Z_2 являє собою $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$, а інший являє собою $–(CH_2)_m-$.

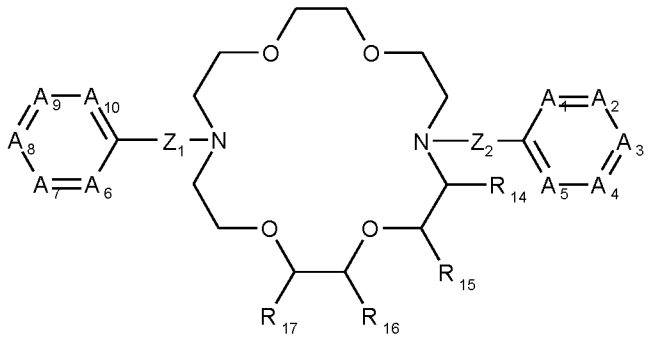
У деяких варіантах здійснення один з Z_1 та Z_2 є $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$, а інший являє собою $–(CH_2)_m-$; кожний n дорівнює 0; m дорівнює 1; X являє собою $-L_1-R_{11}$; і L_1 являє собою лінкер.

У деяких варіантах здійснення і Z_1, і Z_2 являють собою $(CH_2)_m-$; кожен m незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5, переважно кожен m дорівнює 1; і один з R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} являє собою X, а решта з R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} кожен є воднем.

У деяких варіантах здійснення R_{14} та R_{15} разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, утворюють 5- або 6-членне циклоалкільне кільце (тобто циклопентил або циклогексил). Таке 5- або 6-членне циклоалкільне кільце може бути заміщене групою X.

У деяких варіантах здійснення R_{16} та R_{17} разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, утворюють 5- або 6-членне циклоалкільне кільце (тобто циклопентил або циклогексил). Таке 5- або 6-членне циклоалкільне кільце може бути заміщене групою X.

У певних варіантах здійснення хелатор має структуру формули (II):



(II)

де:

A_1 являє собою N або CR_1 або відсутній;

A_2 являє собою N або CR_2;

A_3 являє собою N або CR_3;

A_4 являє собою N або CR_4;

A_5 являє собою N або CR_5;

A_6 являє собою N або CR_6 або відсутній;

A_7 являє собою N або CR_7;

A_8 являє собою N або CR_8;

A_9 являє собою N або CR_9;

A_{10} являє собою N або CR_{10};

за умови, що не більше трьох з A_1, A_2, A_3, A_4 та A_5 являють собою N, і не більше трьох з A_6, A_7, A_8, A_9 та A_{10} являють собою N;

кожен з R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} незалежно вибирають із групи, що складається з водню, галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, -CN, $-OC(O)N(R_{13})_2$ і -X,

або альтернативно будь-які два безпосередньо суміжні R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} взяті разом з атомами, до яких вони приєднані, для утворення п'яти або шестичленного заміщеного або незаміщеного карбоциклічного або азотвмісного кільця;

і Z_1, Z_2, X, n, m, p, L_1 та R_{11}-R_{17} є такими, як описано вище для формули (I),

за умови, що хелатор містить щонайменше один X, і коли будь-який з R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою X, тоді L_1 є лінкером або щонайменше один з R_{12} та R_{14}-R_{17} не є воднем.

У деяких варіантах здійснення будь-які два безпосередньо суміжних R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} взяті разом з атомами, до яких вони приєднані, для утворення п'яти- або шестичленного заміщеного або незаміщеного карбоциклічного або азотовмісного кільця. Приклади таких карбоциклічних кілець, які можуть бути утворені, включають, серед іншого, нафтил. Приклади таких азотовмісних кілець, які можуть бути утворені, включають, серед іншого, хінолініл. Карбоциклічні або азотовмісні кільця можуть бути незаміщеними або заміщеними одним або більше відповідними замісниками, наприклад -COOH, $-CH_2COOH$, тетразолілом тощо.

У деяких варіантах здійснення L_1 відсутній. Коли L_1 відсутній, R_{11} безпосередньо зв'язується (наприклад, за допомогою ковалентного зв'язку) з хелатором.

У деяких варіантах здійснення L_1 є лінкером. Будь-який відповідний лінкер, відомий фахівцям у цій галузі з огляду на цей опис, може бути використаний у винаході, наприклад, описаний вище.

У деяких варіантах здійснення один з A_1, A_2, A_3, A_4 та A_5 являє собою азот, один з A_1, A_2, A_3, A_4 та A_5 є вуглецем, заміщеним -COOH, і решта являє собою CH, тобто утворюють піридинільне кільце, заміщене карбоновою кислотою.

У деяких варіантах здійснення один з A_6, A_7, A_8, A_9 та A_{10} є азотом, один з A_6, A_7, A_8, A_9 та A_{10} є вуглецем, заміщеним -COOH, і решта являє собою CH, тобто утворюють піридинільне кільце, заміщене карбоновою кислотою.

В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 являє собою -COOH. В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою -COOH. В іншому варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 являє собою -COOH; і щонайменше один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою -COOH.

У деяких варіантах здійснення кожен з A_1 і A_{10} являє собою азот; A_2 являє собою CR_2, і R_2 являє собою -COOH;

A_9 являє собою CR_9, і R_9 являє собою -COOH; кожен з A_3-A_8 являє собою CR_2, CR_3, CR_4, CR_5, CR_6, CR_7 і CR_8 відповідно; і кожен з R_3 до R_8 є воднем.

У деяких варіантах здійснення один з A_1, A_2, A_3, A_4 і A_5 являє собою азот, один з A_1, A_2, A_3, A_4 і A_5 являє собою вуглець, заміщений тетразолілом, а решта являє собою CH.

У деяких варіантах здійснення один з A_6, A_7, A_8, A_9 і A_{10} являє собою азот, один з A_6, A_7, A_8, A_9 і A_{10} є вуглецем, заміщеним тетразолілом, а решта являє собою CH.

В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 є тетразолілом. В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} є тетразолілом. В іншому варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 є тетразолілом; і хоча б один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} є тетразолілом.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{12} являє собою водень.

У деяких варіантах здійснення R_{11} являє собою алкінільну групу або циклоалкінільну групу, переважно циклооктиніл або похідні циклооктинілу, наприклад DBCO.

У конкретних варіантах здійснення хелатора формули (II):

кожен з A_1 і A_{10} є азотом;

A_2 являє собою CR_2, і R_2 являє собою -COOH;

A_9 являє собою CR_9, і R_9 являє собою -COOH;

кожен з A_3-A_8 являє собою CR_2, CR_3, CR_4, CR_5, CR_6, CR_7 і CR_8 відповідно;

кожен з R_3 до R_8 є воднем;

один з Z_1 і Z_2 являє собою $–(CH2)_m$-, а інший з Z_1 і Z_2 являє собою $–(CH_2)_n$-$C(R_{12})(X)$-$(CH_2)_n$-;

R_{12} являє собою водень;

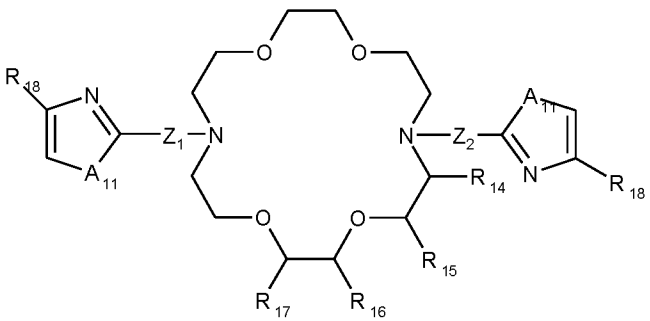
m дорівнює 1;

кожний n дорівнює 0;

X являє собою -L_1-R_{11}, де L_1 являє собою лінкер і -R_{11} являє собою електрофільну групу, наприклад циклооктиніл або циклооктинільну похідну, наприклад DBCO; і

кожен з R_{14}-R_{17} є воднем, або альтернативно R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця.

У певних варіантах здійснення хелатор має структуру формули (III):



(III)

де:

кожний A_{11} незалежно являє собою O, S, NMe або NH;

кожен R_{18} незалежно вибирають із групи, що складається з водню, галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, -OR_{13}, -SR_{13}, -$COOR_{13}$, -$OC(O)R_{13}$, -$N(R_{13})_2$, -$CON(R_{13})_2$, -NO_2, -CN-$OC(O)N(R_{13})_2$ і -X,

і Z_1, Z_2, X, n, m, L_1, R_{11}-R_{17} є такими, як описано вище для формули (I),

за умови, що хелатор містить щонайменше один X, і коли R_{18} являє собою X, тоді L_1 є лінкером або щонайменше один з R_{12} і R_{14}-R_{17} не є воднем.

У деяких варіантах здійснення кожен A_{11} є однаковим, і кожен A_{11} являє собою O, S, NMe або NH. Наприклад, кожен A_{11} може бути S. В інших варіантах здійснення кожен A_{11} відрізняється, а також кожен незалежно вибирається з O, S, NMe та NH.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} незалежно являє собою –$(CH_2)_p$-$COOR_{13}$ або тетразоліл, де R_{13} являє собою водень і кожен p незалежно дорівнює 0 або 1.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} являє собою -COOH.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} являє собою -CH_2COOH.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} являє собою тетразоліл.

У конкретних варіантах здійснення хелатора формули (III):

кожен R_{18} являє собою COOH;

один з Z_1 і Z_2 являє собою –$(CH_2)_m$-, а інший з Z_1 і Z_2 являє собою –$(CH_2)_n$-$C(R_{12})(X)$-$(CH_2)_n$-;

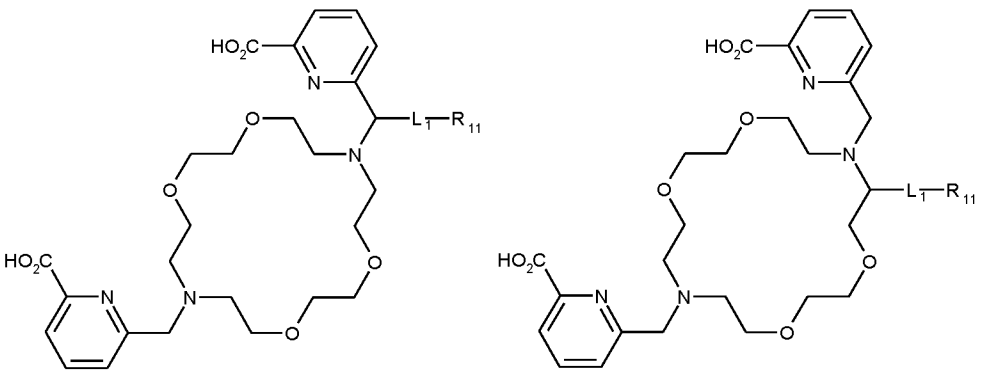
R_{12} являє собою водень;

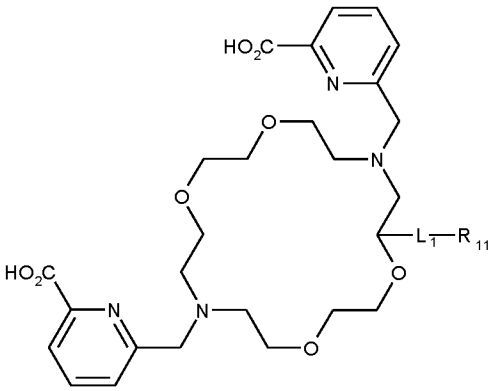
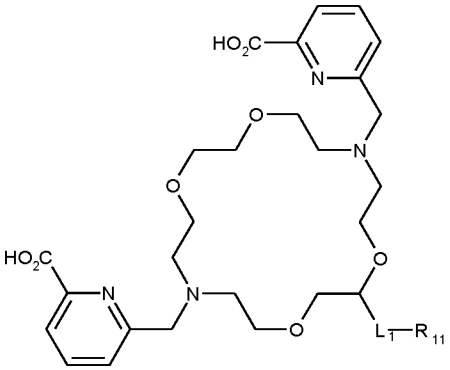
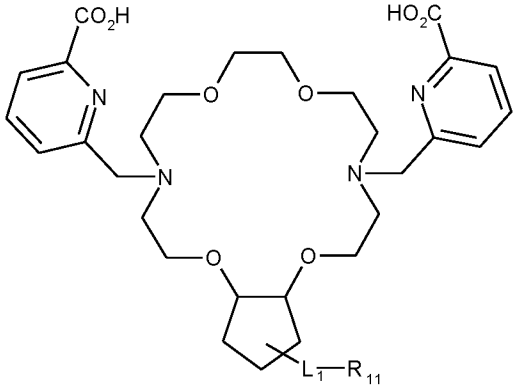
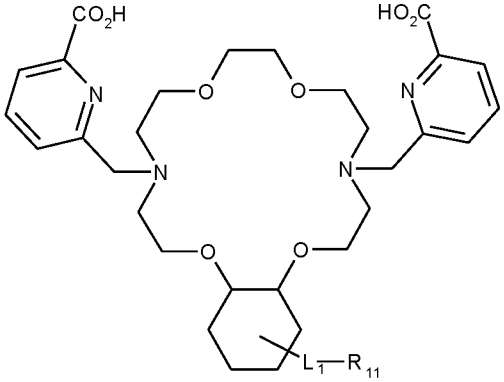
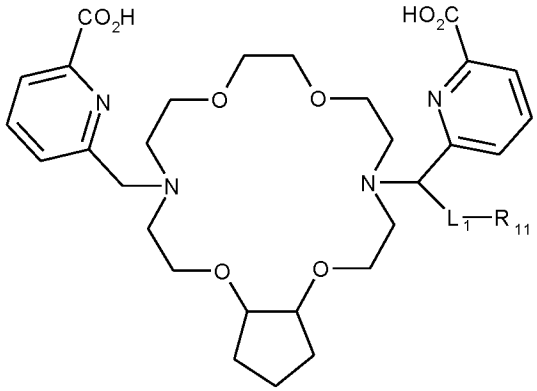
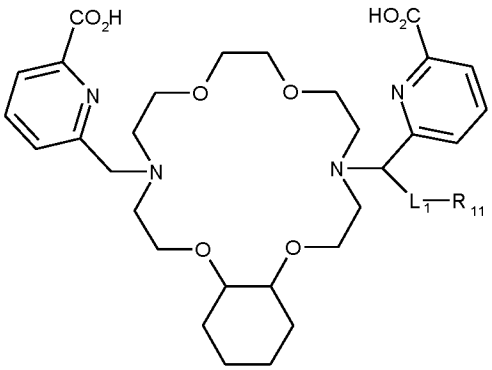
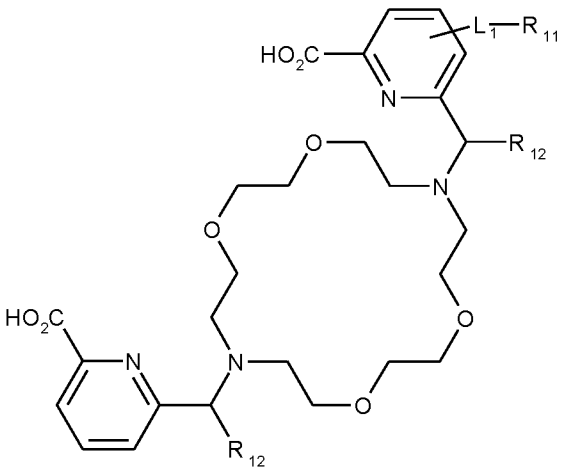
m дорівнює 1; кожний n дорівнює 0;

X являє собою -L_1-R_{11}, де L_1 являє собою лінкер і -R_{11} являє собою електрофільну групу, наприклад циклооктиніл або циклооктинільну похідну, наприклад DBCO або BCN; і

кожен з R_{14}-R_{17} є воднем, або альтернативно R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця.

У конкретних варіантах здійснення винаходу хелатор вибирають із групи, що складається з:



де:
L_1 відсутній або являє собою лінкер;
R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд

націлювання; і

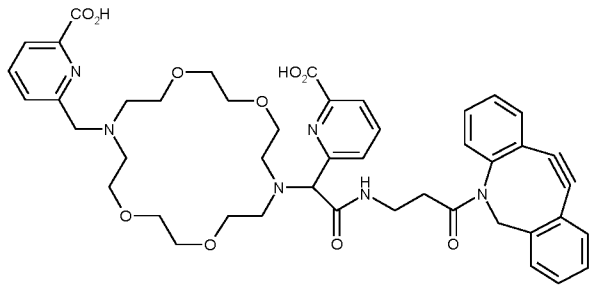
кожен R_{12} незалежно є воднем, $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$, за умови, що щонайменше один R_{12} являє собою $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$.

У деяких варіантах здійснення R_{11} є $-NH_2$, -NCS, -NCO, $-N_3$, алкінілом, циклоалкінілом, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеімідо, ацилгалогенідом, тетразином або транс-циклооктеном.

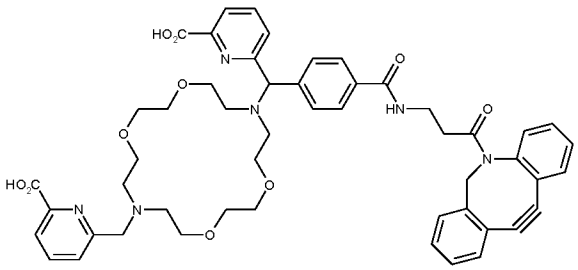
У певних варіантах здійснення R_{11} являє собою циклооктиніл або похідні циклооктинілу, вибране з групи, що складається з біциклононінілу (BCN), дифторованого циклооктинілу (DIFO), дибензоциклооктинілу (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктинонілу (BARAC), дибензоазациклооктинілу (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктинілу (DIMAC), дифторбензоциклооктинілу (DIFBO), монобензоциклооктинілу (MOBO) і тетраметоксидібензоциклооктинілу (TMDIBO).

Переважно R_{11} є алкінільною групою або циклоалкінільною групою, більш переважно циклоалкінільною групою, наприклад DBCO або BCN.

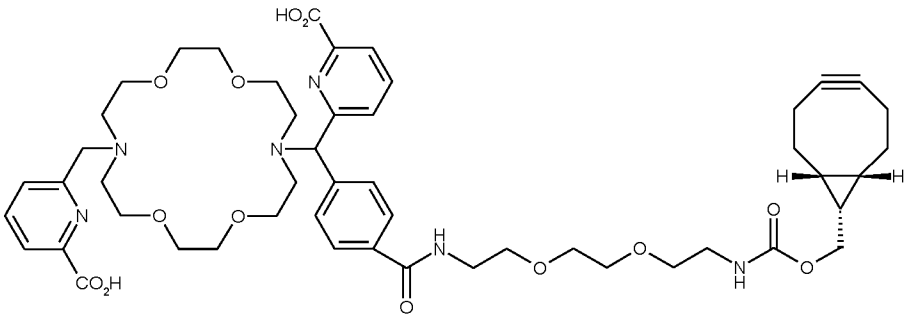
Приклади хелаторів цього винаходу включають, але не обмежуються ними:



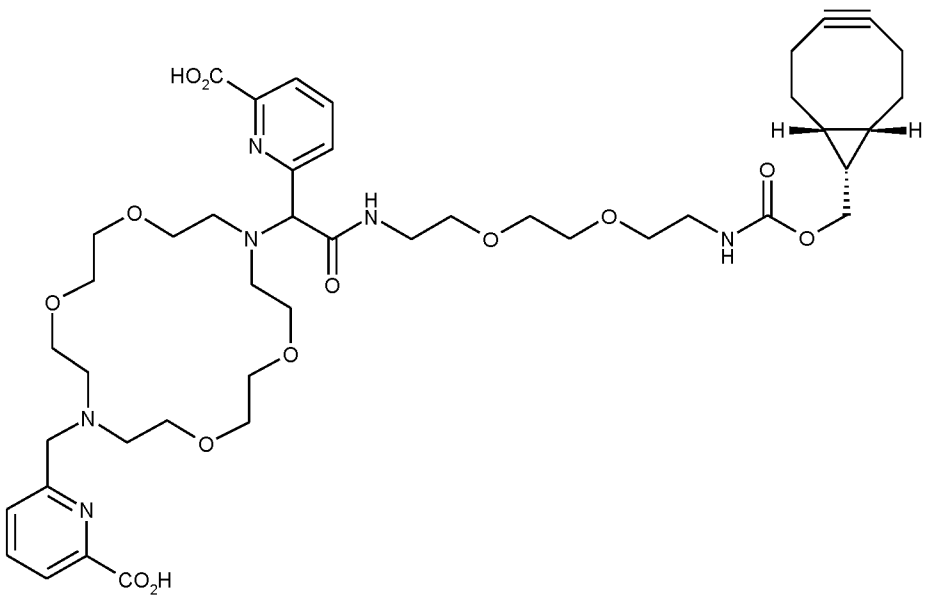
,



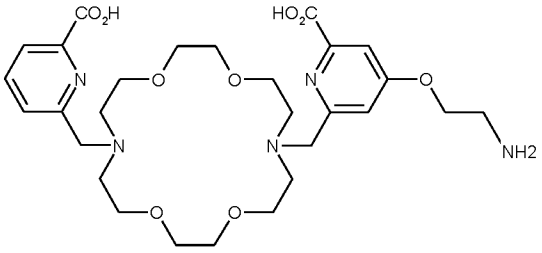
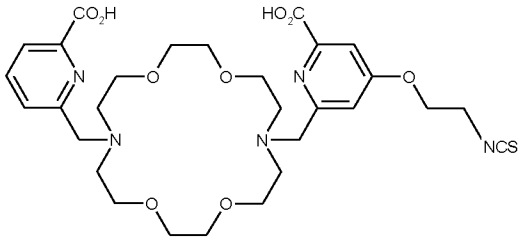
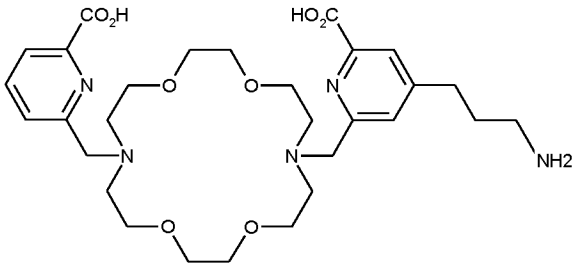
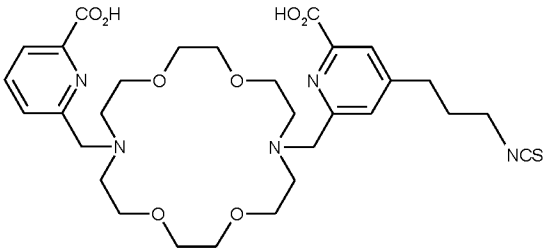
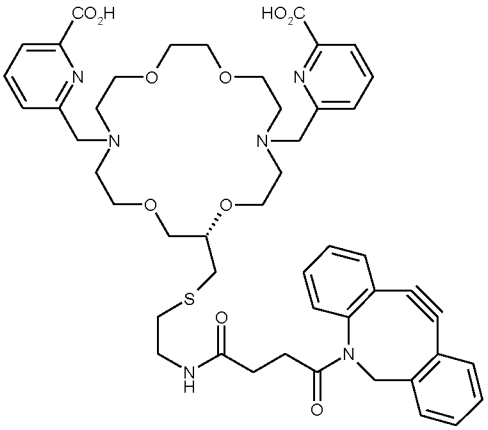
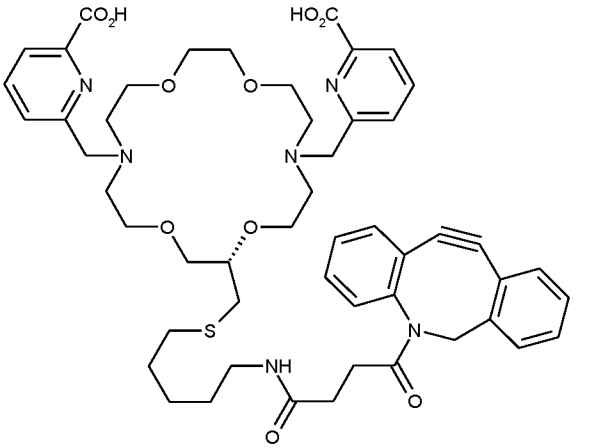
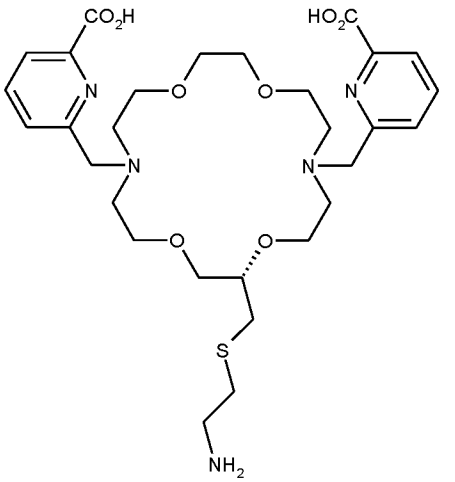
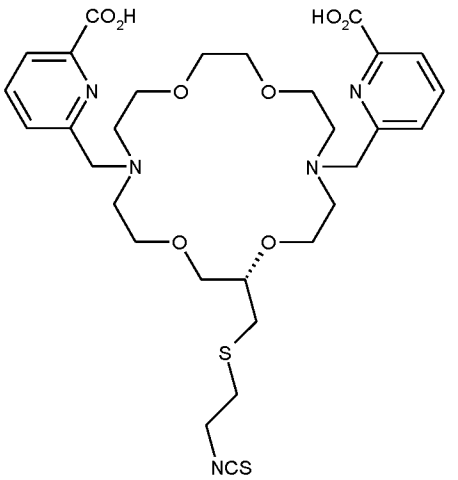
,

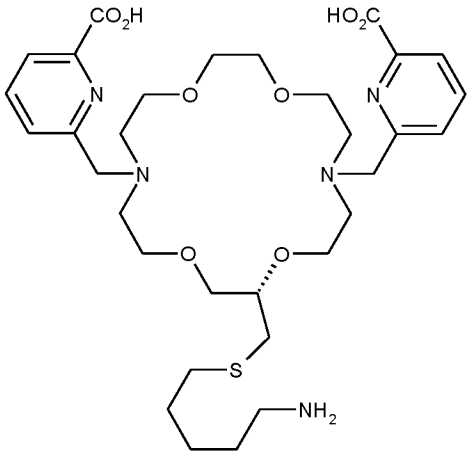


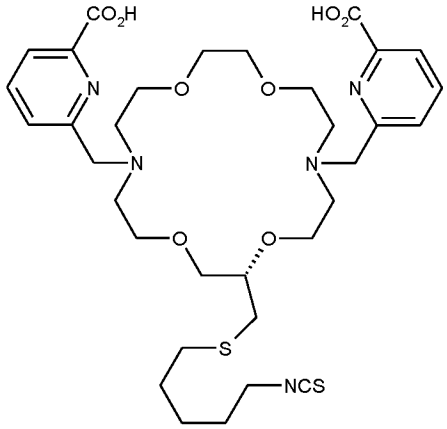
,

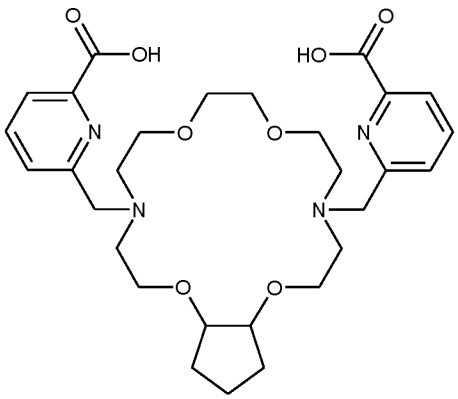


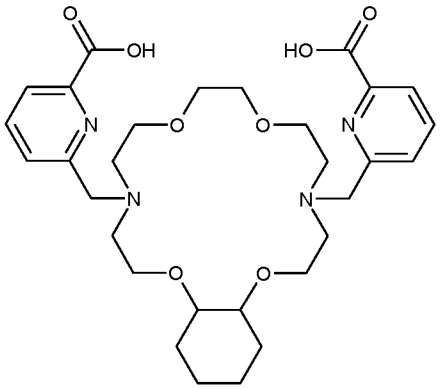
,


CO2H
HO2C
NH2
,

CO2H
HO2C
NCS
,

CO2H
HO2C
NH2
,

CO2H
HO2C
NCS
,

CO2H
HO2C
,

CO2H
HO2C
,

CO2H
HO2C
NH2
,

CO2H
HO2C
NCS
,



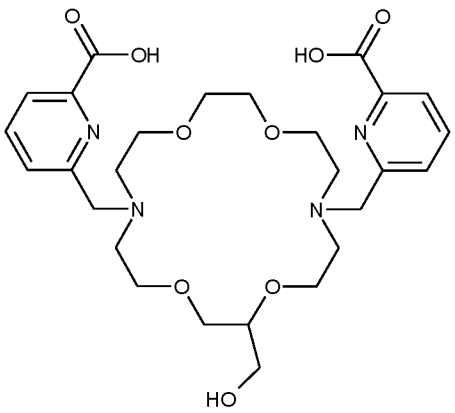
,


,


,


,

та



.

Такі хелатори можуть бути ковалентно приєднані до цільового ліганду (наприклад, до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента) для утворення імунокон'югатів або радіоімунокон'югатів шляхом взаємодії хелатора з міченим азидом лігандом націлювання з утворенням 1,2,3-триазолового лінкера через реакцію клік-хімії, як описано більш детально нижче.

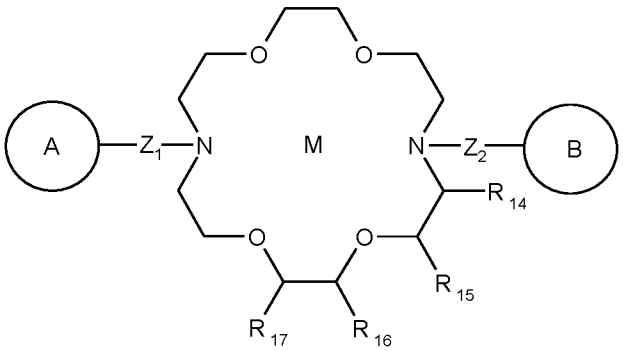
Хелатори винаходу можуть бути отримані будь-яким способом, відомим в цій галузі з огляду на цей опис. Наприклад, бокові ароматичні/гетероароматичні групи можуть бути приєднані до частини макроциклічного кільця за допомогою способів, відомих у цій галузі, наприклад, таких як наведені та описані нижче.

Радіометалеві комплекси

В іншому загальному аспекті винахід стосується комплексу радіометалу, що містить іон радіометалу, координований з хелатором винаходу за допомогою координатного зв'язку. Будь-який з хелаторів винаходу, описаних у цьому документі, може містити іон радіометалу. Переважно іон радіометалу є альфа-випромінюючим іоном радіометалу, більш переважно - ^{225}Ac. Хелатори винаходу можуть надійно хелатувати іони радіометалів, зокрема ^{225}Ac, при будь-якій питомій активності,

незалежно від домішок металів, утворюючи таким чином радіометалевий комплекс, який має високу стабільність хелатування in vivo та in vitro і який стійкий до впливу агентів, наприклад діетилентриамінпентаоцтової кислоти (DTPA).

Відповідно до варіантів здійснення винаходу радіометалевий комплекс має структуру формули (I-m):



де змінні групи є такими, як визначено вище в хелаторах винаходу, наприклад хелатор формули (I); і M являє собою іон радіометалу. Іон радіометалу M зв'язується з хелатором за допомогою координатного зв'язку, утворюючи радіометалевий комплекс. Гетероатоми макроциклічного кільця хелатора, а також будь-які функціональні групи бокових ланцюгів (наприклад, -Z_1-кільце A та/або -Z_2-кільце B) можуть брати участь у координатному зв'язуванні іона радіометалу.

Будь-який з описаних вище хелаторів формули (I) можна використовувати для утворення радіометалевих комплексів формули (I-m).

У певних варіантах здійснення іон радіометалу M є іоном радіометалу з альфа-випромінюванням. Переважно, альфа-випромінюючий іон радіометалу являє собою ^{225}Ac.

Відповідно до варіантів здійснення винаходу радіометалевий комплекс містить щонайменше одну групу X, де X являє собою -L_1-R_{11}, де L_1 відсутній або є лінкером, а R_{11} є електрофільним фрагментом або нуклеофільним фрагментом або R_{11} містить цільовий ліганд. Коли R_{11} являє собою нуклеофільний або електрофільний фрагмент, такий фрагмент можна використовувати для приєднання радіометалевого комплексу до ліганду націлювання прямо або опосередковано через лінкер.

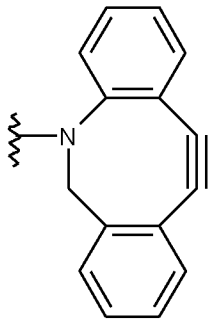
У певних варіантах здійснення радіометал містить одну групу X, і переважно L_1 групи X є лінкером.

У конкретних варіантах здійснення R_{11} являє собою -NH_2, -NCS (ізотіоціанат), -NCO (ізоціанат), -N_3 (азидо), алкініл, циклоалкініл, карбонову кислоту, естер, амідо, алкіламід, малеімідо, ацилгалогенід, тетразин або транс- циклооктен, зокрема, NCS, -NCO, -N_3, алкініл, циклоалкініл, -$C(O)R_{13}$, -$COOR_{13}$, -$CON(R_{13})_2$, малеімідо або ацилгалогенід (наприклад, -C(O)Cl або -C(O)Br), де кожен R_{13} незалежно є воднем або алкілом.

У деяких варіантах здійснення R_{11} являє собою алкінільну, циклоалкінільну або азидогрупу, що дозволяє приєднати хелатор до ліганду націлювання або іншого хімічного фрагмента (наприклад, лінкеру) за допомогою реакції клік-хімії.

У певних варіантах здійснення R_{11} являє собою алкінільну групу, більш переважно кінцеву алкінільну групу або циклоалкінільну групу, яка реагує з азидною групою, зокрема, за допомогою штамового азид-алкінового циклоприєднання (SPAAC). Приклади циклоалкінільних груп, які можуть реагувати з азидними групами через SPAAC, включають, але не обмежуються ними, циклооктиніл або похідні циклооктинілу, наприклад біциклононініл (BCN), дифторований циклооктиніл (DIFO), дибензоциклооктиніл (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктиніл (BARAC), дибензоазациклооктиніл (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктиніл (DIMAC), дифторбензоциклооктиніл (DIFBO), монобензоциклооктиніл (MOBO) і тетраметоксидибензоциклооктиніл (TMDIBO).

У конкретному варіанті здійснення R_{11} являє собою дибензоазациклооктиніл (DIBAC, DBCO, ADIBO), який має таку структуру:



У таких варіантах здійснення, в яких R_{11} являє собою DBCO, DBCO може бути ковалентно зв'язаним з радіометалевим комплексом прямо або опосередковано через лінкер і переважно приєднаним до радіометалевого комплексу опосередковано через лінкер.

В іншому конкретному варіанті здійснення R_{11} являє собою біциклононініл (BCN).

Відповідно до варіантів здійснення винаходу кожне з кільця A і кільця B незалежно являє собою 6-10-членний арил або 5-10-членний гетероарил. В альтернативних варіантах здійснення передбачається, що кожне з кільця A і кільця B необов'язково заміщене гетероциклільним кільцем, таким як оксазолін. Кожне з кільця A та кільця B може бути необов'язково та незалежно заміщене однією або більше групами замісників, незалежно вибраних із групи, що складається з галогену, алкілу, алкенілу, циклоалкілу, циклоалкенілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, $-OR_{13}$, $-SR_{13}$, $-(CH_2)_pCOOR_{13}$, $-OC(O)R_{13}$, $-N(R_{13})_2$, $-CON(R_{13})_2$, $-NO_2$, $-CN$-$OC(O)N(R_{13})_2$ та X. Приклади 6-10 членних арильних груп, придатних для цієї мети, включають, але не обмежуються ними, феніл і нафтил. Приклади 5-10-членних гетероарильних груп, придатних для цієї мети, включають, але не обмежуються ними, піридиніл, ізотіазоліл, ізоксазоліл та імідазоліл. Приклади відповідних замісників 5-10-членних гетероарильних і 6-10-членних арильних груп включають, але не обмежуються ними, -COOH, тетразоліл і $-CH_2COOH$.

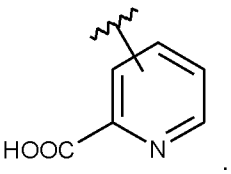
У певних варіантах здійснення кожне з кільця A і кільця B незалежно і необов'язково заміщене однією або більше карбоксильними групами, включно з, але не обмежуючись ними, -COOH і $-CH_2COOH$.

В одному варіанті здійснення кільце A і кільце B є однаковими, наприклад, і кільце A, і кільце B є піридинілом. В іншому варіанті кільце A і кільце B є різними, наприклад, одне з кільця A і кільця є піридинілом, а інше являє собою феніл.

У конкретному варіанті здійснення і кільце A, і кільце B є піридинілом, заміщеним -COOH.

У конкретному варіанті здійснення і кільце A, і кільце B є піридинілом, заміщеним тетразолілом.

В іншому конкретному варіанті здійснення і кільце A, і кільце B є групами піколінової кислоти, що мають наступну структуру:



.

Відповідно до варіантів здійснення винаходу кожен з Z_1 та Z_2 незалежно являє собою $-(C(R_{12})_2)_m-$ або $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$; кожний X незалежно являє собою $-L_1-R_{11}$; кожний n незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5; і кожний m незалежно дорівнює 1, 2, 3, 4 або 5.

У деяких варіантах здійснення і Z_1, і Z_2 являють собою $-(CH_2)_m-$, де кожен m переважно дорівнює 1. У таких варіантах здійснення атом вуглецю макроциклічного кільця, кільця A або кільця B заміщений групою X.

У деяких варіантах здійснення один з Z_1 та Z_2 являє собою $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$, а інший являє собою $-(CH_2)_m-$.

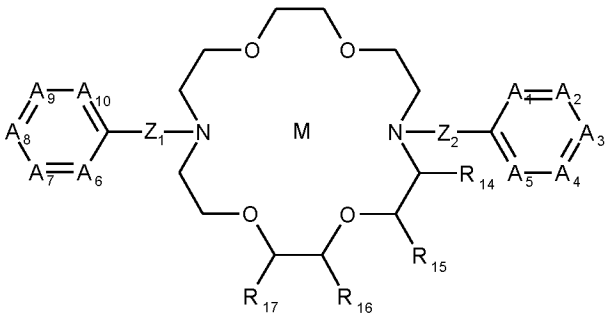
У деяких варіантах здійснення один з Z_1 та Z_2 є $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$, а інший являє собою $-(CH_2)_m-$; кожний n дорівнює 0; m дорівнює 1; X являє собою $-L_1-R_{11}$; і L_1 являє собою лінкер.

У деяких варіантах здійснення і Z_1, і Z_2 являють собою $(CH_2)_m-$; кожен m незалежно дорівнює 0, 1, 2, 3, 4 або 5, переважно кожен m дорівнює 1; і один з R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} являє собою X, а решта з R_{14}, R_{15}, R_{16} та R_{17} кожен є воднем.

У деяких варіантах здійснення R_{14} та R_{15} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця (наприклад, циклопентилу або циклогексилу). Таке 5- або 6-членне циклоалкільне кільце може бути заміщене групою X.

У деяких варіантах здійснення R_{16} та R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця (наприклад, циклопентилу або циклогексилу). Таке 5- або 6-членне циклоалкільне кільце може бути заміщене групою X.

У деяких варіантах здійснення радіометалевий комплекс має структуру формули (II-m):



(II-m)

де змінні групи є такими, як визначено вище в хелаторах винаходу, наприклад хелатор формули (II); та M являє собою радіометалевий іон, бажано альфа-випромінюючий радіометалевий іон, більш бажано - ^{225}Ac.

Будь-який з описаних вище хелаторів формули (II) можна використовувати для утворення радіометалевих комплексів формули (II-m).

У деяких варіантах здійснення один з A_1, A_2, A_3, A_4 та A_5 являє собою азот, один з A_1, A_2, A_3, A_4 та A_5 є вуглецем, заміщеним -COOH, і решта являє собою CH, тобто утворюють піридинільне кільце, заміщене карбоновою кислотою.

У деяких варіантах здійснення один з A_6, A_7, A_8, A_9 та A_{10} є азотом, один з A_6, A_7, A_8, A_9 та A_{10} є вуглецем, заміщеним -COOH, і решта являє собою CH, тобто утворюють піридинільне кільце, заміщене карбоновою кислотою.

В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 являє собою -COOH. В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою -COOH. В іншому варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 являє собою -COOH; і щонайменше один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} являє собою -COOH.

У деяких варіантах здійснення кожен з A_1 і A_{10} являє собою азот; A_2 являє собою CR_2, і R_2 являє собою -COOH;

A_9 являє собою CR_9, і R_9 являє собою -COOH; кожен з A_3-A_8 являє собою CR_2, CR_3, CR_4, CR_5, CR_6, CR_7 і CR_8 відповідно; і кожен з R_3 до R_8 є воднем.

В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 є тетразолілом. В одному варіанті здійснення щонайменше один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} є тетразолілом. В іншому варіанті здійснення щонайменше один з R_1, R_2, R_3, R_4 і R_5 є тетразолілом; і хоча б один з R_6, R_7, R_8, R_9 і R_{10} є тетразолілом.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{12} являє собою водень.

У деяких варіантах здійснення R_{11} являє собою алкінільну групу або циклоалкінільну групу, переважно циклооктиніл або похідні циклооктинілу, наприклад DBCO.

У конкретних варіантах здійснення радіометалевого комплексу формули (II-m):

M являє собою ^{225}AC;

кожен з A_1 і A_{10} є азотом;

A_2 являє собою CR_2, і R_2 являє собою -COOH;

A_9 являє собою CR_9, і R_9 являє собою -COOH;

кожен з A_3-A_8 являє собою CR_2, CR_3, CR_4, CR_5, CR_6, CR_7 і CR_8 відповідно;

кожен з R_3 до R_8 є воднем;

один з Z_1 і Z_2 являє собою $-(CH_2)_m-$, а інший з Z_1 і Z_2 являє собою $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

R_{12} являє собою водень;

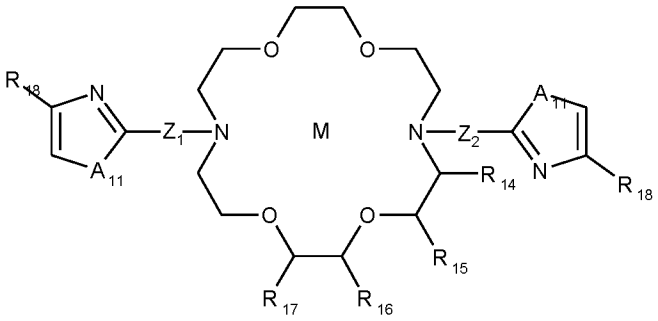
m дорівнює 1;

кожний n дорівнює 0;

X являє собою $-L_1-R_{11}$, де L_1 являє собою лінкер і $-R_{11}$ являє собою електрофільну групу, наприклад циклооктиніл або циклооктинільну похідну, наприклад DBCO; і

кожен з R_{14}-R_{17} є воднем, або альтернативно R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця.

У певних варіантах здійснення радіометалевий комплекс має структуру формули (III-m):



(III-m)

де змінні групи є такими, як визначено вище в хелаторах винаходу, наприклад хелатор формули (III); та M являє собою радіометалевий іон, бажано альфа-випромінюючий радіометалевий іон, більш бажано - ^{225}Ac.

Будь-який з описаних вище хелаторів формули (III) можна використовувати для утворення радіометалевих комплексів формули (III-m).

У деяких варіантах здійснення кожен A_{11} є однаковим, і кожен A_{11} являє собою O, S, NMe або NH. Наприклад, кожен A_{11} може бути S. В інших варіантах здійснення кожен A_{11} відрізняється, а також кожен незалежно вибирається з O, S, NMe та NH.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} незалежно являє собою $-(CH_2)_p-COOR_{13}$, де R_{13} являє собою водень і кожен p незалежно дорівнює 0 або 1.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} являє собою -COOH.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} являє собою $-CH_2COOH$.

У деяких варіантах здійснення кожен R_{18} являє собою тетразоліл.

У конкретних варіантах здійснення радіометалевого комплексу формули (III-m):

кожен R_{18} являє собою COOH;

один з Z_1 і Z_2 являє собою $-(CH_2)_m-$, а інший з Z_1 і Z_2 являє собою $-(CH_2)_n-C(R_{12})(X)-(CH_2)_n-$;

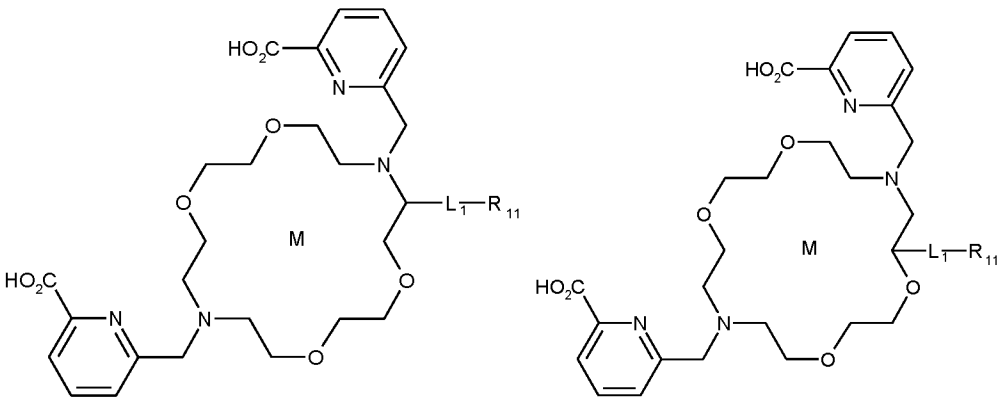
R_{12} являє собою водень;

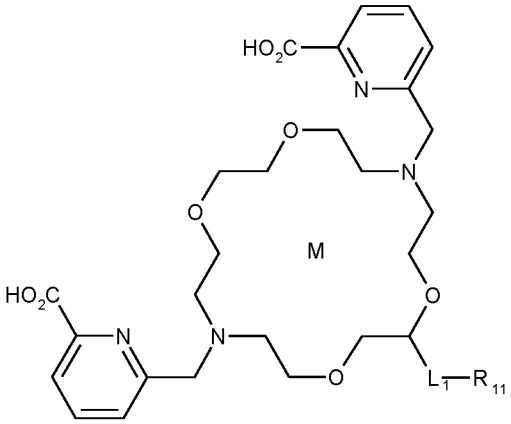
m дорівнює 1;кожний n дорівнює 0;

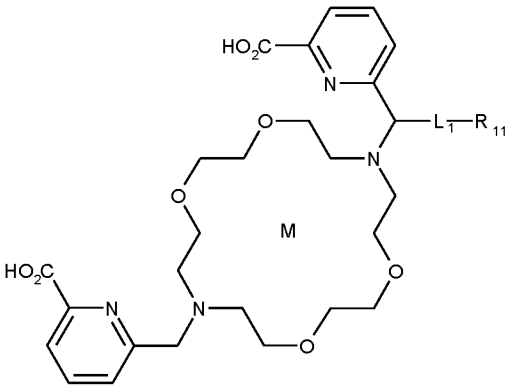
X являє собою $-L_1-R_{11}$, де L_1 являє собою лінкер і $-R_{11}$ являє собою електрофільну групу, наприклад циклооктиніл або циклооктинільну похідну, наприклад DBCO; і

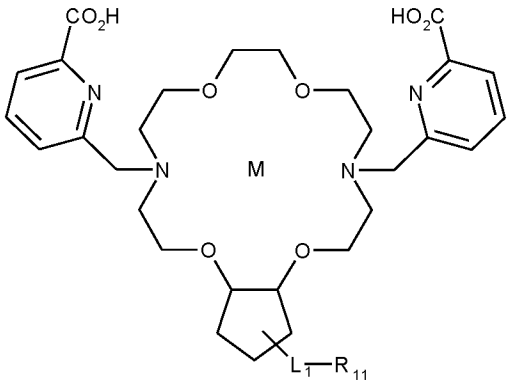
кожен з R_{14}-R_{17} є воднем, або альтернативно R_{16} і R_{17} взяті разом з атомами вуглецю, до яких вони приєднані, для утворення 5- або 6-членного циклоалкільного кільця.

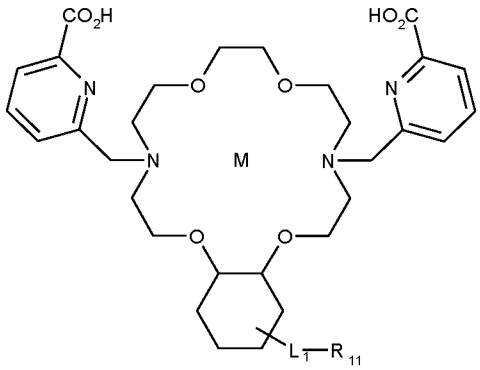
У конкретних варіантах здійснення винаходу радіометалевий комплекс має одну з наступних структур:

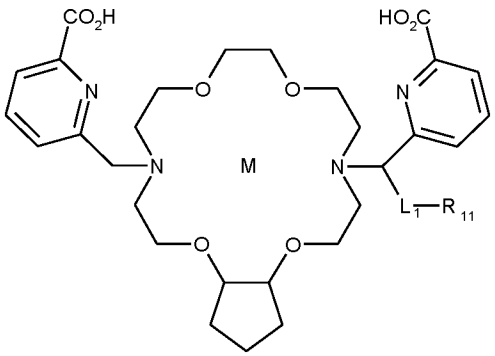


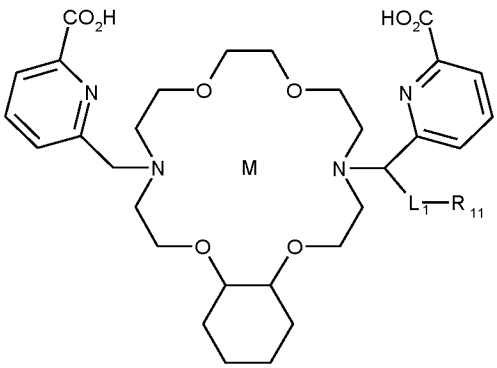


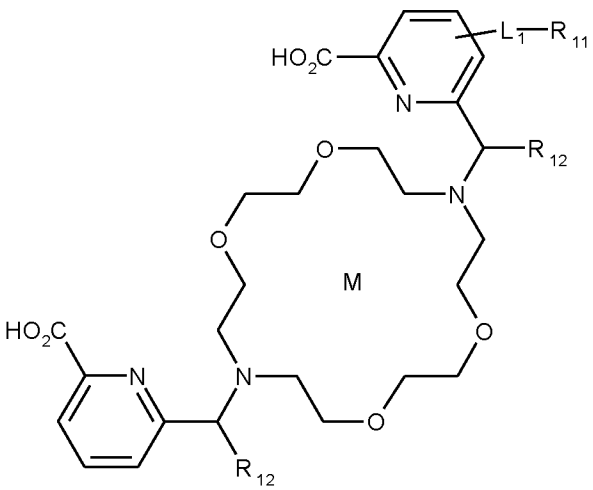












де:
M являє собою Актиній-225 (^{225}Ac), L_1 відсутній або являє собою лінкер;

R_{11} являє собою нуклеофільний фрагмент або електрофільний фрагмент, або R_{11} містить ліганд націлювання; і

кожен R_{12} незалежно є воднем, $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$, за умови, що щонайменше один R_{12} являє собою $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$.

Радіометалеві клмплекси можна отримувати будь-яким способом, відомим фахівцям з огляду на даний винахід. Наприклад, хелатор винаходу можна змішати з іоном радіометалу та інкубувати суміш для утворення радіометалевого комплексу. У типовому варіанті здійснення хелатор змішують з розчином $^{225}Ac(NO_3)_3$ для утворення радіокомплексу, що містить ^{225}Ac, зв'язаний з хелатором за допомогою координатного зв'язку. Як описано вище, хелатори винаходу ефективно хелатують радіометали, зокрема ^{225}Ac. Таким чином, у конкретних варіантах здійснення, хелатор винаходу змішують з розчином іона ^{225}Ac у співвідношенні концентрації хелатора до іона ^{225}Ac 1:1000, 1:500, 1:400, 1:300, 1:200, 1:100, 1:50, 1:10 або 1:5, переважно від 1:5 до 1:200, більш переважно від 1:5 до 1:100. Таким чином, у деяких варіантах втілення співвідношення хелатора винаходу до ^{225}Ac, яке можна використовувати для утворення комплексу радіометалу, набагато нижче, ніж те, яке можна досягти за допомогою інших відомих хелаторів ^{225}Ac, наприклад DOTA. Радіокомплекс можна охарактеризувати за допомогою миттєвої тонкошарової хроматографії (наприклад, iTLC-SG), ВЕРХ, РХ-МС тощо. Типові методи описано в цьому документі, наприклад, у прикладах нижче.

Імунокон'югати та радіоімунокон'югати

В іншому загальному аспекті винахід стосується імунокон'югатів і радіоімунокон'югатів. Хелатори та радіометалеві комплекси винаходу можуть бути кон'юговані (тобто ковалентно зв'язані) з лігандами націлювання, такими як імунна речовина, для отримання імунокон'югатів та/або радіоімунокон'югатів, які придатні, наприклад, для медичних застосувань у суб'єктів, наприклад людей, таких як цільова променева терапія. Використовуючи хелатори та радіометалеві комплекси винаходу, ліганди націлювання, зокрема антитіла або їхні антигензв'язувальні фрагменти, які можуть специфічно зв'язуватися з мішенями, що представляють інтерес (такими як ракові клітини), можуть бути сайт-специфічно мічені іонами радіометалів для отримання радіоімунокон'югатів. Зокрема, використовуючи хелатори та/або комплекси радіометалів згідно з винаходом, можна отримати радіоімунокон'югати, які мають високий вихід хелатування іонів радіометалів, зокрема ^{225}Ac, і бажане співвідношення хелатор-антитіло (CAR). Відповідно до конкретних варіантів здійснення способи цього винаходу забезпечують середнє значення CAR менше ніж 10, менше ніж 8, менше ніж 6 або менше ніж 4; або CAR від приблизно 2 до приблизно 8, або від приблизно 2 до приблизно 6, або від приблизно 2 до приблизно 4, або від приблизно 2 до приблизно 3; або CAR приблизно 2, або приблизно 3, або приблизно 4, або приблизно 5, або приблизно 6, або приблизно 7, або приблизно 8.

У контексті цього документа "імунокон'югат" - це антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент, кон'югований (наприклад, зв'язаний за допомогою ковалентного зв'язку) з другою молекулою, такою як токсин, лікарський засіб, іон радіометалу, хелатор, радіометалевий комплекс тощо. "Радіоімунокон'югат", зокрема, є імунокон'югатом, в якому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент мічений радіометалом або кон'югований з радіометалевим комплексом.

Відповідно до варіантів здійснення винаходу імунокон'югат містить хелатор винаходу, наприклад хелатор формули (I), формули (II) або формули (III), як описано в цьому документі, ковалентно зв'язаний з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, бажано через лінкер. Залежно від реакційноздатних функціональних груп (тобто нуклеофілів та електрофілів) на хелаторі та антитілі чи його антигензв'язувальному фрагменті можливі численні способи приєднання з різними зв'язками між хелатором та антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

Відповідно до варіантів здійснення винаходу радіоімунокон'югат містить радіометалевий комплекс винаходу, наприклад радіометалевий комплекс формули (I-m), формули (II-m) або формули (III-m), як описано в цьому документі, ковалентно зв'язаний з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, бажано через лінкер.

Будь-який з хелаторів або радіометалевих комплексів винаходу, такі як описані в цьому документі, можна використовувати для отримання імунокон'югатів або радіоімунокон'югатів винаходу.

У деяких варіантах здійснення радіометалевий комплекс радіоімунокон'югату за даним винаходом містить альфа-випромінюючий іон радіометалу, координований з хелаторним фрагментом радіокомплексу. Переважно альфа-випромінюючим іоном радіометалу є ^{225}Ac.

У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент пов'язують із радіокомплексом через триазоловий фрагмент для утворення радіоімунокон'югату винаходу.

У конкретних варіантах здійснення антитіло або антигензв'язувальний фрагмент в імунокон'югаті або радіоімунокон'югаті ззгідно заявки може специфічно зв'язуватися з антигеном пухлини. Переважно антитіло або антигензв'язувальний фрагмент специфічно зв'язується з антигеном раку. Приклади ракових антигенів включають, але не обмежуються ними, простатоспецифічний мембранний антиген (PSMA), BCMA, Her2, EGFR, KLK2, CD19, CD22, CD30, CD33, CD79b і Нектин-4.

В одному варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з PSMA. Переважно антитіло являє собою PSMB127. Антитіло IgG4 людини, яке зв'язується з антигеном, специфічним для мембран передміхурової залози людини (PSMA), яке в цьому документі називається "анти-PSMA mAb" із позначенням "PSMB127", має послідовність CDR1 важкого ланцюга (HC) із SEQ ID NO: 3, послідовність CDR2 HC із SEQ ID NO: 4, послідовність CDR3 HC із SEQ ID NO: 5, послідовність CDR1 легкого ланцюга (LC) із SEQ ID NO: 6, послідовність CDR2 LC із SEQ ID NO: 7, і послідовність CDR3 LC із SEQ ID NO: 8 і має послідовність HC із SEQ ID NO: 9 і послідовність LC із SEQ ID NO: 10. Анти-PSMA mAb експресували й очищували за допомогою стандартних хроматографічних методів. Антитіло PSMB127, його біологічна активність, використання або інша пов'язана з ним інформація описані, наприклад, у публікації заявки на патент США № US 20200024360A1, зміст якої включено в цей документ у повному обсязі шляхом посилання.

В іншому варіанті здійснення антитіло специфічно зв'язується з калікреїном-2 людини (KLK2). Переважно антитіло являє собою H11B6. Антитіло H11B6, біологічна активність, використання або інша пов'язана інформація про нього описані в патенті США № 10,100,125, зміст якого включено в цей документ у повному обсязі шляхом посилання. У контексті цього документа поліпептид антитіла H11B6 містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HC), що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 11, і SEQ ID NO: 12, і SEQ ID NO: 13 і варіабельну ділянку легкого ланцюга (LC), що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 14, і SEQ ID NO: 15, і SEQ ID NO: 16. Антитіло H11B6 може додатково мати варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, або мати константну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19, і константну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20, або мати важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22.

Комерційні антитіла трастузумаб (Herceptin), цетуксимаб (Erbitux), пертузумаб (Perjeta) і панітумумаб (Vectibix) були придбані у компаній Roche, Lilly, Roche та Amgen відповідно. Трастузумаб і пертузумаб зв'язуються з Her2 людини. Цетуксимаб і панітумумаб зв'язуються з EGFR людини.

Імунокон'югати та радіоімунокон'югати згідно з цим винаходом можуть бути отримані у будь-який спосіб, відомий фахівцям в цій галузі з огляду на цей винахід, для кон'югування лігандів, наприклад антитіл, до хелаторів, включно з хімічними та/або ферментативними способами. Наприклад, імунокон'югати та радіоімунокон'югати можуть бути отримані в ході реакції сполучення, включно з, але не обмежуючись, утворенням естерів, тіоестерів або амідів із активованих кислот або ацилгалогенідів; реакцій нуклеофільного заміщення (наприклад, таких як нуклеофільне заміщення галогенідного кільця або розкриття кільця напруженої кільцевої системи); циклоприєднання Хюзгена азиду-алкіну (наприклад, 1,3-диполярне циклоприєднання між азидом і алкіном з утворенням 1,2,3-триазолового лінкера); приєднання тіоліну; утворення іміну; реакції Дільса-Альдера між тетразинами і трансциклоктеном (TCO); і приєднання Міхаеля (наприклад, приєднання малеїміду). Залежно від використовуваної реакційноздатної функціональної групи можливі численні інші способи приєднання з різними зв'язками. Приєднання ліганду може бути здійснено на хелаторі, який координований з іоном радіометалу, або на хелаторі, який не координований з іоном радіометалу.

Відповідно до варіанту здійснення радіоімунокон'югат може бути отриманий шляхом ковалентного зв'язування радіометалевого комплексу за винаходом з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, наприклад, за допомогою реакції клік-хімії (див., наприклад, Фіг. 2B і 2D, іменовано як "клік-радіомічення"). Альтернативно радіоімунокон'югат може бути отриманий шляхом спочатку приготування імунокон'югату за винаходом шляхом ковалентного зв'язування хелатора винаходу з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом за допомогою, наприклад, реакції клік-хімії; імунокон'югат згодом може бути мічений іоном радіометалу для отримання радіоімунокон'югату (див., наприклад, Фіг. 2A і 2C, іменовано як "одноетапне пряме радіомічення"). Для отримання імунокон'югату і радіоімунокон'югатів за винаходом можна використовувати як залишок-специфічні (наприклад, Фіг. 2A і 2B), так і сайт-специфічні (наприклад, Фіг. 2C і 2D) методи кон'югації.

Залишок-специфічні методи кон'югації з білками добре відомі і найчастіше включають або бічні ланцюги лізину з використанням активованого естеру або ізотіоціанату, або бічні ланцюги цистеїну з малеімідом, галогенацетиловими похідними або активованим дисульфідом (Brinkley Bioconjugate Chem 1992:2). Оскільки більшість білків мають кілька залишків лізину та цистеїну, за допомогою таких методів зазвичай отримують гетерогенні суміші продукту з різною кількістю кон'югованих молекул у різних положеннях амінокислот. Були створені додаткові методи, включно з тирозин-специфічною кон'югацією (Ban et al. Bioconjugate Chemistry 2013:520), метіонін-специфічними методами (Lin et al. Science 2017 (355) 597), додатковими підходами, орієнтованими на цистеїн (Toda et al. Angew Chemie 2013:12592) та іншими.

Зовсім недавно для моноклональних антитіл та інших білків були створені сайт-селективні та сайт-специфічні методи кон'югації (Agarwal, P. and CR Bertozzi, Bioconjug Chem, 2015. 26(2): p. 176-92; Rabuka et al. Curr Opin Chem Biol 2010:790). До них відноситься включення неприродних амінокислот;

злиття білка, що представляє інтерес, з "самоміченою міткою", такою як SNAP або DHFR, або міткою, яка розпізнається та модифікується специфічно іншим ферментом, таким як сортаза A, лігаза ліпоєвої кислоти та фермент, що утворює формілгліцин; ферментативна модифікація глікану для забезпечення кон'югації корисних навантажень, що представляють інтерес (Hu et al. Chem Soc Rev 2016:1691); використання мікробної трансглутамінази для селективного розпізнавання визначених позицій на антитілі; та додаткові методи, що використовують молекулярне розпізнавання та/або хімічні підходи для впливу на селективну кон'югацію (Yamada et al. 2019:5592; Park et al. Bioconjugate Chem 2018:3240; Pham et al. Chembiochem 2018:799).

У деяких варіантах здійснення імунокон'югат або радіоімунокон'югат за винаходом отримують з використанням методів специфічних для залишків для кон'югації хелатора винаходу з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом. Такі специфічні для залишків методи зазвичай призводять до утворення імунокон'югату або радіоімунокон'югату, ковалентно зв'язаного з хелатором або радіометалевим комплексом у різних положеннях антитіла. Можна використовувати будь-який специфічний для залишків спосіб утворення кон'югатів білків або антитіл, відомий фахівцям у цій галузі з огляду на цей винахід. Приклади специфічних для залишків методів кон'югації, які можна використовувати, включають, але не обмежуються, кон'югацію хелатора або комплексу радіометалу із залишками лізину антитіла з використанням хелатора або радіометалевого комплексу, що містить, наприклад, активований естер або ізотіоціанатну групу; кон'югацію із залишками цистеїну антитіла з використанням комплексу хелатора або радіометалу, що містить, наприклад, малеімід, галогенацетильне похідне, ацилгалогенід, активовану дисульфідну групу або метилсульфонілфенілоксадіазольну групу; кон'югацію з тирозиновими залишками антитіла з використанням комплексу хелатора або радіометалу, що містить, наприклад, 4-феніл-3H-1,2,4-триазолін-3,5(4H)-діони (PTAD); і кон'югацію із метіоніновими залишками антитіла з використанням хелаторного або радіометалевого комплексу, що містить, наприклад, похідне оксазиридину. Також можна позначити антитіло за певним залишком біортогональною реакційноздатною функціональною групою, використовуючи один або більше описаних вище способів перед кон'югацією з хелатором або радіометалевим комплексом винаходу. Наприклад, залишки тирозину можуть бути специфічно мічені біортогональною реакційноздатною функціональною групою з використанням похідного оксазиридину, пов'язаного з біортогональною реакційноздатною функціональною групою, такою як азидо, алкініл або циклоалкініл, а потім антитіло, що містить мічені залишки тирозину, можна кон'югувати до хелатора або радіометалічного комплексу за винаходом з використанням хелатора або радіометалевого комплексу, що містить сумісну реакційноздатну функціональну групу.

У деяких варіантах здійснення імунокон'югат або радіоімунокон'югат за винаходом отримують з використанням сайт-специфічних або сайт-селективних методів для кон'югації хелатора винаходу з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом. На відміну від методів, специфічних для залишків, "сайт-специфічні" або "сайт-селективні" методи зазвичай призводять до утворення імунокон'югату або радіоімунокон'югату, ковалентно зв'язаного з хелатором або радіометалевим комплексом у визначеному положенні антитіла. Можна використовувати будь-який сайт-специфічний спосіб утворення кон'югатів білків або антитіл, відомий фахівцям у цій галузі з огляду на цей винахід. Наприклад, неприродна амінокислота (наприклад, азидо- або алкініл-амінокислота) може бути специфічно включена до антитіла за допомогою мутантної аміноацил т-РНК-синтетази, яка може селективно аміноацилювати свою тРНК неприродною амінокислотою, що представляє інтерес. Мутантну ацильовану тРНК разом із амбер-супресорною тРНК можна потім використовувати для специфічного включення неприродної амінокислоти в білок у відповідь на амбер-нонсенс-кодон. Антитіло, яке сайт-специфічно мічене одним або більше з вищеописаних способів, згодом може бути кон'юговане з хелатором або радіометалевим комплексом винаходу, що містить сумісну реакційноздатну функціональну групу.

Відповідно до варіантів здійснення винаходу спосіб отримання радіоімунокон'югату включає реакцію хелатора або радіокомплексу за винаходом, де R_{11} являє собою нуклеофільний або електрофільний фрагмент, з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом або модифікованим антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, що містить нуклеофільний або електрофільний фрагмент.

В одному варіанті здійснення спосіб включає взаємодію хелатора винаходу з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом або модифікованим антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, що містить нуклеофільну або електрофільну функціональну групу, з утворенням імунокон'югату, що має ковалентний зв'язок між хелатором і антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом або модифікованим антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, і взаємодію імунокон'югату з іоном радіометалу таким чином, що іон радіометалу зв'язує хелатор імунокон'югату через координатне зв'язування, утворюючи таким чином радіоімунокон'югат. Цей варіант здійснення можна назвати методом "одноетапного прямого радіомічення" (наприклад, як схематично показано на Фіг. 2C), оскільки існує лише одна стадія хімічної реакції, що включає радіометал.

В іншому варіанті здійснення спосіб включає реакцію радіокомплексу за винаходом з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом або модифікованим антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, що містить нуклеофільну або електрофільну функціональну групу, утворюючи таким чином радіоімунокон'югат. Цей варіант здійснення може називатися методом "клік-радіомічення" (наприклад, як схематично показано на Фіг. 2D). Модифіковане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент можна отримати будь-яким способом, відомим у цій галузі з огляду на цей винахід, наприклад, міченням антитіла на певному залишку біортогональною реакційноздатною функціональною групою за допомогою одного або кількох вищеописаних методів або шляхом сайт-специфічного включення неприродної амінокислоти (наприклад, азидо- або алкініл-амінокислоти) в антитіло за допомогою одного або кількох вищеописаних методів. Ступінь мічення (DOL), який іноді називають ступенем заміни (DOS), є особливо корисним параметром для характеристики та оптимізації біокон'югатів, таких як антитіла, модифіковані неприродною амінокислотою. Він виражається як середня кількість неприродної амінокислоти, зв'язаної з білковою молекулою (наприклад, антитілом), або як молярне співвідношення у вигляді мітка/білок. DOL можна визначити за спектром поглинання міченого антитіла будь-яким відомим способом у цій галузі.

У певних варіантах здійснення, як описано у цьому документі, імунокон'югати та радіоімунокон'югати за винаходом отримують з використанням реакції клік-хімії. Наприклад, радіоімунокон'югати за винаходом можуть бути отримані з використанням реакції клік-хімії, яку називають "клік-радіомічення" (див., наприклад, Фіг. 2B і 2D). Клік-радіомічення використовує партнерів реакції клік-хімії, переважно азид та алкін (наприклад, циклооктин або похідне циклооктину) для утворення ковалентного триазольного зв'язку між радіокомплексом (іон радіометалу, зв'язаний із хелатором) та його антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом. Методи радіоактивного мічення антитіл описані, наприклад, у міжнародній заявці на патент № PCT/US18/65913 під назвою "Radiolabeling of Polypeptides", відповідний опис якої включено у цей документ шляхом посилання. В інших варіантах здійснення, які називаються "одноетапним прямим радіоактивним міченням", імунокон'югат готують з використанням хімічної клік-реакції між антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом і хелатором; імунокон'югат потім контактує з іоном радіометалу з утворенням радіоімунокон'югату (див., наприклад, Фіг. 2A і 2C).

Згідно з варіантом здійснення спосіб отримання радіоімунокон'югату включає зв'язування іона радіометалу з хелатором винаходу (наприклад, за допомогою координатного зв'язку).

Варіант здійснення способу "одноетапного прямого радіоактивного мічення" може бути описаний як спосіб отримання радіоімунокон'югату, що включає: контактування імунокон'югату (тобто комплексу поліпептид-хелатор) з іоном радіометалу з утворенням радіоімунокон'югату, де імунокон'югат містить хелатор за цим винаходом. Відповідно до конкретних варіантів здійснення імунокон'югат був утворений за допомогою реакції клік-хімії між хелатором цього винаходу та поліпептидом. Відповідно до конкретних варіантів здійснення радіоімунокон'югат був утворений без умов відсутності металу (наприклад, без будь-якої стадії (-ій) видалення або активного виключення звичайних металевих домішок з реакційної суміші). Це суперечить деяким звичайним методам, за яких необхідно мітити радіоактивне антитіло в суворих умовах відсутності металів, щоб уникнути конкурентного (непродуктивного) хелатування звичайних металів, таких як залізо, цинк і мідь, що створює значні проблеми у виробничому процесі.

У конкретному варіанті реалізації спосіб одержання радіоімунокон'югату за винаходом включає метод "одноетапного прямого радіомічення", який включає:

(i) забезпечення модифікованого поліпептиду, що містить поліпептид (наприклад, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент), ковалентно зв'язаний з першим партнером клік-реакції (наприклад, азидогрупою);

(ii) забезпечення хелаторного комплексу, що містить хелатор за цим винаходом, ковалентно зв'язаний з другим партнером клік-реакції (наприклад, алкінільною групою або циклоалкінільною групою);

(iii) контактування модифікованого поліпептиду з хелаторним комплексом в умовах, які дозволяють першому партнеру клік-реакції (наприклад, азидогрупі) реагувати з другим партнером клік-реакції (наприклад, алкінільною групою або циклоалкінільною групою) з утворенням таким чином комплексу поліпептид-хелатор (тобто імунокон'югату); і

(iv) контактування комплексу поліпептид-хелатор з іоном радіометалу для отримання таким чином радіоімунокон'югату (де радіоімунокон'югат містить поліпептид, мічений іоном радіометалу, наприклад модифіковане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, мічений альфа-випромінюючим іоном радіометалу, зв'язаним з іоном радіометалу через координатне зв'язування).

Відповідно до конкретних варіантів здійснення стадію (iv) виконують без умов відсутності металу.

В альтернативному варіанті здійснення спосіб отримання радіоімунокон'югату включає метод "клік-радіомічення" (наприклад, як показано на Фіг. 2D), що включає:

(i) забезпечення модифікованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, ковалентно зв'язаний з азидогрупою;

(ii) забезпечення радіокомплексу, що містить альфа-випромінюючий іон радіометалу, зв'язаний з хелатором за допомогою координатного зв'язку, де хелатор ковалентно зв'язаний з алкінільною групою або циклоалкінільною групою; і

(iii) контактування модифікованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента з радіокомплексом в умовах, які дозволяють азидогрупі реагувати з алкінільною групою або циклоалкінільною групою для отримання радіоімунокон'югату.

У винаході можуть бути використані умови проведення хімічні клік-реакції, відомі в цій галузі, і будь-які умови проведення хімічних клік-реакцій, відомі фахівцям у цій галузі з огляду цього винаходу. Приклади умов включають, серед іншого, інкубацію модифікованого поліпептиду та радіоактивного комплексу у співвідношенні від 1:1 до 1000:1 при pH від 4 до 10 та температурі від 20 °C до 70 °C.

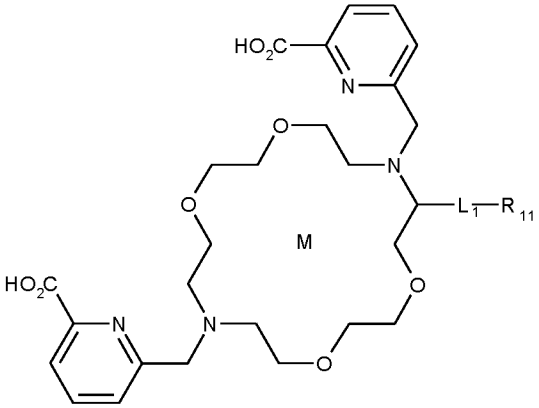
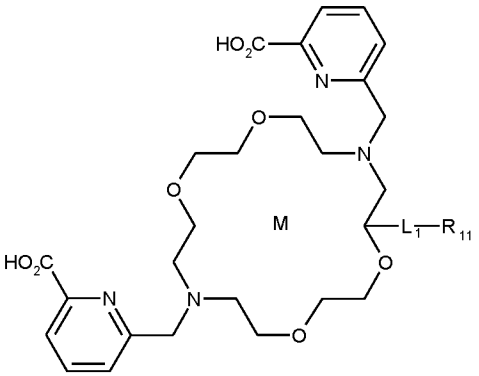
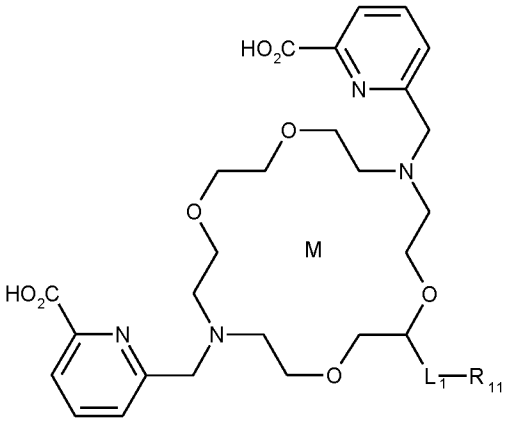
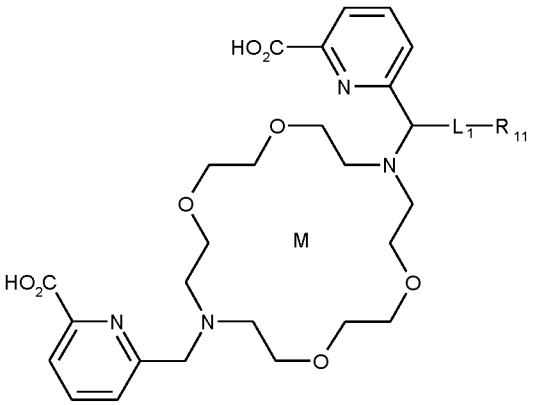
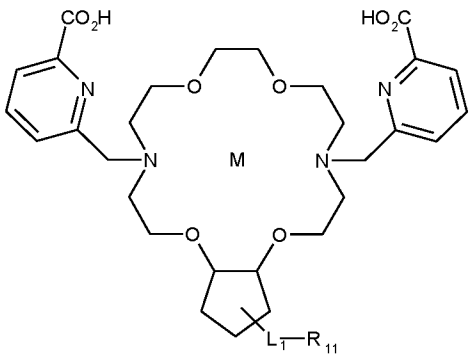
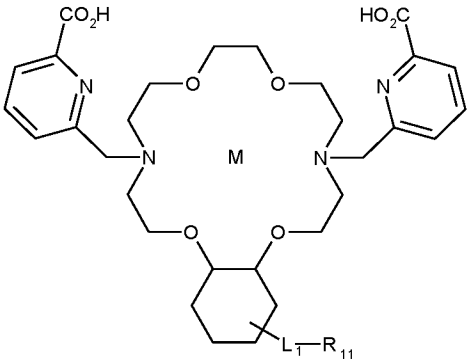
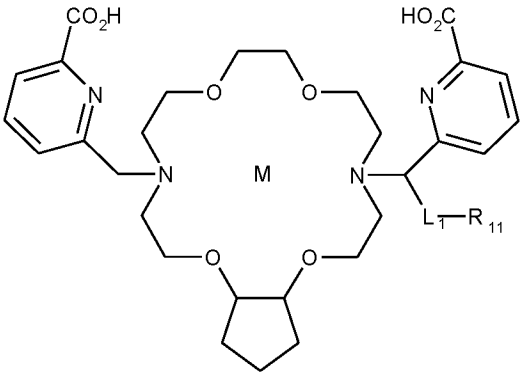
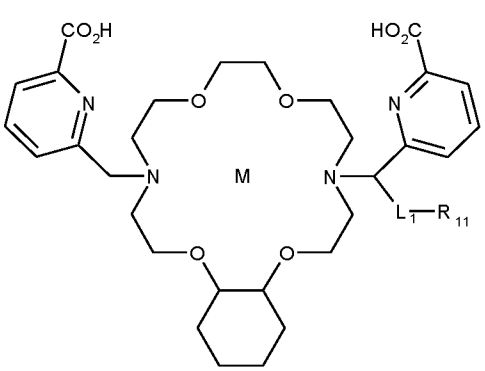
Методи радіоактивного мічення, описані вище, дозволяють хелатувати іон радіометалу в умовах низького або високого pH та/або високої температури для максимізації ефективності, що може бути досягнуто без ризику інактивації партнера по реакції алкіну. Ефективне хелатування та ефективна реакція SPAAC між міченим азидом антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом і радіокомплексом дозволяє отримувати радіоімунокон'югати з високим радіохімічним виходом навіть за низького співвідношення азид: антитіло. Єдиним етапом, на якому слід виключити сліди металів, є хелатування іонів радіометалу до хелатуючої частини; стадії виробництва, очищення та кон'югації антитіл не потрібно проводити в умовах, що не містять металів.

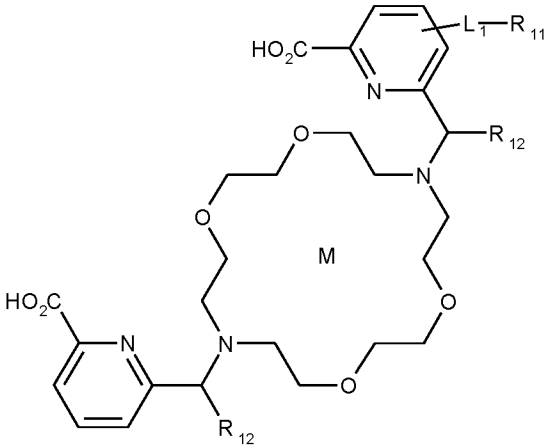
Хелатори та комплекси радіометалів згідно з винаходом також можуть бути використані для отримання сайт-специфічних радіомічених поліпептидів, наприклад, антитіл. Методи радіомічення, описані тут, полегшують сайт-специфічне виробництво радіоімунокон'югатів, використовуючи переваги встановлених методів сайт-специфічного приєднання азидних груп на антитіла (Li, X., et al. Preparation of well-defined antibody-drug conjugates through glycan remodeling and strain-promoted azide-alkyne cycloadditions. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. 53(28): p. 7179-82; Xiao, H., et al., Genetic incorporation of multiple unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. 52(52): p. 14080-3). Способи сайт-специфічного приєднання молекул до білків або антитіл відомі в цій галузі техніки, і у винаході може використовуватися будь-який спосіб сайт-специфічного мічення антитіла, відомий фахівцям у цій галузі з огляду цього винаходу. Приклади способів сайт-специфічної модифікації антитіл, придатних для використання у винаході, включають, серед іншого, введення сконструйованих залишків цистеїну (наприклад, THIOMAB™), використання неприродних амінокислот або гліканів (наприклад, селеноцистеїну, p-AcPhe, ферменту, що генерує формілгліцин (FGE, SMARTag™), тощо), і ферментативних методів (наприклад, використання глікотрансферази, ендоглікозидази, мікробної або бактеріальної трансглутамінази (MTG або BTG), сортази A тощо).

У деяких варіантах здійснення модифіковане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент для використання у виробництві імунокон'югату або радіоімунокон'югату за винаходом отримують шляхом тримінгу антитіла або його антигензв'язувального фрагмента бактеріальною ендоглікозидазою, специфічною для β-1,4-зв'язку між залишком GlcNac ядра у сайті Fc-глікозилювання антитіла, наприклад GlycINATOR (Genovis), який залишає внутрішню частину GlcNAc неушкодженою на Fc, що забезпечує сайт-специфічне включення азидоцукрів на цьому сайті. Тримінговане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент може потім реагувати з міченим азидом цукром, таким як UDP-N-азидоацетилгалактозамін (UDP-GalNAz) або UDP-6-азидо 6-дезокси GalNAc, у присутності цукротрансферази, наприклад GalT галактозилтрансферази або GalNAc трансферази, з відповідним отриманням модифікованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента.

В інших варіантах здійснення модифіковане антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент для використання у виробництві імунокон'югату або радіоімунокон'югату за винаходом отримують шляхом деглікозилювання антитіла або його антигензв'язувального фрагмента амідазою. Отримане деглікозильоване антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент може потім реагувати з азидоаміном, переважно 3-азидопропіламіном, 6-азидогексиламіном, або будь-яким азидо-лінкер-аміном, або будь-яким азидо-алкіл/гетероалкіламіном, таким як азидо-поліетиленгліколь (PEG)-амін, наприклад O-(2-аміноетил)-O′-(2-азидоетил)тетраетиленгліколь, O-(2-аміноетил)-O′-(2-азидоетил)пентаетиленгліколь, O-(2-аміноетил)-O′-(2-азидоетил)триетиленгліколь тощо, або в присутності мікробної трансглутамінази для відповідного отримання модифікованого антитіла або його антигензв'язувального фрагмента.

Будь-який радіометалевий комплекс, описаний в цьому документі, можна використовувати для отримання радіоімунокон'югату за винаходом. У конкретних варіантах здійснення радіометалевий комплекс має структуру формули (I-m), формули (II-m) або формули (III-m). У кращих варіантах здійснення радіометалевий комплекс має структуру, вибрану з групи, що складається з:

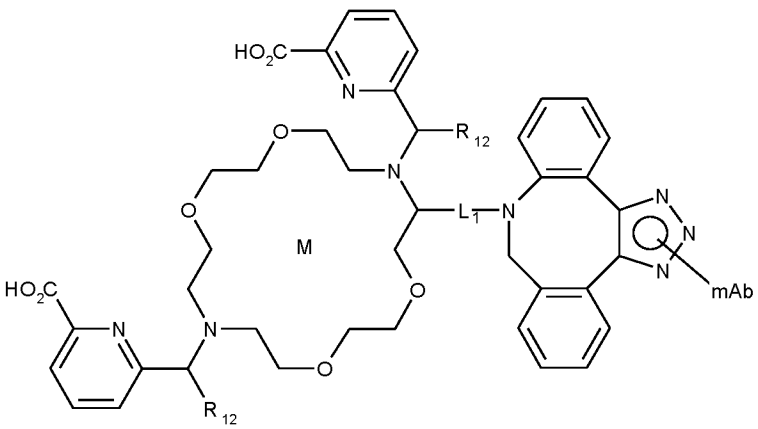











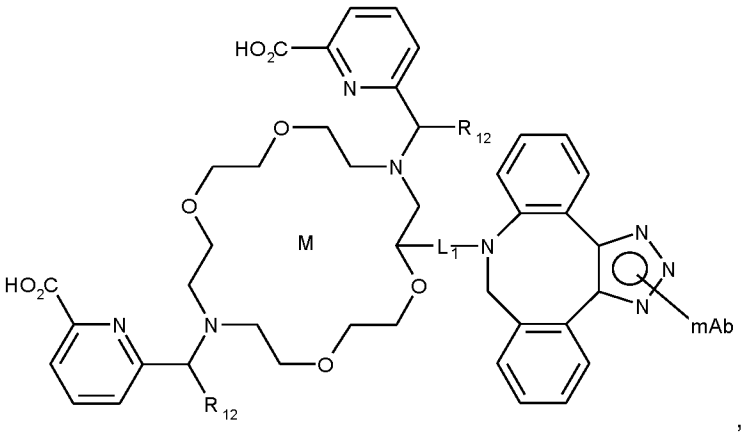
де M являє собою іон радіометалу, переважно альфа-випромінюючий іон радіометалу, більш переважно Актиній-225 (^{225}Ac), R_{11} являє собою циклооктиніл або похідне циклооктинілу, таке як біциклононініл (BCN), дифторований циклооктиніл (DIFO), дибензоциклооктиніл (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктиноніл (BARAC), дибензоазациклооктиніл (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктиніл (DIMAC), дифторбензоциклооктиніл (DIFBO), монобензоциклооктиніл (MOBO) і тетраметоксидибензоциклооктиніл (TMDIBO).

У деяких варіантах здійснення антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент ковалентно зв'язані з азидогрупою за допомогою будь-якого способу хімічної або ферментативної модифікації антитіл і поліпептидів, відомих фахівцям у цій галузі з огляду на цей опис. Азидо-мічене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вступають у реакцію з хелатором або радіометалевим комплексом за винаходом, що містить алкінільну або циклоалкінільну групу, переважно циклооктинільну групу і більш переважно DBCO, в умовах, достатніх для того, щоб азидо- та алкінільна або циклоалкінільна група зазнали реакції клік-хімії для утворення 1,2,3-триазольного фрагмента.

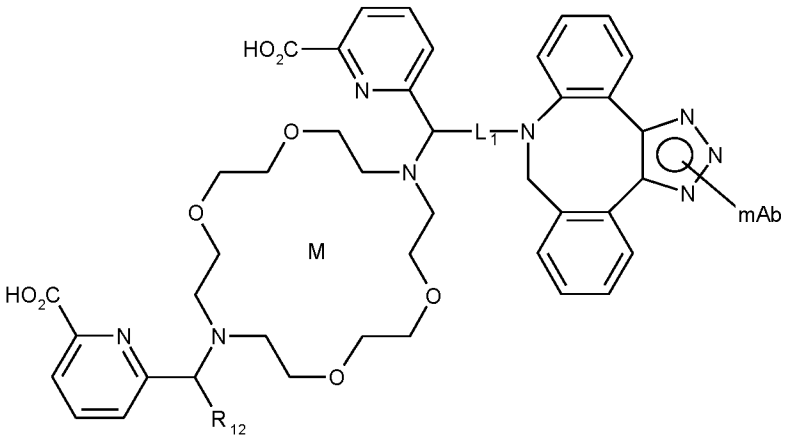
У конкретних варіантах здійснення радіоімунокон'югати за цією заявкою включають, але не обмежуються ними:



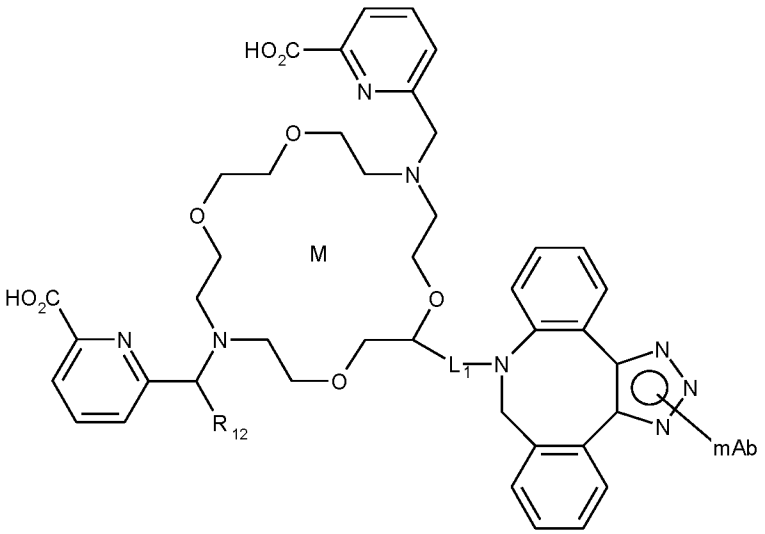
,


HO2C
N
R12
O
N
M
L1
N
N
N
N
mAb
HO2C
N
N
R12
O

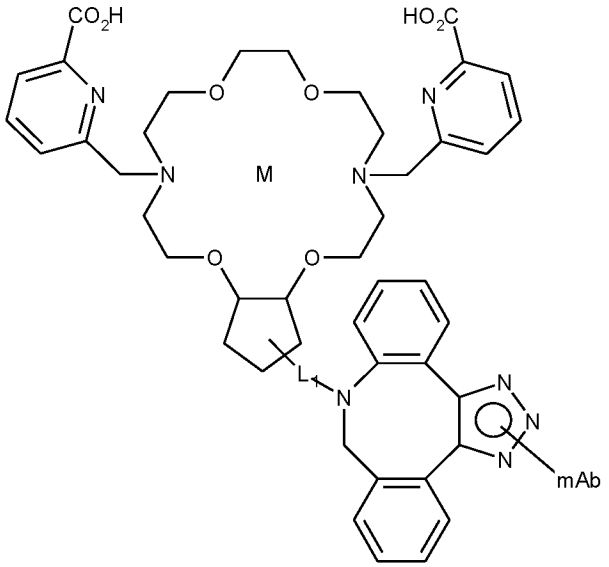
,


HO2C
N
L1
N
N
N
N
mAb
O
N
M
HO2C
N
N
R12
O

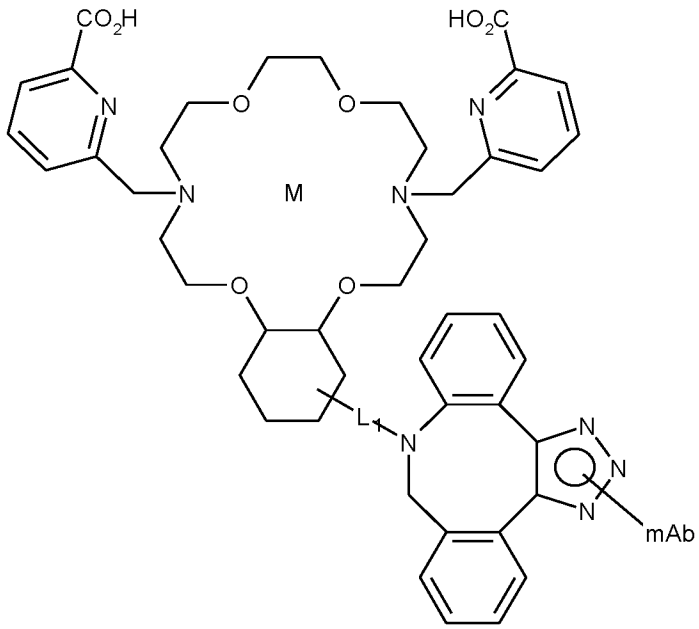
,


HO2C
N
O
N
M
O
HO2C
N
N
R12
O
L1
N
N
N
N
mAb

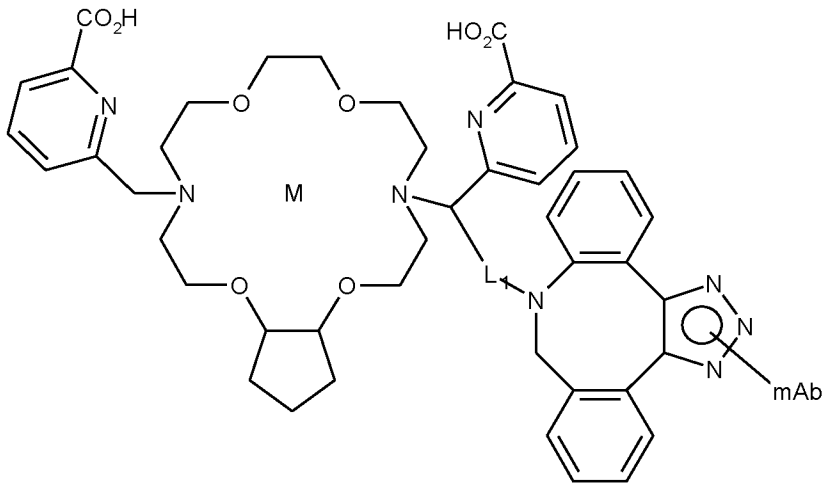
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
N
mAb

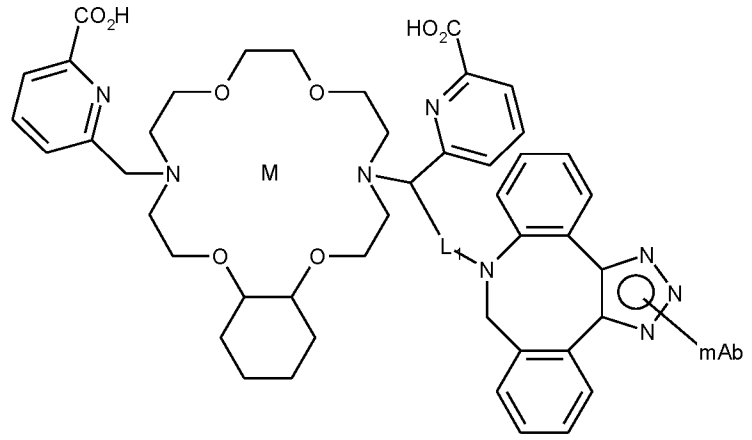
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
N
mAb

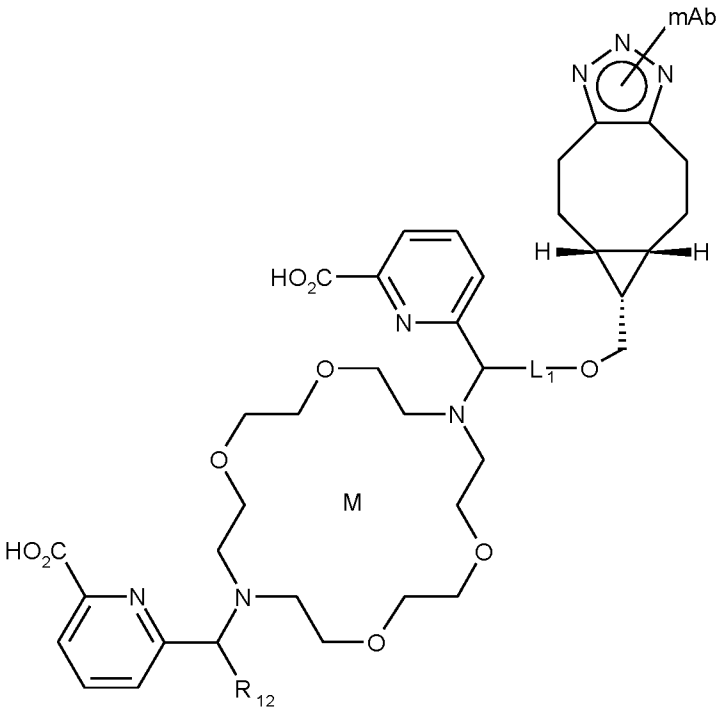
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
N
mAb

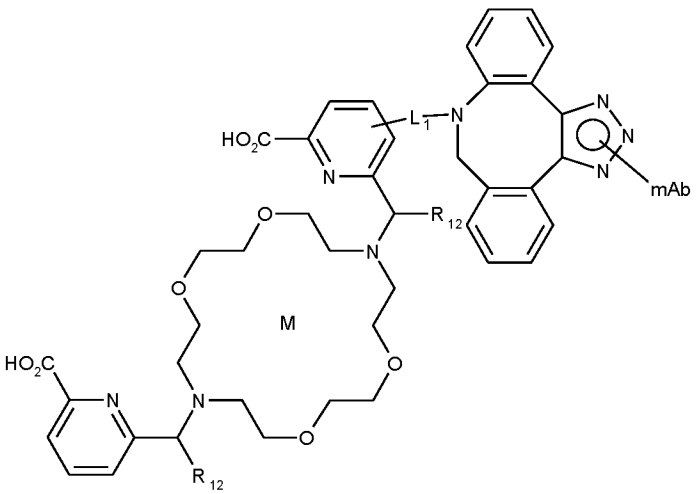
,



,



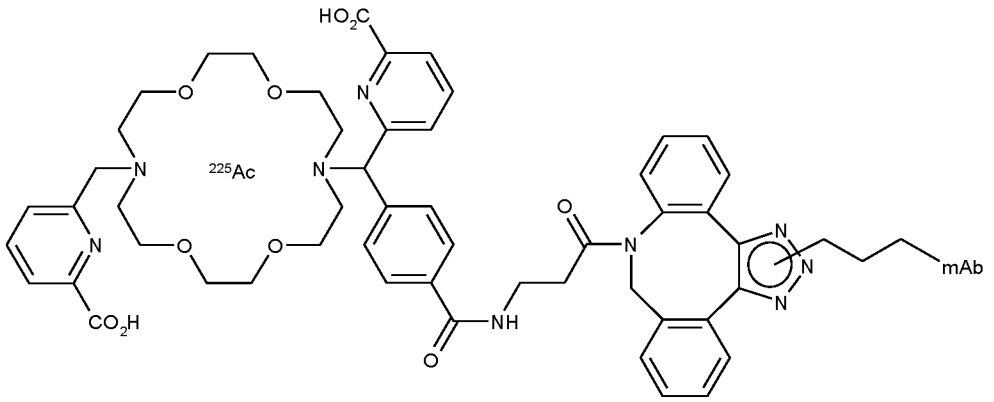
та



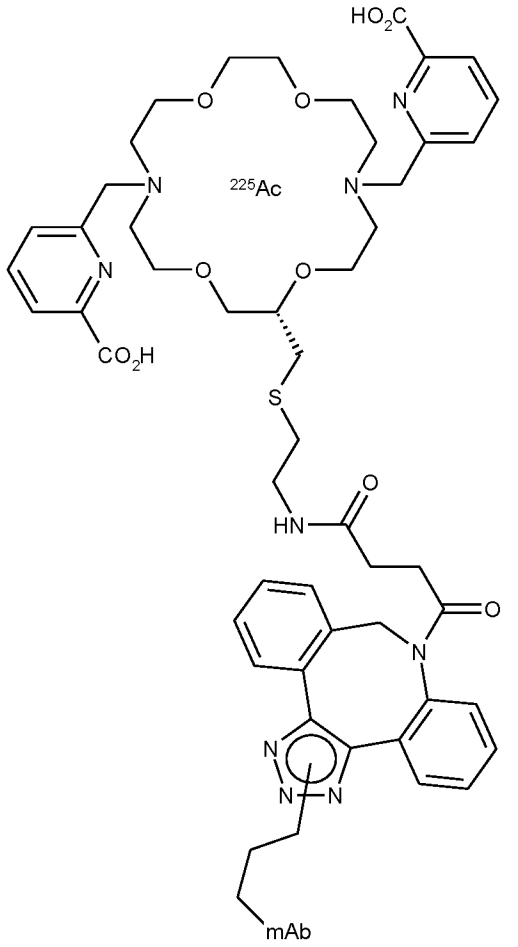
,

де mAb являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент; L_1 відсутній або являє собою лінкер, переважно лінкер; кожен R_{12} незалежно є воднем, $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$, за умови, що щонайменше один R_{12} являє собою $-CH_3$ або $-CH_2CH_3$; і M є альфа-випромінюючим радіонуклідом, переважно ^{225}Ac.

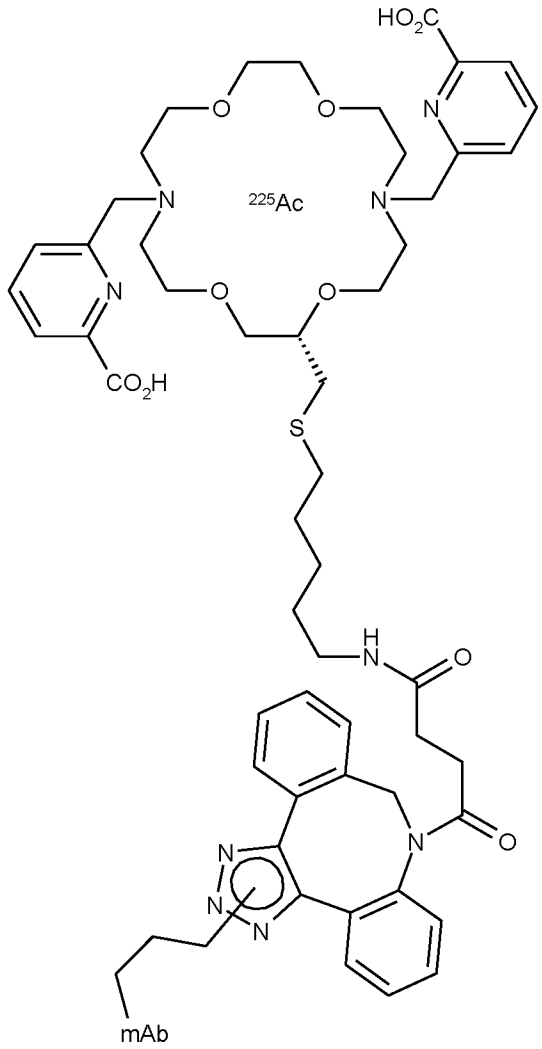
Приклади радіоімунокон'югатів за цією заявкою включають, але не обмежуються ними:



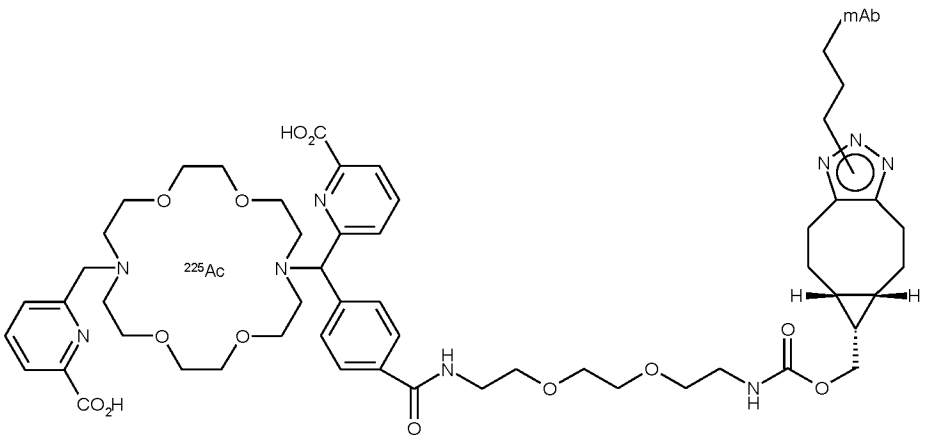
,



,



і



,

переважно mAb вибирають з PSMB127, пертузумабу, цетуксимабу, панітумумабу, герцептину або H11B6.

Радіоімунокон'югати, отримані способами, описаними в цьому документі, можуть бути проаналізовані за допомогою методів, відомих фахівцям у цій галузі з огляду на цей опис. Наприклад, РХ/МС аналіз можна використовувати для визначення співвідношення хелатора до міченого поліпептиду, наприклад антитіла або його антигензв'язувального фрагмента; аналітичну ексклюзійну хроматографію можна використовувати для визначення олігомерного стану поліпептидів і поліпептидних кон'югатів, наприклад антитіл і кон'югатів антитіл; радіохімічний вихід можна визначити за допомогою миттєвої тонкошарової хроматографії (наприклад, iTLC-SG), а радіохімічну чистоту можна визначити за допомогою ексклюзійної ВЕРХ. Зразкові методи описані в цьому документі, наприклад, у прикладах нижче.

Фармацевтичні композиції та методи застосування

В іншому загальному аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить хелатор, комплекс радіометалу, імунокон'югат або радіоімунокон'югат за винаходом і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтична композиція може містити одну або кілька фармацевтично прийнятних допоміжних речовин.

В одному варіанті здійснення фармацевтична композиція містить радіометалевий комплекс за винаходом і фармацевтично прийнятний носій.

В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція містить радіоімунокон'югат за винаходом і фармацевтично прийнятний носій.

Термін "носій", що використовується в цьому документі, відноситься до будь-якої допоміжної речовини, розчинника, наповнювача, солі, буфера, стабілізатора, солюбілізатора, олії, ліпідів, везикули, які містять ліпіди, мікросфери, ліпосомної інкапсуляції або іншого матеріалу, добре відомого в цій галузі, для використання у фармацевтичних препаратах. Зрозуміло, що характеристики носія, допоміжної речовини або розчинника залежатимуть від шляху введення щодо конкретного виду застосування. Термін "фармацевтично прийнятний носій", що використовується в цьому документі, відноситься до нетоксичного матеріалу, який не впливає на ефективність композиції відповідно до цього винаходу або на біологічну активність композиції відповідно до цього винаходу. Відповідно до конкретних варіантів здійснення з огляду цього винаходу може використовуватися будь-який фармацевтично прийнятний носій, придатний для застосування у фармацевтичній композиції на основі антитіла або у фармацевтичній композиції на основі радіоактивного комплексу.

Відповідно до конкретних варіантів здійснення описані тут композиції введені до складу лікарської форми таким чином, щоб вони були придатними для передбачуваного шляху введення суб'єкту. Наприклад, композиції, описані в цьому документі, можуть бути сформульовані так, щоб вони були придатними для парентерального введення, наприклад внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового або внутрішньопухлинного введення.

В інших загальних аспектах винахід належить до способів селективного націлення на неопластичні клітини для променевої терапії та лікування неопластичних захворювань або розладів. Будь-який з радіокомплексів або радіоімунокон'югатів та їхні фармацевтичні композиції, описані в цьому документі, можна використовувати в способах винаходу.

"Неоплазма" - це аномальна маса тканини, яка виникає, коли клітини діляться більше, ніж повинні, або не гинуть, коли повинні. Неоплазми можуть бути доброякісними (не рак) або злоякісними (рак). Неоплазму також називають пухлиною. Неопластичне захворювання або розлад - це захворювання або розлад, пов'язані з новоутворенням, таким як рак. Приклади неопластичних захворювань або розладів включають, але не обмежуються ними, дисемінований рак і рак у вигляді солідної пухлини.

Відповідно до варіанту здійснення спосіб лікування раку передміхурової залози (наприклад, метастатичного раку передміхурової залози або метастатичного кастраційно-резистентного раку передміхурової залози) у суб'єкта, який цього потребує, включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості радіоімунокон'югату, як описано у цьому документі, де радіоімунокон'югат містить комплекс радіометалу, як описано у цьому документі, кон'югований з H11B6.

Інші приклади захворювань, які підлягають лікуванню променевою терапією за допомогою методів, описаних у цьому документі, включають, але не обмежуються, гіпертрофію, ішемічну хворобу або оклюзійне захворювання судин, захворювання або розлад, пов'язані з інфікованою клітиною, мікробом або вірусом, або захворювання чи розлад, пов'язані із запальною клітиною, наприклад ревматоїдний артрит (РА).

У варіанті здійснення винаходу спосіб селективного націлення на неопластичні клітини для променевої терапії включає введення суб'єкту, який потребує цього, радіоімунокон'югату або фармацевтичної композиції за винаходом.

У варіанті здійснення винаходу спосіб лікування неопластичного захворювання або розладу включає введення суб'єкту, який потребує цього, радіоімунокон'югату або фармацевтичної композиції за винаходом.

У варіанті здійснення винаходу спосіб лікування раку у суб'єкта, який цього потребує, включає введення суб'єкту, який цього потребує, радіоімунокон'югату або фармацевтичної композиції за винаходом.

Радіоімунокон'югати переносять випромінювання безпосередньо, наприклад, до клітин тощо, на які націлений ліганд. Переважно радіоімунокон'югати переносять альфа-випромінюючі іони радіометалів, такі як ^{225}Ac. Після націлювання альфа-частинки з альфа-випромінюючих іонів радіометалів, наприклад ^{225}Ac та його продукти розпаду, доставляються до цільових клітин і викликають у них цитотоксичний ефект, таким чином селективно націлюючись на неопластичні клітини для променевої терапії та/або лікування неопластичного захворювання або розладу.

У винаході також розглядаються підходи попереднього націлювання для селективного націлювання на неопластичні клітини для променевої терапії та для лікування неопластичного захворювання або розладу. Відповідно до підходу попереднього націлювання, мічене азидом антитіло

або його антигензв'язувальний фрагмент дозують, зв'язують з клітинами, що несуть цільовий антиген антитіла, які виводяться з часом із циркуляції, або їх видаляють очисним агентом. Згодом вводять радіокомплекс за винаходом, переважно радіокомплекс, що містить циклооктин або похідне циклооктину, наприклад DBCO, і піддають реакції SPAAC з міченим азидом антитілом, зв'язаним у сайті-мішені, в той час як незв'язаний радіокомплекс, що залишився, швидко виводиться з кровообігу. Методика попереднього націлювання забезпечує спосіб покращення локалізації іонів радіометалу в цільовому сайті у суб'єкта.

В інших варіантах здійснення модифікований поліпептид, наприклад мічене азидом антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, і радіокомплекс винаходу вводять суб'єкту, який потребує цільової променевої терапії або лікування пухлинного захворювання або розладу, в тій же композиції, або в різних композиціях.

Термін "терапевтично ефективна кількість", що використовується в цьому документі, відноситься до кількості активного інгредієнта або компонента, яка викликає бажану біологічну або терапевтичну відповідь у суб'єкта. "Терапевтично ефективну кількість" можна визначати емпірично й рутинним способом залежно від заявленого призначення. Наприклад, як допоміжний засіб для визначення оптимальних діапазонів дозування можна необов'язково додатково використати аналізи in vitro. Вибір конкретної ефективної дози може визначатися (наприклад, за допомогою клінічних досліджень) фахівцями в цій галузі з урахуванням декількох факторів, включно із захворюваннями, які підлягають лікуванню або профілактиці, існуючими симптомами, масою тіла пацієнта, імунним статусом пацієнта й іншими факторами, відомими кваліфікованому фахівцю. Точна доза для застосування в препараті буде також залежати від шляху введення й тяжкості захворювання, і її необхідно підбирати відповідно до оцінки практикуючого лікаря й обставин для кожного пацієнта. Ефективні дози можна екстраполювати з кривих "доза-відповідь", отриманих із дослідних систем in vitro або тваринних моделей.

Терміни "лікувати", "лікування" й "терапія", що використовуються в цьому документі, призначені для позначення полегшення або зникнення щонайменше одного вимірюваного фізичного параметра, що стосується захворювання, порушення або стану, при якому введення іона радіометалу буде корисним, наприклад, при неопластичному захворюванні або порушенні, яке необов'язково виражене у суб'єкта, але може бути вираженим у суб'єкта. Терміни "лікувати", "лікування" і "терапія" також можуть означати спричинення регресування, профілактику прогресування або принаймні уповільнення прогресування захворювання, розладу чи стану. У конкретному варіанті здійснення терміни "лікувати", "лікування" й "терапія" відносяться до полегшення, профілактики розвитку або виникнення чи зменшення тривалості одного або більше симптомів, пов'язаних із захворюванням, порушенням або станом, при якому введення іона радіометалу буде корисним, наприклад, при неопластичному захворюванні або порушенні. У конкретному варіанті здійснення терміни "лікувати", "лікування" і "терапія" стосуються запобігання рецидиву неопластичного захворювання, розладу або стану. У конкретному варіанті здійснення терміни "лікувати", "лікування" і "терапія" належать до збільшення виживаності суб'єкта, який має неопластичні захворювання, розлад або стан. У конкретному варіанті здійснення терміни "лікувати", "лікування" і "терапія" належать до елімінації неопластичного захворювання, розладу або стану у суб'єкта.

У деяких варіантах здійснення терапевтично ефективну кількість радіоімунокон'югату або фармацевтичної композиції за винаходом вводять суб'єкту для лікування неопластичного захворювання або розладу у суб'єкта, такого як рак.

В інших варіантах здійснення винаходу радіоімунокон'югати та фармацевтичні композиції винаходу можна використовувати в комбінації з іншими агентами, які є ефективними для лікування неопластичних захворювань або розладів.

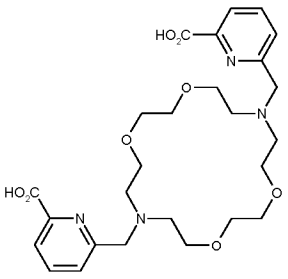
Також передбачаються радіоімунокон'югати та фармацевтичні композиції, як описано у цьому документі, для використання в селективному націлюванні на неопластичні клітини для променевої терапії та/або для лікування неопластичного захворювання або розладу; і використання радіоімунокон'югату або фармацевтичних композицій, як описано у цьому документі, у виробництві лікарського засобу для селективного націлення на неопластичні клітини для променевої терапії та/або для лікування неопластичного захворювання або розладу.

ПРИКЛАДИ

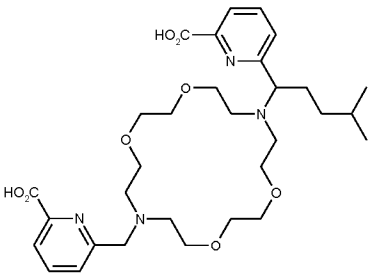
Наступні приклади винаходу додатково ілюструють природу цього винаходу. Слід розуміти, що наступні приклади не обмежують винахід і що обсяг винаходу повинен визначатися доданою формулою винаходу.

Приклад 1. Синтез і ефективність хелатування макроциклічних хелаторів, що мають різні позиції лінкерної заміни

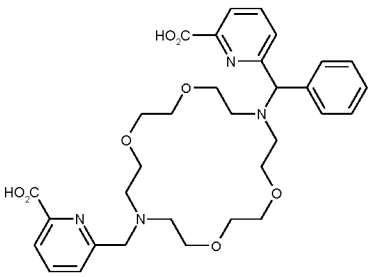
Два хелатори на основі макроциклічного хелатора N,N'-біс[(6-карбокси-2-піридил)метил]-4,13-діаза-18-краун-6 (H_2bp18c6) були синтезовані для вивчення впливу положення лінкера на ефективність хелатування актинію-225 (^{225}Ac). Зокрема, були синтезовані H2bp18c6-бензил-ізопентил та H2bp18c6-бензил-феніл:



H_2bp18c6



ізопентил-H_2bp 18c6

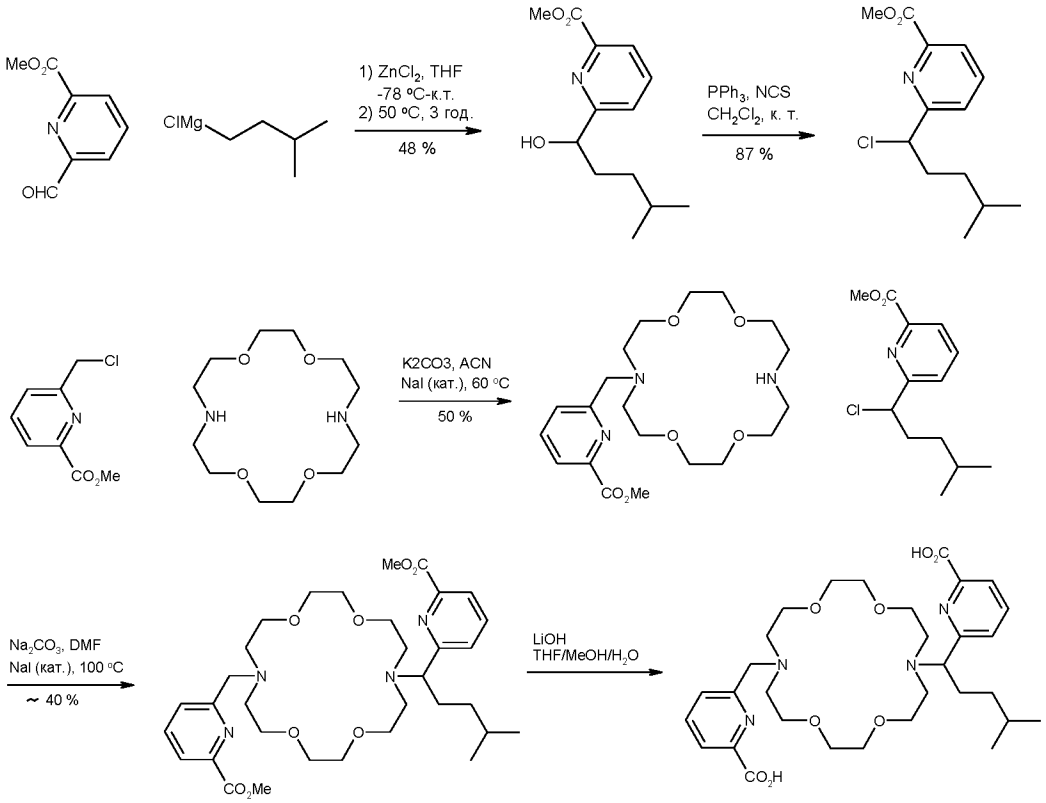


феніл-H_2bp 18c6

Синтез та характеристика H2bp18c6-бензил-ізопентилу

H2bp18c6-бензил-ізопентил синтезували за Схемою 1.

Схема 1: Синтез H2bp18c6-бензил-ізопентилу



До розчину $ZnCl_2$ (1,9 М у 2-метилтетрагідрофурані, 3,50 мл, 6,65 ммоль) і THF (25 мл) при -78 °C додавали по краплях ізопентилмагнійхлорид (2 М в Et_2O, 3,33 мл, 6,66 ммоль). Молочну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години, а потім охолоджували до 0 °C. Додавали розчин метил-6-формілпіколінату (1,00 г, 6,1 ммоль) у THF (10 мл). Суміш нагрівали при 50 °C протягом 3 год. Охолоджену реакційну суміш виливали в насичений водний розчин NH_4Cl і тричі екстрагували EtOAc. Об'єднані екстракти сушили над Na_2SO_4. Фільтрація та концентрування фільтрату дали неочищений продукт у вигляді коричневого масла. Хроматографія на силікагелі (гептан до 50 % EtOAc в гептані) дала 693 мг (вихід 48 %) продукту у вигляді жовтого масла.

До розчину метил-6-(1-гідрокси-4-метилпентил)піколіната (91 мг, 0,38 ммоль) у CH_2Cl_2 (3 мл) при кімнатній температурі додавали PPh_3 (120 мг, 0,46 ммоль) і NBS (56 мг, 0,42 ммоль). Реакційний розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години і потім концентрували. Хроматографія на силікагелі (гептан до 30 % EtOAc в гептані) дала 85 мг (вихід 87 %) продукту у вигляді безбарвного масла.

До перемішаної суміші 1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекану (315 мг, 1,2 ммоль) і K_2CO_3 (691 мг, 5 ммоль) в ACN (30 мл) при 60 °C повільно додавали розчин метил-6-(хлорметил)піколіната в ACN (5 мл) протягом однієї години за допомогою шприцевого насоса. Після додавання реакційну суміш перемішували при 60 °C протягом 6 годин і потім фільтрували. Фільтрат концентрували і

залишок очищали хроматографією на силікагелі (CH_2Cl_2 до 10 % MeOH в CH_2Cl_2) з одержанням 206 мг (50 % вихід) продукту у вигляді жовтуватої твердої піни.

До суміші метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколінату (31 мг, 0,075 ммоль), Na_2CO_3 (40 мг, 0,38 ммоль) і NaI (1,5 мг) у DMF (0,5 мл) додавали метил 6-(1-хлор-4-метилпентил)піколінат (29 мг, 0,11 ммоль). Реакційну суміш нагрівали при 100 °C протягом 20 годин. Хроматографія на силікагелі (EtOAc до 10 % MeOH у CH_2Cl_2) дала 18,9 мг (40 % вихід продукту у вигляді жовтої плівки, що прилипла до стінки колби).

Розчин метил-6-((16-(1-(6-(метоксикарбоніл)піридин-2-іл)-4-метилпентил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколінату (3 мг, 0,005 ммоль) у THF/MeOH/H_2O (4:1:1 об./об./об., 0,6 мл) обробляли LiOH (1N, 0,1 мл). Після того як реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години, її концентрували насухо. Залишок розчиняли в 0,95 мл води без металів і нейтралізували 0,05 мл 2N HCl, щоб отримати розчин H2bp18c6-бензил-ізопентилу у воді (~3 мг/мл=~ 5 мМ, pH ~6).

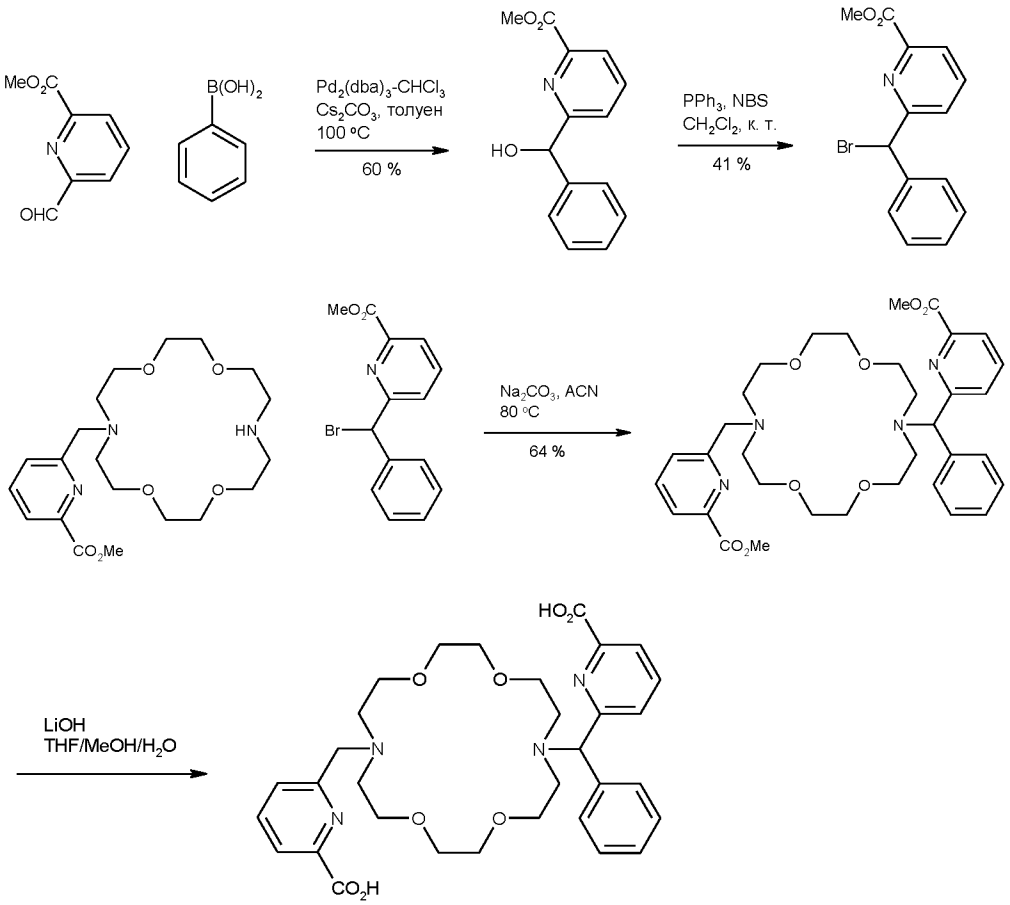
H2bp18c6-бензил-ізопентил (MW=602 Да) характеризували високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) та рідинною хроматографією-мас-спектрометрією (РХ-МС). Аналіз ВЕРХ показав основний пік при часі елюювання 17,181 хвилини, що відповідає вільному хелатору. РХ-МС аналіз показав масові іонні піки (ES, m/z) при 603 [$M+H^+$], 625 [$M+Na^+$] та 302 [$M+2H^+$], що підтверджує синтез H2bp18c6-бензил-ізопентилу.

Метод ВЕРХ: колонка XBridge C18 3,5 µм 150×4,6 мм, колонка 100 Å; Рухома фаза A: 0,1 % TFA в H_2O, B: 0,1 % TFA в ACN; градієнт від 10 % до 30 % B за 0-20 хв, градієнт від 30 % до 100 % B за 20-20,1 хв, ізократичний при 100 % B за 20,1-25 хв, градієнт від 100 % до 10 % B за 25-25,1 хв, ізократичний при 10 % B через 25,1-30 хв; постперегонка 3 хв; швидкість потоку 1 мл/хв; температура колонки 30 °C; об'єм ін'єкції 5 мкл.

Синтез та характеристика H2bp18c6-бензил-фенілу

H2bp18c6-бензил-феніл синтезували за Схемою 2.

Схема 2: Синтез H2bp18c6-бензил-фенілу



Суміш метил-6-формілпіколіната (165 мг, 1,0 ммоль), фенілборної кислоти (244 мг, 2,0 ммоль), Cs_2CO_3 (326 мг, 1,0 ммоль), $Pd_2(dba)_3$•$CHCl_3$ (52 мг, 0,05 ммоль) і PPh_3 (26 мг, 0,1 ммоль) поміщали під N_2 у герметичному флаконі. Через шприц додавали толуен (3 мл) і суміш нагрівали при 100 °C в мікрохвильовій печі протягом 4 годин. Після того як охолоджену реакційну суміш фільтрували через

Celite, фільтрат концентрували. Хроматографія на силікагелі (гептан до 50 % EtOAc в гептані) дала 146 мг (вихід 60 %) продукту у вигляді жовтого масла.

Розчин метил-6-(гідрокси(феніл)метил)піколіната (141 мг, 0,58 ммоль), PPh_3 (183 мг, 0,70 ммоль) і NBS (113 мг, 0,64 ммоль) у CH_2Cl_2 (8 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год. Додавали більше PPh_3 (133 мг, 0,70 ммоль) і NBS (113 мг, 0,64 ммоль) і розчин далі перемішували протягом однієї години при кімнатній температурі. Реакційну суміш концентрували та очищали хроматографією на силікагелі (гептан до 30 % EtOAc в гептані) з одержанням 73 мг (вихід 41 %) продукту у вигляді безбарвного масла.

Суміш метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколіната (33 мг, 0,080 ммоль), метил 6-(бром(феніл)метил)піколіната (37 мг, 0,12 ммоль) і Na_2CO_3 (42 мг, 0,40 ммоль) в ACN (1,0 мл) нагрівали при 80 °C протягом 3 годин. Реакційну суміш фільтрували і фільтрат концентрували. Хроматографія на силікагелі (EtOAc до 10 % MeOH у CH_2Cl_2) дала 51 мг (вихід 64 %) продукту у вигляді білої твердої речовини.

Розчин метил-6-((16-((6-(метоксикарбоніл)піридин-2-іл)(феніл)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколіната (16 мг, 0,025 ммоль) у THF/MeOH/H_2O (4:1:1 об./об./об., 1,2 мл) обробляли LiOH (1N, 0,2 мл). Після того як реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години, її концентрували насухо. Залишок розчиняли в 5,2 мл води без металів і нейтралізували 0,10 мл 2N HCl з отриманням розчину H2bp18c6-бензилфенілу у воді (~3 мг/мл=~5 мМ, pH ~6).

H2bp18c6-бензил-феніл (MW=608 Да) характеризували високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) та рідинною хроматографією-мас-спектрометрією (РХ-МС). Аналіз ВЕРХ проводили, як описано вище, для ізопентану-H_2bp18c6. Аналіз ВЕРХ показав основний пік при часі елюювання 14,137 хвилини, що відповідає вільному хелатору. РХ-МС аналіз показав масові іонні піки (ES, m/z) при 609 [$M+H^+$], 631 [$M+Na^+$], та 305 [$M+2H^+$], що підтверджує синтез H2bp18c6-бензилфенілу.

Тест на хелатування з лантаном (III)

Водний розчин H2bp18c6-бензил-ізопентилу у воді (~3 мг/мл=~ 5 мм, 20 мкл, 0,1 мкмоль) обробляли $La(NO_3)_3$ (10 мМ у воді без металу, 50 мкл, 0,5 мкмоль). Водний розчин H2bp18c6-бензилфенілу у воді (~3 мг/мл= ~5 мМ, 20 µл, 0,1 µмоль) обробляли $La(NO_3)_3$ (10 мМ у воді без металу, 50 µл, 0,5 µмоль). Після ретельного перемішування кожен розчин аналізували за допомогою РХМС та ВЕРХ, щоб визначити, чи утворюються комплекси хелатора та La^{3+}.

Обидва хелатори, і ізопентан-H2bp18c6, і H2bp18c6-бензил-феніл, продемонстрували швидке та стехіометричне хелатування з La^{3+} при кімнатній температурі, що продемонстровано значним зсувом пікового часу утримання ВЕРХ, проаналізованого за методом, описаним вище для синтезу H2bp18c6 (Фігури 1A та 1B). Комплексоутворення також було підтверджено РХМС. РХМС аналіз ізопентану-H2bp18c6 після змішування з $La(NO_3)_3$ показав масовий іонний пік (ES, m/z) при 739 (H2bp18c6-бензил-ізопентил + La^{+3} - $2H^+$); і РХ-МС аналіз H2bp18c6-бензил-фенілу після змішування з $La(NO_3)_3$ показав масовий іонний пік (ES, m/z) при 745 (H2bp18c6-бензил-феніл + La^{+3} - $2H^+$), що підтверджує утворення комплексу з обома хелаторами.

Хелатування H2bp18c6-бензил-ізопентилу з ^{225}AC(III)

(i) Хелатування з ^{225}Ac(III) при низькому співвідношенні ^{225}Ac/хелатор

У пластиковий флакон послідовно додавали ацетат тетраметиламонію (1М у воді, 10 мкл), H2bp18c6-бензил-ізопентил (1,66 мМ у воді, 2 µл, ~3,32 нмоль) та 225Ac$(NO_3)_3$ (10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 3 мкл, 30 мкКі). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при кімнатній температурі протягом 1,5 год.

Аналіз iTLC-SG: 0,5 мкл реакційного розчину наносили на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов, описаних у цьому документі, зв'язаний Ac-225 залишається на базовій лінії iTLC-SG, тоді як вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивності, що вказує на те, що хелатор успішно хелатував іон ^{225}Ac.

Аналіз ВЕРХ: 5 мкл реакційної суміші розбавляли 95 мкл буфера PBS. Розведену суміш аналізували за допомогою ВЕРХ. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами в одну хвилину. Зібрані фракції залишали при кімнатній температурі на ніч, потім підраховували на гамма-лічильнику. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі активності фракцій.

Аналіз ВЕРХ підтвердив, що комплекс ^{225}Ac утворився на основі зсуву часу утримування, подібного до показаного на хроматограмах ВЕРХ на Фіг. 1A.

Стимуляція DTPA: 0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA і суміш інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші було нанесено на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов, описаних у цьому документі, стабільно хелатований Ac-225 залишається на базовій лінії iTLC-SG, тоді як вільний Ac-225 мігрує

разом з розчинником на фронт розчинника. Не спостерігалося радіоактивності на фронті розчинника iTLC-SG після стимуляції DTPA, що вказує на те, що утворився стабільний комплекс з іоном ^{225}Ac.

(ii) Хелатування з ^{225}Ac (III) при високому співвідношенні ^{225}Ac/хелатор

У пластиковий флакон послідовно додавали ацетат тетраметиламонію (1M у воді, 10 мкл), H2bp18c6-бензил-ізопентил (0,33 мМ у воді, 2 µл, ~0,66 нмоль) і $^{225}Ac(NO_3)_3$ (10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 мкл, 50 мкКі). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при кімнатній температурі протягом 1,5 год. Потім реакцію аналізували за допомогою iTLC-SG та стимуляції DTPA, як описано вище. Не було виявлено вільного ^{225}Ac до або після стимуляції DTPA, що вказує на те, що утворився стабільний комплекс з іоном ^{225}Ac.

Хелатування H2bp18c6-бензилфенілу з ^{225}Ac (III)

(i) Хелатування з ^{225}Ac(III) при низькому співвідношенні ^{225}Ac/хелатор

У пластиковий флакон послідовно додавали ацетат тетраметиламонію (1M розчин у воді, 10 мкл), H2bp18c6-бензилфеніл (1,64 мМ у воді, 2 µл, ~3,28 нмоль) і $^{225}Ac(NO_3)_3$ (10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 3 мкл, 30 мкКі). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при кімнатній температурі протягом 2 год. Не було виявлено вільних іонів ^{225}Ac, що вказує на те, що хелатор успішно хелатував іон ^{225}Ac

Аналіз iTLC-SG: 0,5 мкл реакційного розчину наносили на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов, описаних у цьому документі, зв'язаний Ac-225 залишається на базовій лінії iTLC-SG, тоді як вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG радіоактивності не спостерігали, що вказує на успішне хелатування Ac-225.

Аналіз ВЕРХ: 5 мкл реакційної суміші розбавляли 95 мкл буфера PBS. Розведену суміш аналізували за допомогою ВЕРХ. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами в одну хвилину. Зібрані фракції залишали при кімнатній температурі на ніч, потім підраховували на гамма-лічильнику. Радіоактивний слід ВЕРХ був побудований на основі активності фракцій. Аналіз ВЕРХ підтвердив, що комплекс ^{225}Ac утворився на основі зсуву часу утримування, подібного до показаного на хроматограмах ВЕРХ на Фіг. 1B.

Стимуляція DTPA: 0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA і суміш інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші було нанесено на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов, описаних у цьому документі, стабільно хелатований Ac-225 залишається на базовій лінії iTLC-SG, тоді як вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. Після стимуляції DTPA не було виявлено вільного ^{225}Ac, що вказує на те, що утворився стабільний комплекс з іоном ^{225}Ac. Не спостерігалося радіоактивності на фронті розчинника iTLC-SG до або після стимуляції DTPA, що вказує на те, що утворився стабільний комплекс з іоном ^{225}Ac.

(ii) Хелатування з ^{225}Ac (III) при високому співвідношенні ^{225}Ac/хелатор

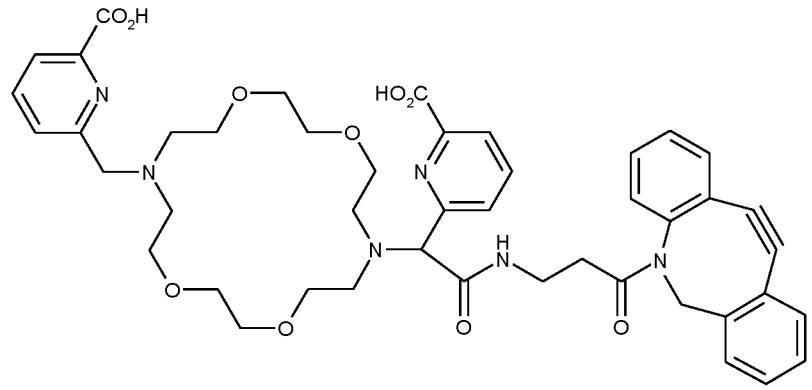
У пластиковий флакон послідовно додавали ацетат тетраметиламонію (1M розчин у воді, 10 мкл), H2bp18c6-бензилфеніл (0,16 мМ у воді, 2 µл, ~0,33 нмоль) і $^{225}Ac(NO_3)_3$ (10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 мкл, 50 мкКі). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при кімнатній температурі протягом 2 год. Потім реакцію аналізували за допомогою iTLC-SG та стимуляції DTPA, як описано вище. Не було виявлено вільного ^{225}Ac до або після стимуляції DTPA, що вказує на те, що утворився стабільний комплекс з іоном ^{225}Ac.

Суть винаходу

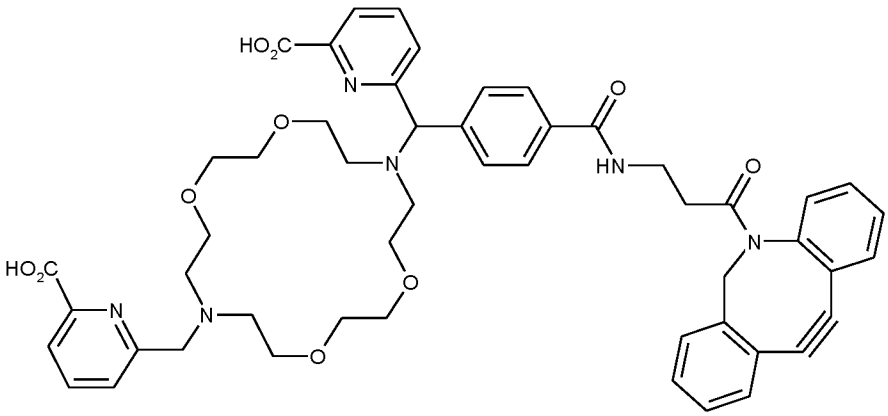
В цілому, наведені вище результати вказують на те, що H2bp18c6, дериватизований за "бензильним" вуглецем, ефективно хелатує ^{225}Ac при кімнатній температурі з швидкою кінетикою хелатування, утворюючи стабільний комплекс. Результати також вказують на те, що висока питома активність (тобто нижче відношення хелатора до ^{225}Ac) може бути досягнута шляхом зв'язування через позицію "бензил".

Приклад 2. Синтез та ефективність хелатування похідних H2bp18c6, що містять "клік»-лінкер DBCO

Можна синтезувати наступні похідні H_2bp18c6, що містять лінкер DBCO для подальшої кон'югації з цільовими лігандами за допомогою реакцій клік-хімії:



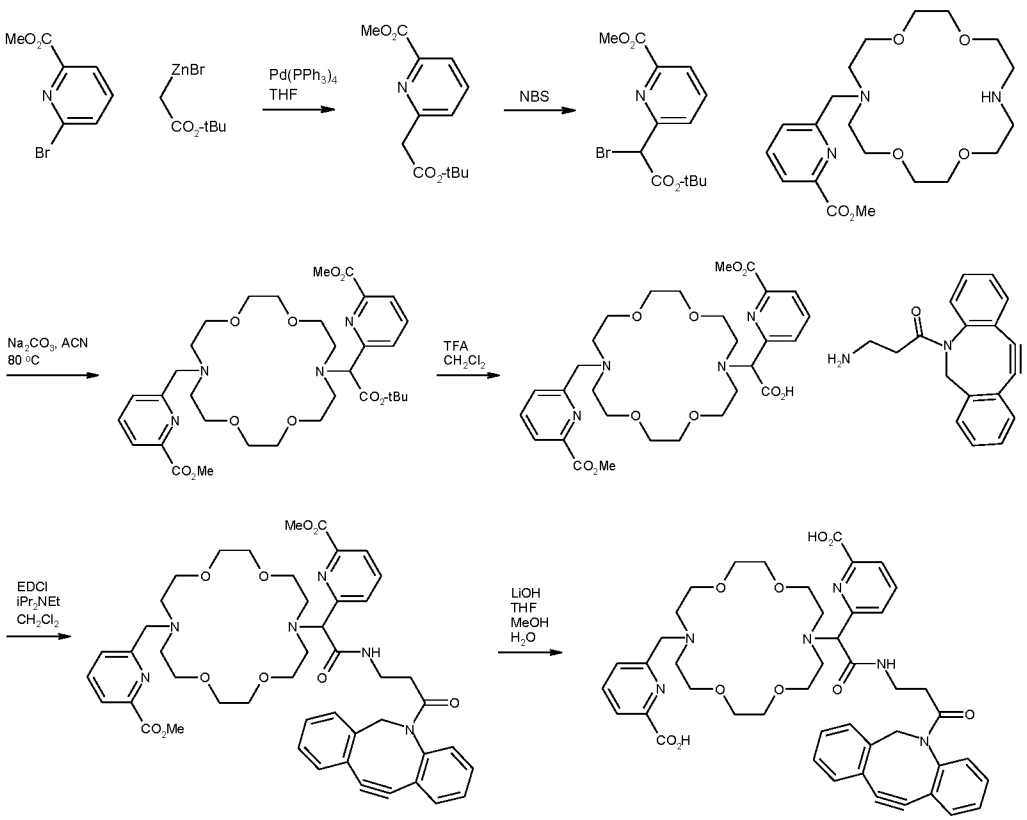
H_2bp18c6-бензил-ацетат-DBCO



H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO

Наприклад, H_2bp18c6-ацетат-DBCO можна синтезувати за Схемою 3.

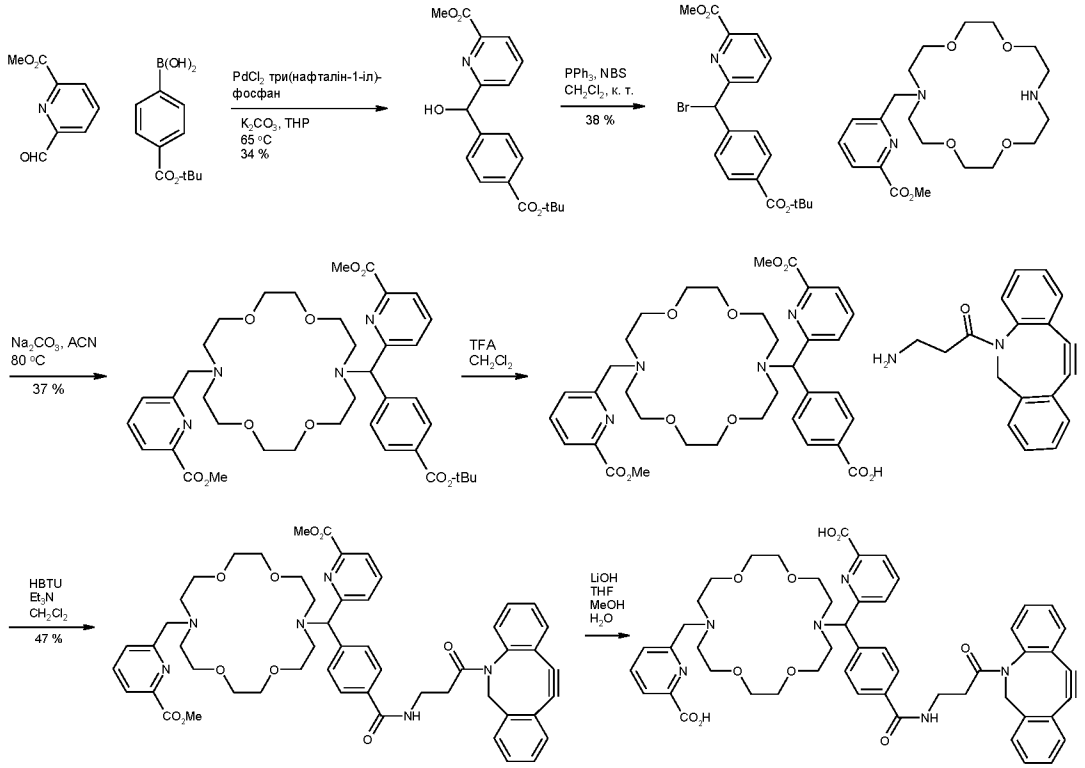
Схема 3: Синтез H_2bp18c6-бензил-ацетат-DBCO



Метил-6-бромпіколінат може реагувати з бромідом 2-трет-бутокси-2-оксоетилцинку в присутності паладієвого каталізатора з одержанням метил-6-(2-(трет-бутокси)-2-оксоетил)піколіната. Подальше бромування NBS та AIBN може дати метил 6-(1-бром-2-(трет-бутокси)-2-оксоетил)піколінат. Реакція заміщення метил-6-(1-бром-2-(трет-бутокси)-2-оксоетил)піколіната на метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколінат в основних умовах реакції може утворювати метил 6-(2-(трет-бутокси)-1-(16-((6-(метоксикарбоніл)піридин-2-іл)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)-2-оксоетил)піколінат. У присутності TFA трет-бутиловий естер можна гідролізувати до карбонової кислоти. Утворення амідного зв'язку з дибензоциклооктин-аміном і подальший гідроліз метилових естерів гідроксидом літію може дати H_2bp18c6-бензил-ацетат-DBCO.

H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO синтезують за Схемою 4.

Схема 4: Синтез H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO



THF (5 мл) додавали до суміші метил-6-формілпіколіната (165 мг, 1,0 ммоль), (4-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)борної кислоти (444 мг, 2,0 ммоль), $PdCl_2$ (8,9 мг, 0,05 ммоль), три(нафтален-1-іл)фосфана (20,6 мг, 0,05 ммоль) і K_2CO_3 (415 мг, 3,0 ммоль) в атмосфері N_2 при -78 °C. Суміш продували N_2 і перемішували при кімнатній температурі протягом 0,5 години, потім нагрівали при 65 °C протягом 24 годин. Охолоджену реакційну суміш фільтрували через Celite і фільтрат концентрували. Хроматографія на силікагелі (гептан до 50 % EtOAc в гептані) дала 116 мг (34 % вихід) продукту у вигляді жовтого масла.

Розчин метил 6-((4-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)(гідрокси)метил)піколіната (138 мг, 0,40 ммоль), PPh_3 (126 мг, 0,48 ммоль) і NBS (79 мг, 0,44 ммоль) в CH_2Cl_2 (5 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Додавали більше PPh_3 (63 мг, 0,24 ммоль) і NBS (39 мг, 0,22 ммоль) і перемішували ще одну годину. Реакційний розчин завантажували на колонку з силікагелем. Хроматографія (гептан до 30 % EtOAc в гептані) дала 62 мг (вихід 38 %) продукту у вигляді жовтуватої плівки, що прилипла до стінки колби.

Суміш метил 6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколіната (56 мг, 0,14 ммоль), метил 6-(бром(4-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)метил)піколіната (60 мг, 0,15 ммоль) і Na_2CO_3 (72 мг, 0,68 ммоль) в ACN (1 мл) нагрівали при 80 °C протягом 13 годин. Охолоджену реакційну суміш фільтрували, а фільтрат концентрували. Хроматографія на силікагелі (CH_2Cl_2 до 10 % MeOH у CH_2Cl_2) дає 37 мг (37 % вихід) продукту у вигляді білої твердої речовини.

До розчину метил 6-((4-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)(16-((6-(метоксикарбоніл)піридин-2-іл)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколіната (22 мг, 0,03 ммоль) у CH_2Cl_2 (1,5 мл) при кімнатній температурі додавали TFA (0,5 мл). Розчин перемішували протягом 1 години.

Реакційний розчин концентрували, щоб отримати неочищений продукт у вигляді жовтуватого залишку, який використовували для наступної стадії реакції без подальшого очищення.

До розчину зазначеного вище неочищеного продукту в CH_2Cl_2 (0,5 мл) при 0 °C додавали Et_3N (42 µл, 0,3 ммоль), а потім HBTU (15 мг, 0,04 ммоль). Після перемішування розчину протягом 5 хв при 0 °C додавали дибензоциклооктин-амін у CH_2Cl_2 (0,5 мл). Льодяну баню видаляли і перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. До реакційної суміші додавали воду і тричі екстрагували CH_2Cl_2. Об'єднані екстракти промивали насиченим водним розчином $NaHCO_3$, а потім сольовим розчином, сушили (Na_2SO_4) і фільтрували. Фільтрат концентрували, одержуючи неочищений продукт. Хроматографія на силікагелі (CH_2Cl_2 до 10 % MeOH у CH_2Cl_2) дала 13,2 мг (вихід 47 %) продукту у вигляді безбарвної плівки, що прилипла до стінки колби.

До розчину диметилового естеру H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO (4,8 мг, 0,005 ммоль) у THF/MeOH/H_2O (4:1:1 об./об./об., 0,6 мл) при кімнатній температурі додавали NaOH (1N, 0,1 мл). Після перемішування реакційної суміші при кімнатній температурі протягом 1 години її нейтралізували HCl (1N) до pH=6,5. Реакційну суміш концентрували на роторному випарнику при кімнатній температурі для видалення летких розчинників. Залишок розчиняли у H_2O (4 мл) і ACN (1 мл). Після ліофілізації отримували неочищений продукт у вигляді білої твердої речовини.

Хелатування H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з La(III)

Розчин H2bp18c6-бензилфеніл-DBCO (~1,55 мг/мл=~ 1,7 мМ у 4: 1 об./об. H_2O/ACN, pH ~ 6,5 pH при вимірюванні лакмусовим папером) готували з вищевказаного неочищеного продукту.

Наведений вище розчин H2bp18c6-бензилфенілу (~1,55 мг/мл=~ 1,7 мМ, 50 µл, 0,085 µмоль) обробляли $La(NO_3)_3$ (10 мМ у воді без металів, 50 µл, 0,5 µмоль). Після ретельного перемішування розчин аналізували за допомогою РХМС та ВЕРХ. МС (ES, m/z) 1047 (H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO+La^{+3} - $2H^+$).

Метод ВЕРХ: Колонка XBridge C18 3,5 µм 150×4,6 мм, 100 Å; Рухома фаза A: 0,1 % TFA в H_2O, B: 0,1 % TFA в ACN; градієнт від 10 % до 50 % B за 0-20 хв, градієнт від 50 % до 100 % B за 20-20,1 хв, ізократичний при 100 % B за 20,1-25 хв, градієнт від 100 % до 10 % B за 25-25,1 хв, ізократичний при 10 % B через 25,1-30 хв; швидкість потоку 1 мл/хв; температура колонки 30 °C; об'єм ін'єкції 5 µл.

Хелатування H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з ^{225}Ac(III)

(i) Хелатування з ^{225}Ac(III) при низькому співвідношенні ^{225}Ac/хелатор

У пластиковий флакон послідовно додавали ацетат тетраметиламонію (1М розчин у воді, 10 мкл), H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO (1,7 мМ у H_2O/ACN, 2 µл, ~3,4 нмоль) і $^{225}Ac(NO_3)_3$ (10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 3 мкл, 30 мкКі). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при кімнатній температурі протягом 1 год.

Аналіз iTLC-SG: 0,5 мкл реакційного розчину наносили на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов, описаних тут, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивної активності, що вказує на відсутність вільного Ac-225 в реакційному розчині через 1 годину.

Аналіз ВЕРХ: 5 мкл реакційної суміші розбавляли 95 мкл буфера PBS. Розведену суміш аналізували за допомогою ВЕРХ. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами в одну хвилину. Зібрані фракції залишали при кімнатній температурі на ніч, потім підраховували на гамма-лічильнику. Радіоактивний слід ВЕРХ був побудований на основі активності фракцій.

Стимуляція DTPA: 0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA і суміш інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші було нанесено на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. На фронті розчинника iTLC-SG радіоактивності не виявлено.

(ii) Хелатування з ^{225}Ac (III) при високому співвідношенні ^{225}Ac/хелатор

У пластиковий флакон послідовно додавали ацетат тетраметиламонію (1М розчин у воді, 10 мкл), H_2bp18c6-бензил-феніл-DBCO (0,17 мМ у воді, 2 µ л, ~0,34 нмоль) і $^{225}Ac(NO_3)_3$ (10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 мкл, 50 мкКі). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при кімнатній температурі протягом 2 год. Потім реакцію аналізували за допомогою iTLC-SG та стимуляції DTPA, як описано вище.

Приклад 3. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-IgG4 та ^{225}Ac(III) мічення

Загальний метод приготування радіоімунокон'югатів:

Радіоімунокон'югати, що містять радіометалевий комплекс за даним винаходом, ковалентно зв'язаний з антитілом, отримують шляхом клік-радіомічення. Див. Фігури 2A-2D для схематичного зображення зразкового методу клік-радіомічення для отримання радіоімунокон'югату за винаходом.

Випадкова кон'югація створеного азиду до антитіла

Базовий розчин антитіла (1-10 мг/мл) у 10 мМ ацетату натрію pH 5,2, фосфатно-сольовому розчині pH 7 або іншому сумісному буфері змішували з 20 % (об./об.) 1 М буфером карбонату натрію pH 9 до

кінцевого pH ~9. NHS-PEG4-азид (№ 26130 за каталогом Thermo) розчиняли в DMCO до кінцевої концентрації 100 мМ і додавали 0,2 % (об./об.) маточного розчину для отримання молярного надлишку ~3-10 відносно антитіла (Ab). Реакційну суміш інкубували при 22 °C протягом 10 хвилин із подальшим гашенням із додаванням 1 М тріс pH 7,5 до кінцевої концентрації 50 мМ тріс.

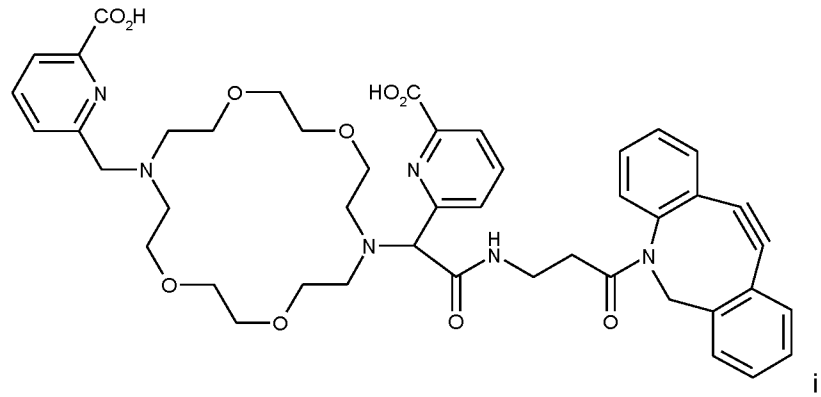
Кон'югат азид-mAb очищували й обмінювали в сумісному буфері (ФБР; 20 мМ HEPES 150 мМ, NaCl pH 7,5; або 10 мМ ацетату натрію pH 5,2) за допомогою такого методу, як колонки Zeba для знесолення з відсічкою 7K MW (Thermo); діаліз; стандартна афінна хроматографія з білком A; або інший сумісний метод. Після очищення кон'югат концентрували до 10-20 мг/мл, використовуючи концентратори Amicon із відсіканням ММ 50 000 (Millipore). Ефективність кон'югації визначали за допомогою РХ-МС.

Сайт-специфічне включення азидоцукрів у глікани антитіл

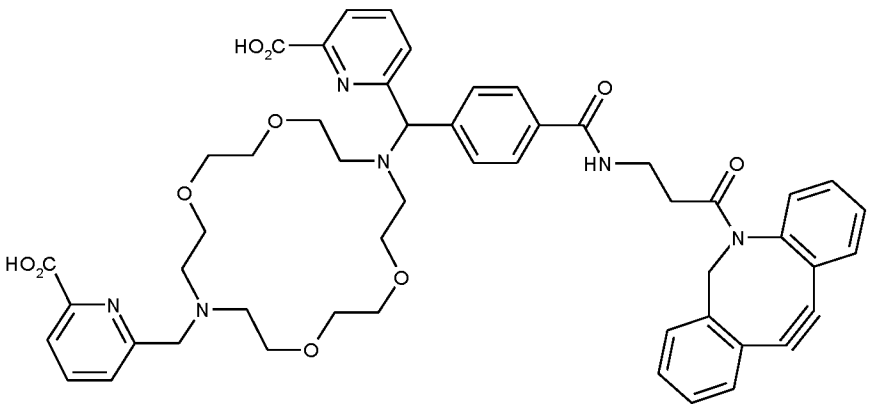
Глікани антитіл тримінгували GlycINATOR (Genovis), бактеріальною ендоглікозидазою, специфічною до β-1,4-зв'язку між залишками GlcNac ядра в сайті (-ах) Fc-глікозилювання, залишаючи інтактним сам внутрішній GlcNAc на Fc, який можна потім було використати для сайт-специфічного введення азидоцукрів. Більш конкретно, іммобілізований на гранулах агарози GlycINATOR, упакований у колонку (Genovis), врівноважували в буферному сольовому тріс-буферному розчині pH 7,4 (TBS). До смоли додавали 1 мл mAb у концентрації 5-10 мг/мл та інкубували на качалці протягом 1 години при КТ. Елюювали mAb центрифугуванням при 100x g протягом 1 хвилини. Колонку елюювали ще 3 рази 0,5 мл TBS. Елюати, які містили тримінговане mAb, об'єднували, а буферну добавку в наборі (Genovis) додавали разом із субстратом азидоцукру UDP-GalNaz і ферментом галактозилтрансферазою GalT. Реакційну суміш інкубували протягом ночі за 30 °C. Кінцеве азидо-mAb очищали за допомогою колонки mAb Select (GE) на приладі AKTA Avant. Азидна модифікація була підтверджена РХ-МС.

Кон'югація хелатора до азидо-Ab

Хелатори винаходу, що містять групу DBCO, такі як:



i



координуються з іоном радіометалу, таким як ^{225}Ac, як описано в Прикладі 1, для отримання радіокомплексу. До розчину радіокомплексу додають випадкове або сайт-специфічне азид-модифіковане антитіло в PBS або іншому сумісному буфері (10-20 мг/мл). Реакційний розчин обережно перемішують і дають постояти при кімнатній температурі протягом 3 годин перед очищенням, наприклад, за допомогою колонки PD-10 (GE Healthcare), попередньо кондиціонованої 15 мл NaOAc буфера, 10 мМ, pH 6-6,5 або іншого сумісного буфера. Чистоту оцінюють за допомогою iTLC-SG. Розчин продукту аналізують за допомогою ВЕРХ на хімічну та радіохімічну чистоту.

Концентрацію антитіл у розчині продукту визначають за UV-поглинанням за допомогою стандартної кривої. Активність розчину продукту кількісно визначають за допомогою калібратора дози Capintec CRC-55TW.

Аналітична характеристика клік-мічених радіоімунокон'югатів

Радіохімічне перетворення (% RA конверсія) визначається за допомогою iTLC-SG (миттєвої тонкошарової хроматографії (iTLC). Радіохімічна чистота (% RA чистота) хелатів Ac-225 визначається за допомогою BP-ВЕРХ (ВЕРХ з виключенням розмірів).

Пряме хелатування 225Ac(III) до H2bp18c6-феніл-IgG4

Наступний спосіб отримання радіоімунокон'югату можна назвати методом "одноетапного прямого радіомічення" (наприклад, як схематично показано на Фіг. 2C). Радіомічення було успішно проведено в умовах без металів, що додатково свідчить про здатність хелатора бути стійким до металевих забруднень.

IgG4, використаний у цьому прикладі, є контролем ізотипу, який зв'язується з антигеном респіраторно-синцитіального вірусу (RSV). Амінокислотні послідовності важкого ланцюга (HC) і легкого ланцюга (LC) IgG4 наведені нижче як SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:2, відповідно:

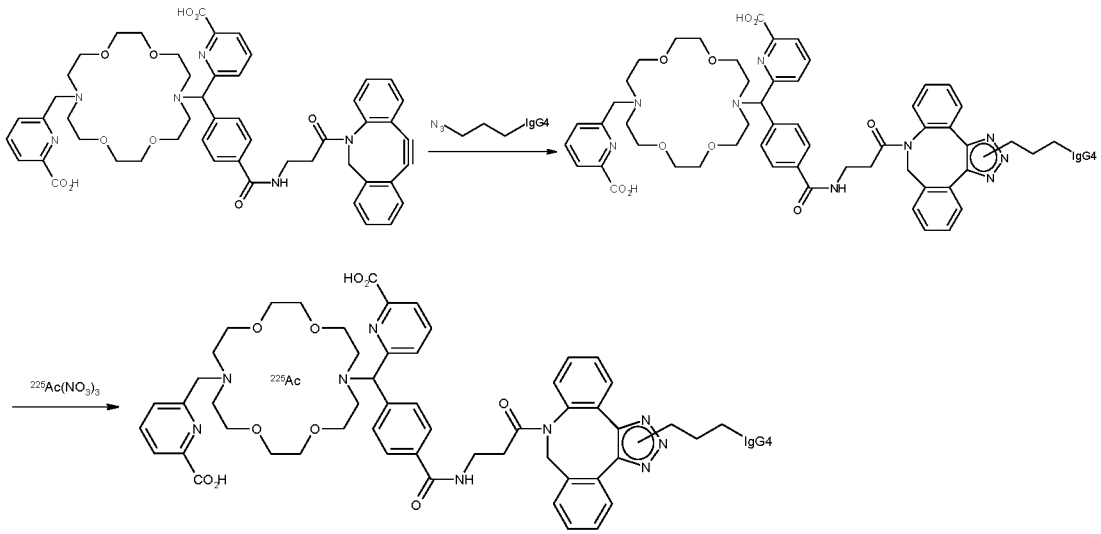
SEQ ID NO:1 mAb HC

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLT
ITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARLYGFTYGFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:2 mAb LC

DIVMTQSPDSLAVSLGERNATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNPESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

Схема 5: Пряме хелатування 225Ac(III) до H2bp18c6-феніл-IgG4 (утворюється при клік-реакції H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з сайт-специфічним азидом-IgG4)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: Вищевказане mAb IgG4 було сайт-селективно модифіковане 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли, використовуючи 100 мМ цитрату натрію pH 3,0, а потім замінюють на 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5 за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO реагував із сайт-специфічним азид-IgG4 (DOL=2) при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5 з подальшими трьома послідовними 15-кратними етапами розведення та концентрування в 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5, з

використанням концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-IgG4 з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 20 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл в 0,1 N HCl, 20 µл, 0,098 мКі) і H2bp18c6-бензилфеніл-DBCO-IgG4 (сайт-специфічний, CAR=2, 1,7 мг/мл у 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5, 36 µл, 61,2 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

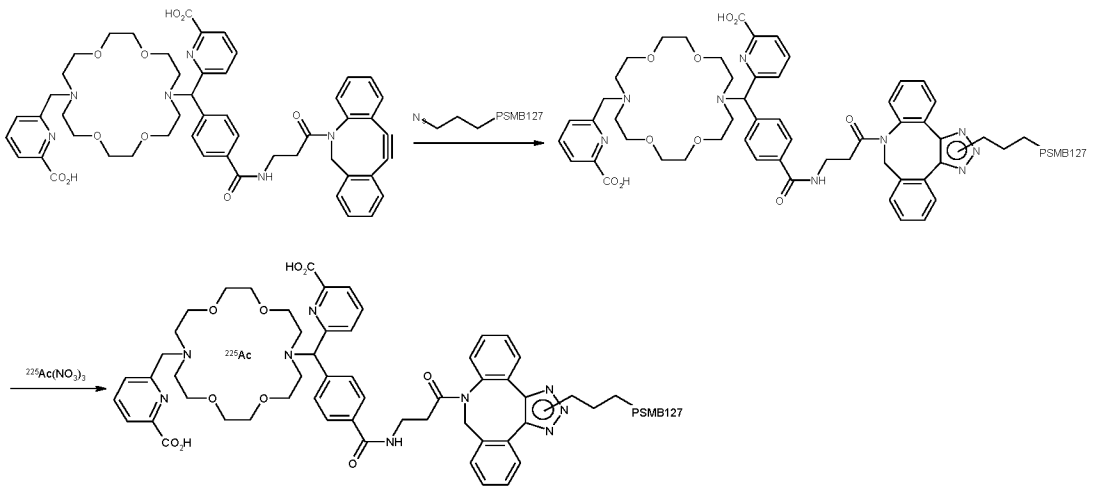
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл × 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз BEPX: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою BEPX. Метод BEPX: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 µм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 30 µл. Після BEPX фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції BEPX залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для BEPX був побудований на основі радіоактивності кожної фракції BEPX. Радіослід BEPX показав радіоактивний пік, що відповідає піку H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-IgG4 на UV-сліді BEPX.

Приклад 4. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-PSMB127 та ^{225}Ac(III) мічення

Схема 6. Пряме хелатування ^{225}Ac(III) до H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-PSMB127 (утворюється клік-реакцією H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з сайт-специфічним азидом-PSMB127)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: PSMB127 було сайт-селективно модифіковане 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою

колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли, використовуючи 100 мМ цитрату натрію pH 3,0, а потім замінюють на 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5 за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO реагував із сайт-специфічним азид-PSMB127 (DOL=2) при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5 з подальшими трьома послідовними 15-кратними етапами розведення та концентрування в 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5, з використанням концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-PSMB127 з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 М у H_2O, 20 µ л) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл в 0,1 N HCl, 20 µл, 0,098 мКі) і H2bp18c6-бензилфеніл DBCO-PSMB127 (сайт-специфічний, CAR=2, 2,8 мг/мл у 20 мМ Hepes, 100 мМ NaCl pH 7,5, 22 µл, 61,6 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

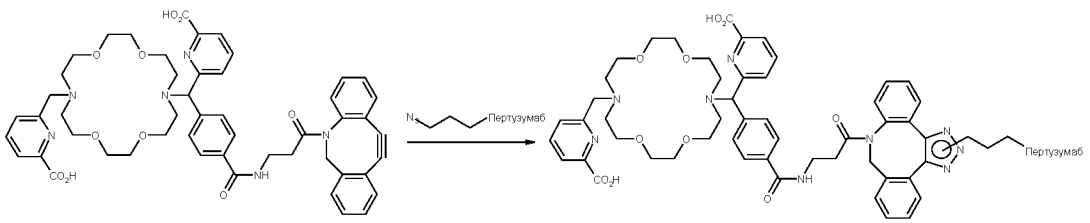
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

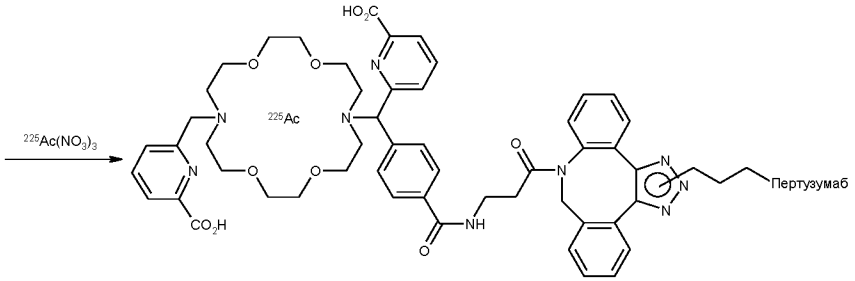
Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 µм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 30 µл. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, що відповідає піку H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-DBCO-PSMB127 на UV-сліді ВЕРХ.

Приклад 5. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-пертузумабу та $^{225}Ac(III)$ мічення

Схема 7. Пряме хелатування $^{225}Ac(III)$ до H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-пертузумабу (утворюється в результаті клік-реакції H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з специфічним азид-пертузумабом)





Азидна модифікація mAb і клік-реакція: Пертузумаб було сайт-селективно модифіковано 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO реагував із сайт-специфічним азид-пертузумабом (DOL=2) у 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-Пертузумаб з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл в 0,1 N HCl, 10 µ л, 0,042 мКі) та H2bp18c6-бензилфеніл DBCO-Пертузумаб (сайт-специфічний, CAR=2, 2,4 мг/мл у буферному розчині PBS, 12,5 µл, 30 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

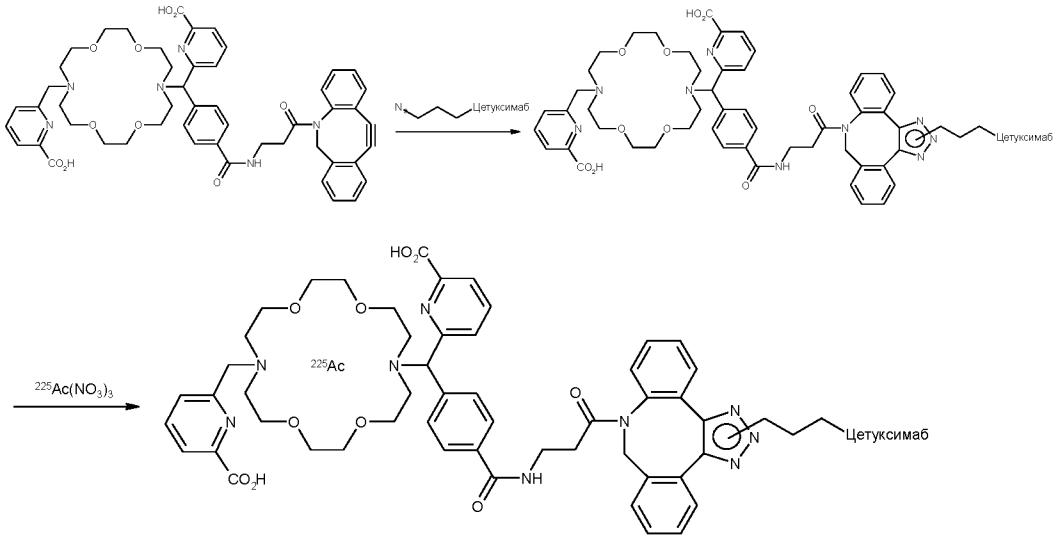
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 µм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 30 µл. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, що відповідає піку H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO- Пертузумаб на UV-сліді ВЕРХ.

Приклад 6. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-цетуксимабу та ^{225}Ac(III) мічення

Схема 8. Пряме хелатування $^{225}Ac(III)$ до H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-цетуксимабу (утворюється в результаті клік-реакції H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з сайт-специфічним азид-цетуксимабом)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: Цетуксимаб сайт-селективно модифіковано 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO реагував із сайт-специфічним азид-цетуксимабом (DOL=2) у 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO- цетуксимаб з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 M в H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл в 0,1 N HCl, 10 µл, 0,044 мКі) і H2bp18c6-бензилфеніл DBCO-Цетуксимаб (сайт-специфічний, CAR=2, 1,8 мг/мл у буферному розчині PBS, 16,7 µл, 30 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

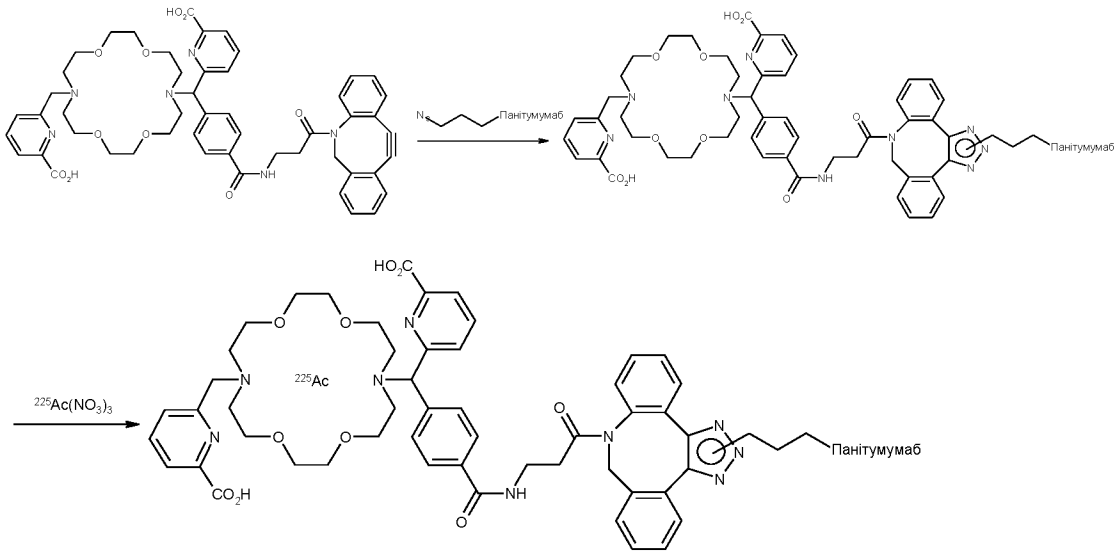
Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на

фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 µм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 30 µл. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, відповідний піку H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-цетуксимабу на ВЕРХ UV-сліді.

Приклад 7. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-панітумумабу та ^{225}Ac(III) мічення

Схема 9. Пряме хелатування ^{225}Ac(III) до H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-панітумумабу (утворюється клік-реакцією H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з сайт-специфічним азид-панітумумабом)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: Панітумумаб сайт-селективно модифіковано 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елююють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO реагував із сайт-специфічним азид-панітумумаб (DOL=2) у 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO- Панітумумаб з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 M в H_2O, 10 µ л) у пластиковому флаконі послідовно додавали ^{225}Ac(NO$_3$)$_3$ (~5 мКі/мл в 0,1 N HCl, 10 µл, 0,043 мКі) і H2bp18c6-бензилфеніл DBCO-Панітумумаб (сайт-специфічний, CAR=2, 2,6 мг/мл у буферному розчині PBS, 11,5 µл, 30 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

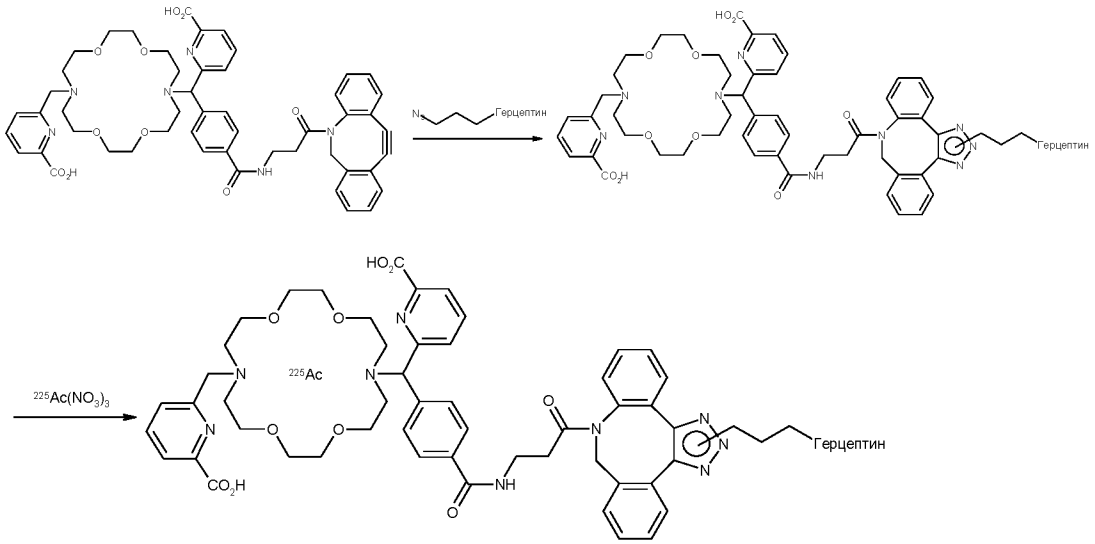
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 30 µл. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, відповідний піку H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-панітумумабу на ВЕРХ UV-сліді.

Приклад 8. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-герцептину та ^{225}Ac(III) мічення

Схема 10. Пряме хелатування ^{225}Ac(III) до H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-герцептину (утворюється клік-реакцією H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з сайт-специфічним азид-герцептином)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: Герцептин сайт-селективно модифіковано 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO реагував із сайт-специфічним азид-герцептином (DOL=2) у 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO- Герцептин з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 М в H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл в 0,1 N HCl, 10 µл, 0,041 мКі) і H2bp18c6-бензилфеніл DBCO-Герцептин (сайт-специфічний, CAR=2, 1,7 мг/мл у буферному розчині PBS, 17,6 µ л, 30 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

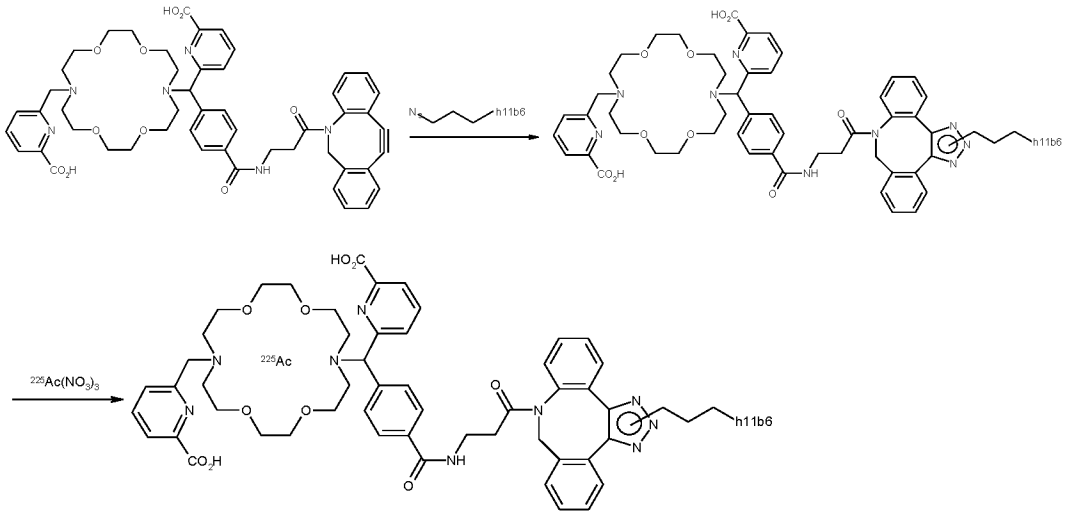
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 30 µл. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, відповідний піку H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-герцептину на UV-сліді ВЕРХ.

Приклад 9. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-H11B6 та ^{225}Ac(III) мічення

Схема 11. Пряме хелатування ^{225}Ac(III) до H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-H11B6 (утворюється клік-реакцією H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO з сайт-специфічним азидом-H11B6)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: H11B6 було сайт-селективно модифіковане 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO реагував із сайт-специфічним азид-H11B6 (DOL=1,82) у 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора

видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-H11B6 з CAR=1,82. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 M в H2O, 10 µ л) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл в 0,1 N HCl, 10 µ л, 0,043 мКі) і H2bp18c6-феніл-DBCO H11B6 (сайт-специфічний, CAR=1,82, 1,2 мг/мл у буферному розчині PBS, 25,0 µл, 30 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

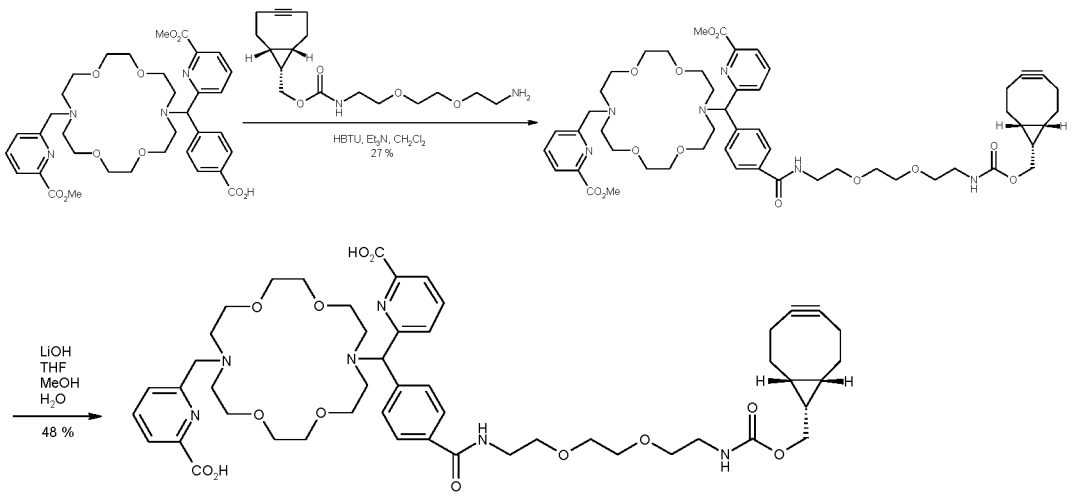
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 30 µл. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, що відповідає піку H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-H11B6 на UV-сліді ВЕРХ.

Приклад 10. Синтез H2bp18c6-феніл-BCN

Схема 12.



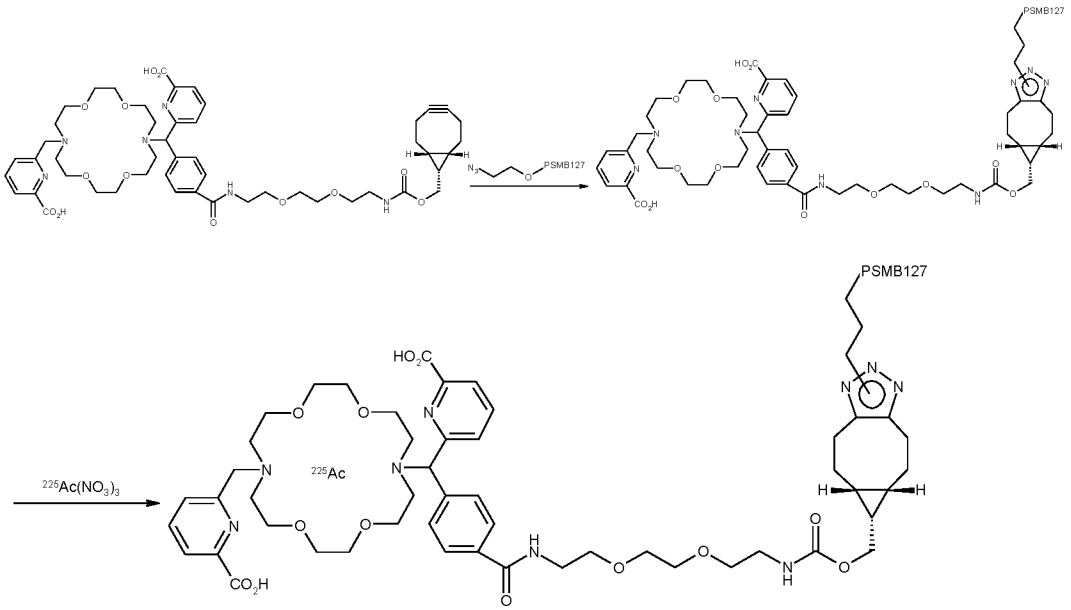
До розчину 4-((6-(метоксикарбоніл)піридин-2-іл)(16-((6-(метоксикарбоніл)піридин-2-іл)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)бензойної кислоти (50 мг, 0,073 ммоль) та

Et_3N (0,1 мл, 0,73 ммоль) у CH_2Cl_2 (2,5 мл) при 0 °C додавали HATU (37 мг, 0,10 ммоль). Після перемішування розчину протягом 5 хв при 0 °C, додавали N-[(1R, 8S, 9s)-біцикло[6.1.0]нон-4-ін-9-ілметилоксикарбоніл]-1,8-діаміно-3,6 -діоксаоктан у CH_2Cl_2 (1 мл). Холодну баню видаляли і перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. Суміш концентрували і залишок очищали хроматографією на силікагелі, функціоналізованому аміном (CH_2Cl_2 до 10 % MeOH у CH_2Cl_2), одержуючи 19,8 мг (вихід 27 %) продукту у вигляді безбарвної плівки, приклеєної до стінки колби. РХ-МС аналіз показав піки маси/іонів при 987,6 [$M+H^+$].

До розчину метил 6-((4-((1-((1R,8S,9s)-біцикло[6.1.0]нон-4-ін-9-іл)-3-оксо-2,7,10-тріокса-4-азадодекан-12-іл)карбамоїл)феніл)(16-((6-(метоксикарбоніл)піридин-2-іл)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7-іл)метил)піколінату (14,5 мг, 0,015 ммоль) у THF/MeOH/H_2O (4:1:1 об./об./об., 1,8 мл) при кімнатній температурі додавали LiOH (1N, 0,3 мл). Після перемішування реакційної суміші при кімнатній температурі протягом 1 години її нейтралізували HCl (1 N) до pH=6,5. Реакційну суміш концентрували у вакуумі. Залишок очищали хроматографією на функціоналізованому аміном силікагелі (CH_2Cl_2 до 10 % MeOH у CH_2Cl_2) з одержанням 9,5 мг (вихід 48 %) H2bp18c6-бензил-феніл-BCN у вигляді безбарвної плівки, яку розчиняли у H_2O (4 мл) і ACN (1 мл). Після ліофілізації отримували продукт у вигляді білої твердої речовини. Н ЯМР (CD_3OD, 400 МГц) δ 7,91 (д, J=8 Гц, 2Н), 7,84 (т, J=8 Гц, 2Н), 7,81 (д, J=8 Гц, 2Н), 7,60 (д, J=8 Гц, 2Н), 7,53 (д, J=8 Гц, 1Н), 7,46 (д, J=8 Гц, 1Н), 5,24 (с, 1Н), 4,10 (д, J=8 Гц, 2Н), 3,91 (уш. с, 2Н), 3,75-3,58 (м, 22Н), 3,56 (т, J=4 Гц, 2Н), 3,51 (т, J=4 Гц, 2Н), 3,23 (т, J=4 Гц, 2Н), 2,97 (дт, J=8, 4 Гц, 2Н), 2,92-2,82 (м, 4Н), 2,78 (дт, J=8, 4 Гц, 2Н), 2,28-2,08 (м, 6Н), 1,65-1,50 9m, 2Н), 1,39-1,27 (м, 1Н), 0,96-0,84 (м, 2Н). МС (ESI) 981,4 [$M+Na^+$].

Приклад 11. Отримання H2bp18c6-бензил-феніл-BCN-PSMB127 та ^{225}Ac(III) мічення

Схема 13. Пряме хелатування ^{225}Ac(III) до H2bp18c6-бензил-феніл-BCN-PSMB127 (утворюється клік-реакцією H2bp18c6-бензил-феніл-BCN з сайт-специфічним азидом-PSMB127)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: PSMB127 було сайт-селективно модифіковане 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF РХ-МС інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1х dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-бензил-феніл-BCN реагував із сайт-специфічним азид-PSMB127 (DOL=2) у 1х dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції BCN-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 х г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-бензил-феніл-BCN-PSMB127 з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм х 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 М у H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл у 0,1 N HCl, 10 µл, 0,046 мКі) та H2bp18c6-бензилфеніл BCN-PSMB127 (сайт-специфічний, CAR=2, 2,3 мг/мл у буферному розчині PBS, 13,0 µл, 30 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

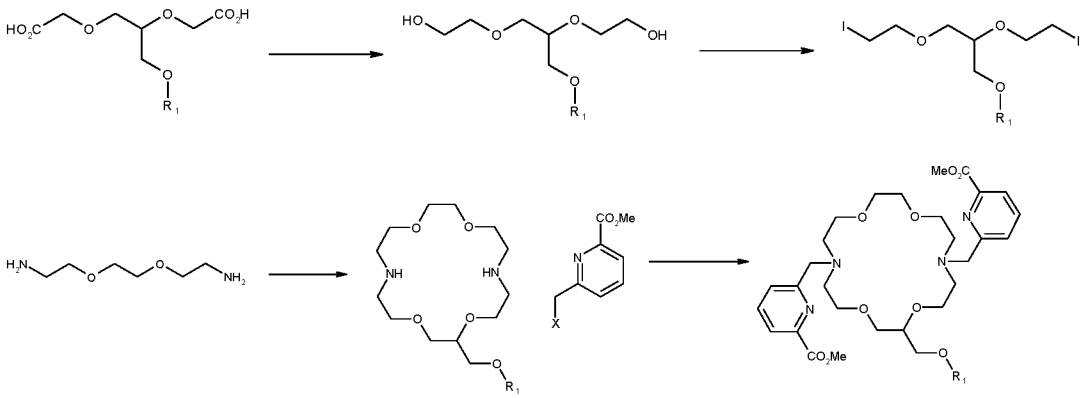
Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 40 µл. Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, що відповідає піку H2bp18c6-бензил-феніл-BCN-PSMB127 на UV-сліді ВЕРХ.

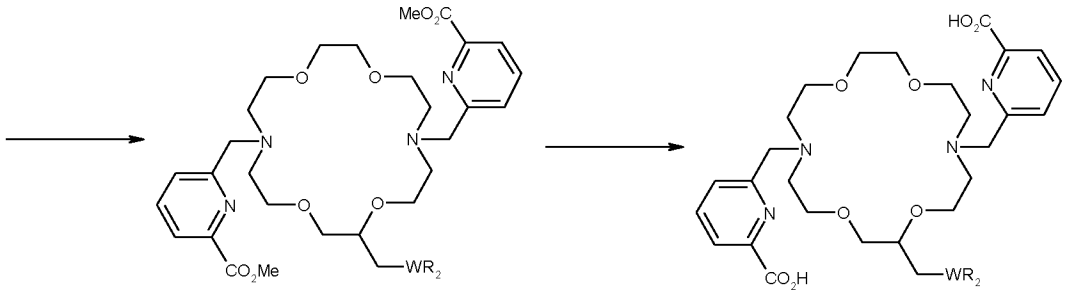
Приклад 12. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO

Похідні H_2bp18c6, заміщені в атомі вуглецю макроциклічного кільця лінкерами для кон'югації з цільовим лігандом, синтезуються, як правило, згідно зі Схемою 14a та Схемою 14b нижче:

Схема 14a: Синтез похідних кільця H_2bp18c6, замінених на атомі вуглецю макроциклічного кільця лінкером для кон'югації



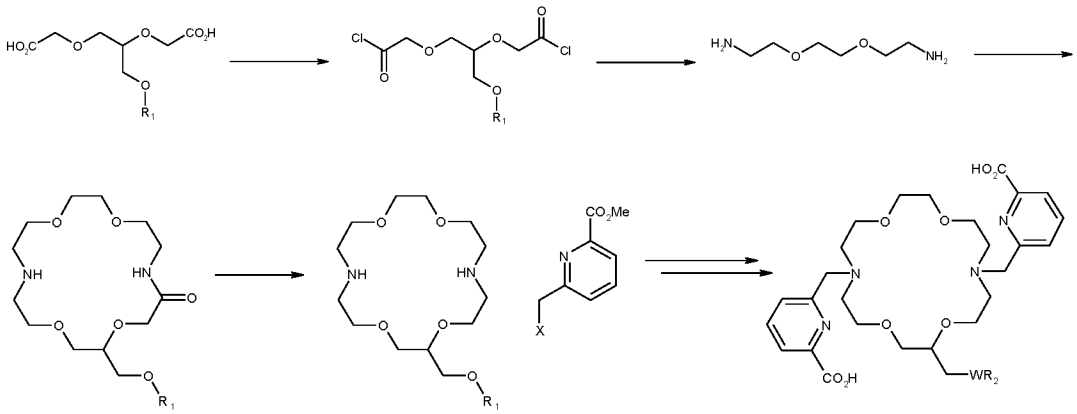
для R_1= аліл або CH_2CH_2OH, див Org. Lett. 2005, 7(6), 1105-1108



OR_1, може бути перетворений в інші функціональні групи для легування WR_2.
R_2 являє собою NH_2, N_3, альдегід, карбоксилат, алкін тощо.
W відсутній або являє собою лінкер, такий як гетроатом, алкіл, акіл з гетроатомом (-ами), заміщений арил тощо.

Синтез діаза-18-краун-6, заміщеного $-CH_2OR_1$, синтезують за допомогою процедур, описаних в Org. Lett. 2005, 7(6), 1105-1108, який згодом реагує з похідним 6-(галогенметил)піколінової кислоти, як описано вище щодо Схем 3 і 4. Функціональна група OR_1 може бути перетворена в іншу функціональну групу WR_2 для лігування або кон'югації з лінкером, цільовим лігандом тощо, включно з, але не обмежуючись, NH_2, N_3, альдегідом, карбоксилатом, алкіном тощо, з або без лінкера W, який являє собою гетероатом, алкіл, алкіл з гетероатомом (-ами), заміщеним (-и) арилом тощо. На Схемі 6a X означає вихідну групу, наприклад галоген, мезилат, тозилат тощо; R_1 являє собою аліл, бензил, спирт тощо; W відсутній або являє собою лінкер, наприклад гетероатом, алкіл, гетероалкіл, заміщений арил тощо; R_2 являє собою NH_2, N_3 альдегід, карбоксилатат, алкініл тощо.

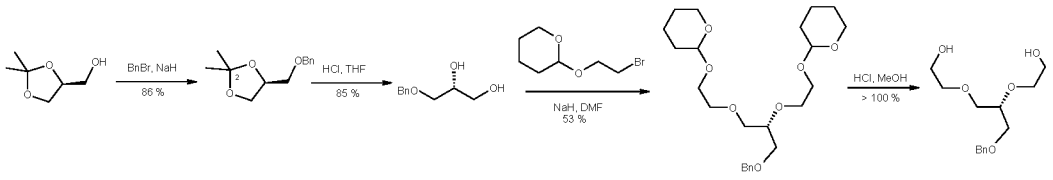
Схема 14b: Синтез похідних кільця H_2bp18c6, замінених на атомі вуглецю макроциклічного кільця лінкером для кон'югації

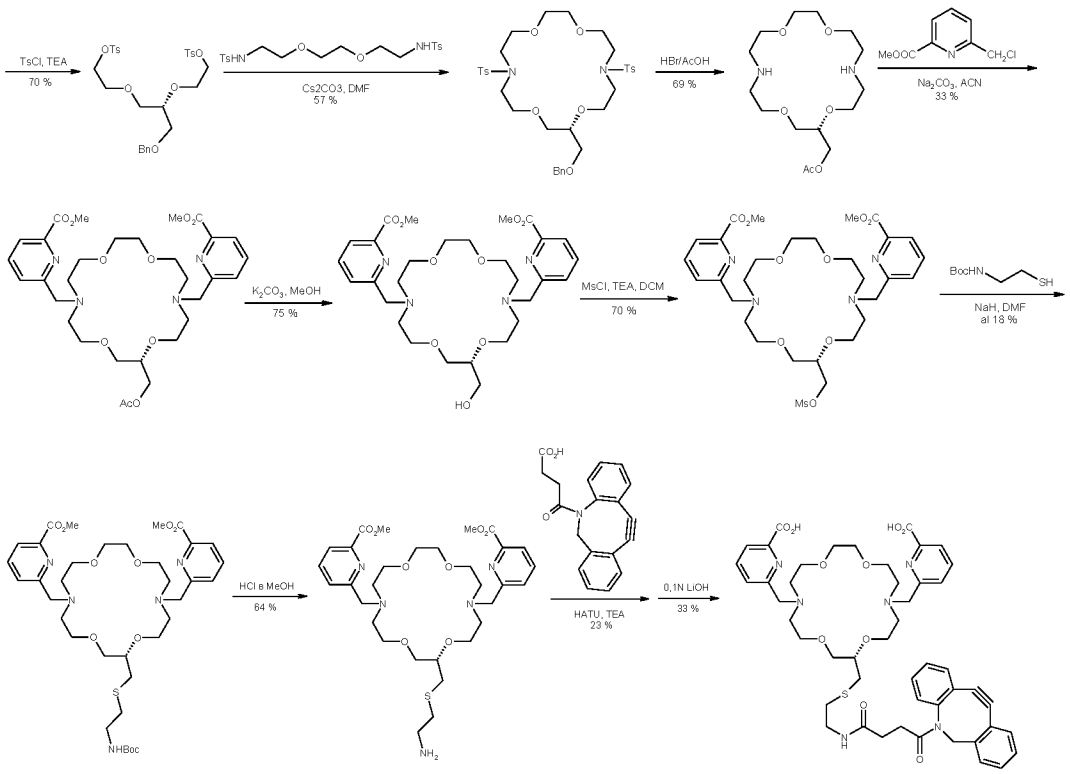


Діаза-18-краун-6, заміщений на $-CH_2OR_1$, також можна синтезувати за допомогою процедур, описаних у Journal of Organic Chemistry, 1988, 53(14), 3190-5 та Journal of Heterocyclic Chemistry, 1986, 23(2), 609-13, який згодом реагує з похідним 6-(галогенметил)піколінової кислоти, як описано вище щодо Схем 3 і 4. Функціональна група OR_1 може бути перетворена в іншу функціональну групу R_2 для лігування або кон'югації з лінкером, цільовим лігандом тощо, включно з, але не обмежуючись, NH_2, N_3, альдегідом, карбоксилатом, алкіном тощо, з або без лінкера W, який являє собою гетероатом, алкіл, алкіл з гетероатомом (-ами), заміщеним (-и) арилом тощо.

Далі описується синтез H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO.

Схема 15.





До розчину (S)-(+)-2,2-диметил-1,3-діоксолан-4-метанолу (50 г, 378 ммоль) у безводному DMFA (500 мл) при 0 °C додавали гідрид натрію (18,16 г, 60 % у мінеральному маслі, 454 ммоль). Після перемішування при цій температурі протягом 10 хвилин до цієї суспензії повільно додавали бензилбромід (77,63 г, 454 ммоль). Реакцію доводили до кімнатної температури через 30 хв і перемішували ще 8 год. Реакційну суміш гасили насиченим розчином хлориду амонію та екстрагували дихлорметаном (2×500 мл). Об'єднаний органічний шар промивали сольовим розчином і сушили над сульфатом натрію. Після видалення розчинника залишок очищали колонковою флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням петролейного етеру та етилацетату з одержанням (S)-4-((бензилокси)метил)-2,2-диметил-1,3-діоксоланета (72 г, 86 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (S)-4-((бензилокси)метил)-2,2-диметил-1,3-діоксолану (72 г, 324 ммоль) у THF (100 мл) додавали 1,5 н. HCl (100 мл) з наступним перемішуванням при кімнатній температурі протягом 16 год. Реакційну суміш розбавляли етилацетатом (500 мл) і нейтралізували 10 % розчином бікарбонату натрію. Реакційну суміш екстрагували етилацетатом (2×500 мл), промивали сольовим розчином, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали колонковою флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням петролейного етеру та етилацетату з одержанням (R)-3-(бензилокси)пропан-1,2-діолу (51 г, 85 %) у вигляді безбарвного масла.

До суспензії гідриду натрію (26,29 г, 60 % у мінеральному маслі, 686 ммоль) у DMFA (20 мл) додавали (R)-3-(бензилокси)пропан-1,2-діол (25,0 г, 137 ммоль) в DMFA (100 мл) по краплях при 0 °C. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Знову охолоджували до 0 °C і по краплях додавали 2-(2-брометокси)тетрагідро-2H-піран (85,89 г, 411 ммоль) у DMFA (100 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакцію гасили насиченим хлоридом амонію та екстрагували етилацетатом (3×300 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Неочищене масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням 2,2'-(((((R)-3-(бензилокси)пропан-1,2-дііл)біс(окси))біс(етан-2,1-дііл))біс(окси))біс(тетрагідро-2H-пірану) (32 г, 53 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину 2,2'-(((((R)-3-(бензилокси)пропан-1,2-дііл)біс(окси))біс(етан-2,1-дііл))біс(окси))біс(тетрагідро-2H-пірану) (32 г, 73,05 ммоль) у 500 мл метанолу додавали 5 мл HCl у діоксані. Реакційну суміш перемішували зі зворотним холодильником протягом 1 години, охолоджували та випарювали. Неочищений продукт (R)-2,2'-((3-(бензилокси)пропан-1,2-дііл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (20 г) використовували на наступному етапі без очищення.

До розчину (R)-2,2'-((3-(бензилокси)пропан-1,2-дііл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (20 г, 74,07 ммоль) у дихлорметані (250 мл) і триетиламіні (53 мл, 370 ммоль) при 10 °C додавали порціями твердий р-толуенсульфонілхлорид (42,2 г, 222 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього

середовища протягом 16 год. Після завершення реакції суспензію розбавляли 1000 мл дихлорметану, промивали холодною 1 M HCl (3 × 100 мл), потім 2 × 500 мл порціями крижаної води, сушили над сульфатом натрію та випарювали до твердої камеді. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (R)-((3-(бензилокси)пропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл)біс(4-метилбензенсульфонат) (30 г, 70 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суміш (R)-((3-(бензилокси)пропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл) біс(4-метилбензенсульфонату) (30 г, 51,9 ммоль) і карбонату цезію (50,76 г, 155,7 ммоль) в 200 мл сухого DMFA перемішували протягом 1,5 год. при температурі навколишнього середовища. До суспензії додавали N,N'-((етан-1,2-діілбіс(окси))біс(етан-2,1-діїл))біс(4-метилбензенсульфонамід) (23,56 г, 51,9 ммоль) у 200 мл DMFA по краплях протягом 2 год. Суміш перемішували ще 20 год. при температурі навколишнього середовища. Розчинник видаляли в умовах зниженого тиску з отриманням твердої пасти. ЇЇ суспендували в 1000 мл дихлорметану і перемішували протягом 30 хв. Тверді речовини, що випали в осад, відфільтровували і фільтрат випарювали у високому вакуумі. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням (R)-2-((бензилокси)метил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекану (24 г, 67 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (R)-2-((бензилокси)метил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекану (24 г, 34,78 ммоль) у бромистоводневій кислоті в оцтовій кислоті (50 %, 100 мл) додавали фенол (16,35 г, 174 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Після завершення реакції її охолоджували до кімнатної температури, оцтову кислоту видаляли у високому вакуумі. Неочищений продукт очищали на колонці з оберненою фазою, використовуючи 0–100 % ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA), щоб отримати (S)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-2-іл)метил ацетат (8,0 г, 69 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суспензію (S)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-2-іл)метилацетату (8,0 г, 23,95 ммоль), метил-6-(хлорметил)піколінат (11,07 г, 59,88 ммоль) і карбонат натрію (12,69 г, 119,75 ммоль) у сухому ацетонітрилі (100 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 год. Після завершення реакції реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через Celite і концентрували при зниженому тиску. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (5,0 г, 33 %) у вигляді коричневої рідини.

До розчину диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (5,0 г, 7,91 ммоль) в метанолі (50 мл) додавали карбонат калію (0,11 г, 0,79 ммоль) при кімнатній температурі і перемішували протягом 10 хв. Після завершення реакції його концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією на діоксиді кремнію (230-400 меш), елюючи градієнтом 0-10 % метанолу в дихлорметані з одержанням диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(R)-дипіколінату (3,5 г, 75 %) у вигляді коричневої рідини.

До розчину диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(R)-дипіколінату (1,0 г, 1,7 ммоль) у дихлорметані (20 мл) додавали триетиламін (0,51 г, 0,70 мл, 5,1 ммоль). До цього розчину при 0 °C по краплях додавали мезилхлорид (0,39 г, 0,26 мл, 3,4 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою TLC. Після завершення реакції його концентрували і неочищений продукт очищали колонковою хроматографією (оксид алюмінію – нейтральний) з використанням метанолу в дихлорметані (1-2 %) в якості елюентів з одержанням диметил 6,6'-((2-(((метилсульфоніл)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (0,7 г, 62 %) у вигляді коричневої рідини.

До розчину трет-бутил (2-меркаптоетил)карбамату (53 мг, 0,3 ммоль) у DMFA (2 мл) додавали гідрид натрію (12 мг, 60 % у мінеральному маслі, 0,3 ммоль) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. До реакційної суміші додавали диметил 6,6'-((2-(((метилсульфоніл)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінат (100 мг, 0,15 ммоль) у DMF (1 мл) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували протягом 2 год. при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою TLC. Після завершення реакції реакційну суміш гасили насиченим розчином хлориду амонію та екстрагували етилацетатом (3×5 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сольовим розчином, сушили над безводним сульфатом натрію і концентрували. Неочищений продукт очищали за допомогою препаративної ВЕРХ з використанням ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA) з отриманням диметил 6,6'-((2-(((2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)етил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (20 мг, 18 %) у вигляді коричневої рідини.

До диметил 6,6'-((2-(((2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)етил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16 -діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (100 мг, 0,15 ммоль) додавали холодний

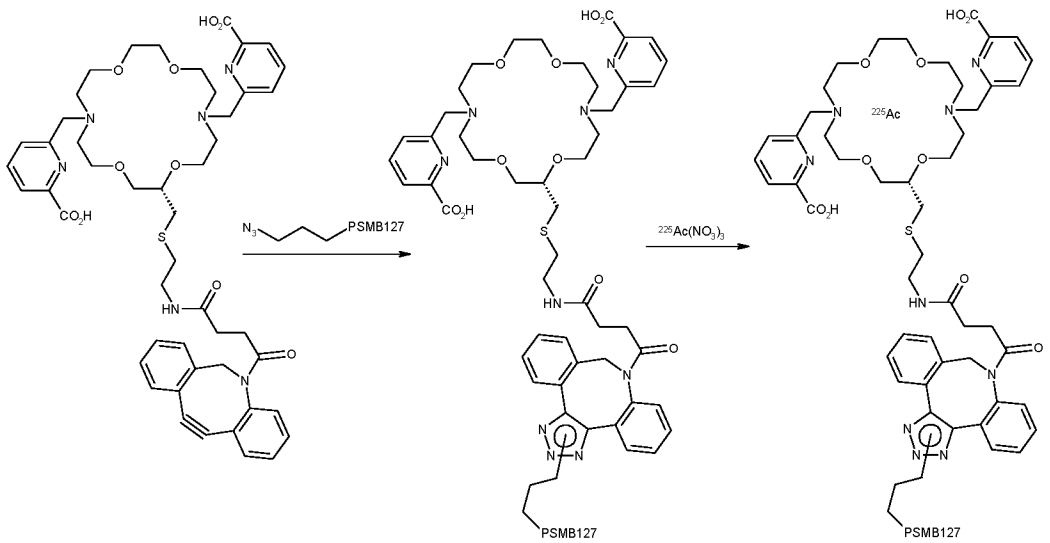
розчин HCl в метанолі (2 мл, 4 н.) і розчин перемішували протягом 2 год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням диметил 6,6'-((2-(((2-аміноетил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату у вигляді жовтої рідини (55 мг, 64 %).

До розчину диметил 6,6'-((2-(((2-аміноетил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (60 мг, 0,09 ммоль) у дихлорметані (0,5 мл) при 0 °C додавали триетиламін (0,04 мл, 0,27 ммоль), а потім HATU (51 мг, 0,13 ммоль). Після перемішування розчину протягом 5 хв при 0 °C додавали DBCO-кислоту (27 мг, 0,09 ммоль) у дихлорметані (0,5 мл). Холодну баню видаляли і перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. До реакційної суміші додавали воду і її екстрагували дихлорметаном (2 мл x 3). Об'єднані екстракти промивали насиченим водним розчином $NaHCO_3$, солбовим розчином, сушили над сульфатом натрію і фільтрували. Фільтрат концентрували, одержуючи неочищений продукт. Хроматографія на силікагелі з використанням дихлорметану та метанолу дала диметиловий етер H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO (20 мг, 23 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину диметилового етеру H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO (20 мг, 0,02 ммоль) в метанолі (0,5 мл) при кімнатній температурі додавали LiOH у H_2O (0,64 мл, 0,1N, 0,06 ммоль). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 16 год. її нейтралізували оцтовою кислотою до pH=6,5. Реакційну суміш концентрували на роторному випарнику при кімнатній температурі для видалення летких розчинників. Залишок очищали препаративною ВЕРХ з отриманням H2bp18c6-off Макроцикл -етилсульфід-DBCO (6 мг, 31 %) у вигляді не зовсім білої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для $C_{48}H_{56}N_6O_{10}S$ 909,07; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 909,4. Чистота по РХ-МС: 92,92 % К.Т.: 1,86. Чистота по ВЕРХ: 91,56 % К.Т.: 3,87. ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O): δ 7,83-7,76 (м, 4H), 7,54-7,17 (м, 10H), 4,97-4,90 (м, 1H), 4,80 (с, 4H), 4,23 (с, 4H), 3,78-3,42 (м, 18H), 3,04-3,00 (м, 2H), 2,51-2,39 (м, 3H), 2,31-2,29 (м, 2H), 2,10-2,04 (м, 3H)

Приклад 13. Отримання H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO-PSMB127 і ^{225}Ac(III) мічення

Схема 16. Пряме хелатування ^{225}Ac(III) до H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфіду-DBCO-PSMB127 (утворюється клік-реакцією H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфіду-DBCO з специфічним азидом-PSMB127)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: PSMB127 було сайт-селективно модифіковане 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF РХ-МС інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0, а потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO реагував із сайт-специфічним азидом-PSMB127 (DOL=2) у 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO-PSMB127 з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою

аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл у 0,1 N HCl, 10 µл, 0,048 мКі) та H2bp18c6-off макроцикл сульфід-DBCO-PSMB127 (сайт-специфічний, CAR=2, 2,4 мг/мл у буферному розчині PBS, 10 µл, 24 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

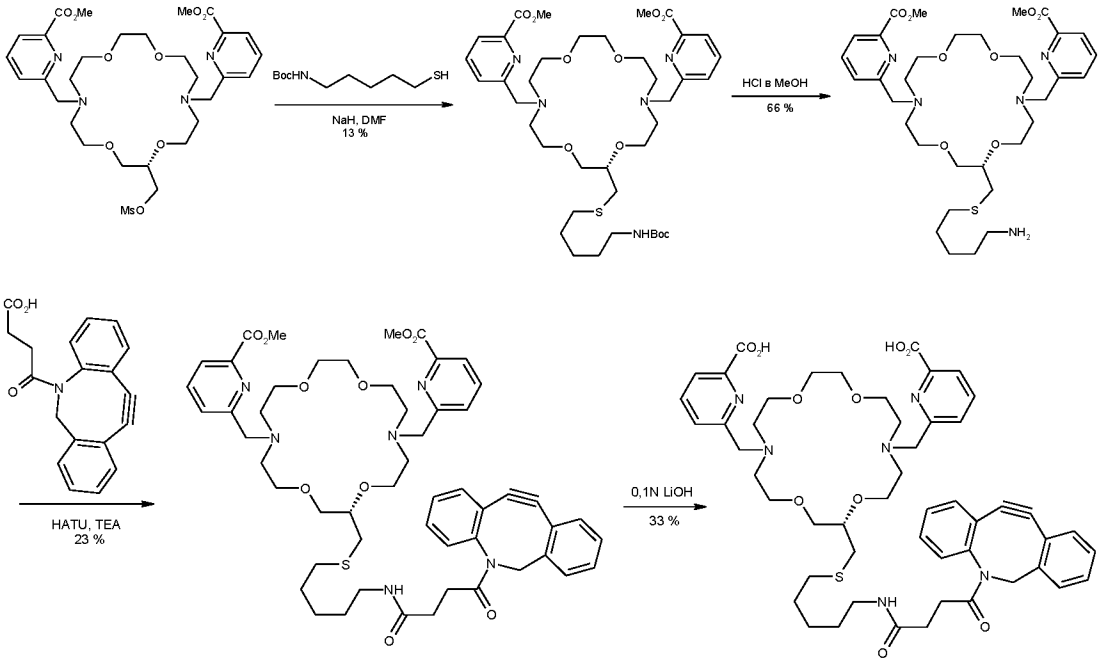
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 NaOAc буфера (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6–6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції № 3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію № 3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 40 мкл Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, відповідний піку H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO-PSMB127 на UV-сліді ВЕРХ.

Приклад 14. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO

Схема 17.



До розчину трет-бутил (5-меркаптопентил)карбамату (65 мг, 0,3 ммоль) у DMFA (2 мл)

додавали гідрид натрію (12 мг, 60 % у мінеральному маслі, 0,3 ммоль) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували протягом 10 хв при кімнатній температурі. До реакційної суміші додавали диметил 6,6'-((2-(((метилсульфоніл)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінат (100 мг, 0,15 ммоль) у DMF (1 мл) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували протягом 2 год. при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою TLC. Після завершення реакції його концентрували і залишок очищали препаративною ВЕРХ з використанням ацетонітрилу та 0,1 % TFA у воді з одержанням диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (15 мг, 13 %) у вигляді коричневої рідини.

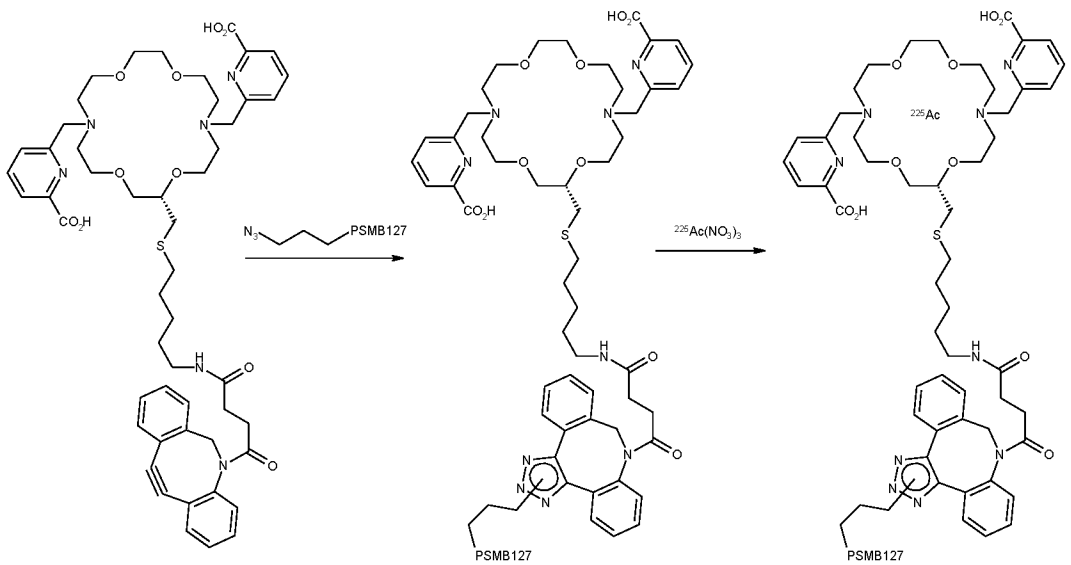
До диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)пентил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (120 мг, 0,15 ммоль) додавали холодний розчин HCl в метанолі (2 мл, 4 н.) і перемішували протягом 2 год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням диметил 6,6'-((2-(((5-амінопентил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (70 мг, 66 %) у вигляді рідини жовтого кольору.

До розчину диметил 6,6'-((2-(((5-амінопентил)тіо)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколінату (50 мг, 0,07 ммоль) у дихлорметані (0,5 мл) при 0 °C додавали триетиламін (0,03 мл, 0,21 ммоль), а потім HATU (38 мг, 0,10 ммоль). Після перемішування розчину протягом 5 хв при 0 °C додавали DBCO-кислоту (21 мг, 0,07 ммоль) у дихлорметані (0,5 мл). Холодну баню видаляли і перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. До реакційної суміші додавали воду і її екстрагували дихлорметаном (2 мл x 3). Об'єднані екстракти промивали насиченим водним розчином $NaHCO_3$, сольовим розчином, сушили над сульфатом натрію і фільтрували. Фільтрат концентрували, одержуючи неочищений продукт. Хроматографія на силікагелі з використанням дихлорметану та метанолу дала диметиловий етер H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO (16 мг, 23 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину диметилового етеру H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO (16 мг, 0,01 ммоль) у метанолі (0,5 мл) при кімнатній температурі додавали LiOH у H_2O (0,49 мл, 0,1 н., 0,05 ммоль). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 16 год. її нейтралізували оцтовою кислотою до pH=6,5. Реакційну суміш концентрували на роторному випарнику при кімнатній температурі для видалення летких розчинників. Залишок очищали препаративною ВЕРХ з отриманням H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO (5 мг, 33 %) у вигляді брудно-білої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C51H62N6O10S; 951,15; Спостерігається m/z [M+H] $^+$ 951,4. Чистота по РХ-МС: 94,51 % К.Т.: 1,98. Чистота по ВЕРХ: 98,41 % К.Т.: 4,13. ^{1}H ЯМР (400 МГц, D_2O): δ 7,81-7,75 (м, 4H), 7,52-7,17 (м, 10H), 4,97-4,90 (м, 1H), 4,80 (с, 4H), 4,14 (с, 3H), 3,77-3,46 (м, 16H), 3,10 (с, 7H), 2,83-2,80 (м, 2H), 2,55-2,53 (м, 2H), 2,42-2,38 (м, 3H), 2,11-2,08 (м, 3H), 1,39-1,35 (м, 2H), 1,20-1,10 (м, 4H).

Приклад 15. Отримання H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO-PSMB127 і ^{225}AC(III) мічення

Схема 18. Пряме хелатування ^{225}Ac(III) до H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO-PSMB127 (утворюється клік-реакцією H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO з сайт-специфічним азидом-PSMB127)



Азидна модифікація mAb і клік-реакція: PSMB127 було сайт-селективно модифіковане 100-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO реагував із сайт-специфічним азидом-PSMB127 (DOL=2) в 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO-PSMB127 з CAR=2. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення: До розчину NaOAc (3 М у H_2O, 10 µ л) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~5 мКі/мл у 0,1 N HCl, 10 µл, 0,047 мКі) та H2bp18c6-off макроцикл сульфід-DBCO-PSMB127 (сайт-специфічний, CAR=2, 2,8 мг/мл у буферному розчині PBS, 8 µл, 22 мкг). Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

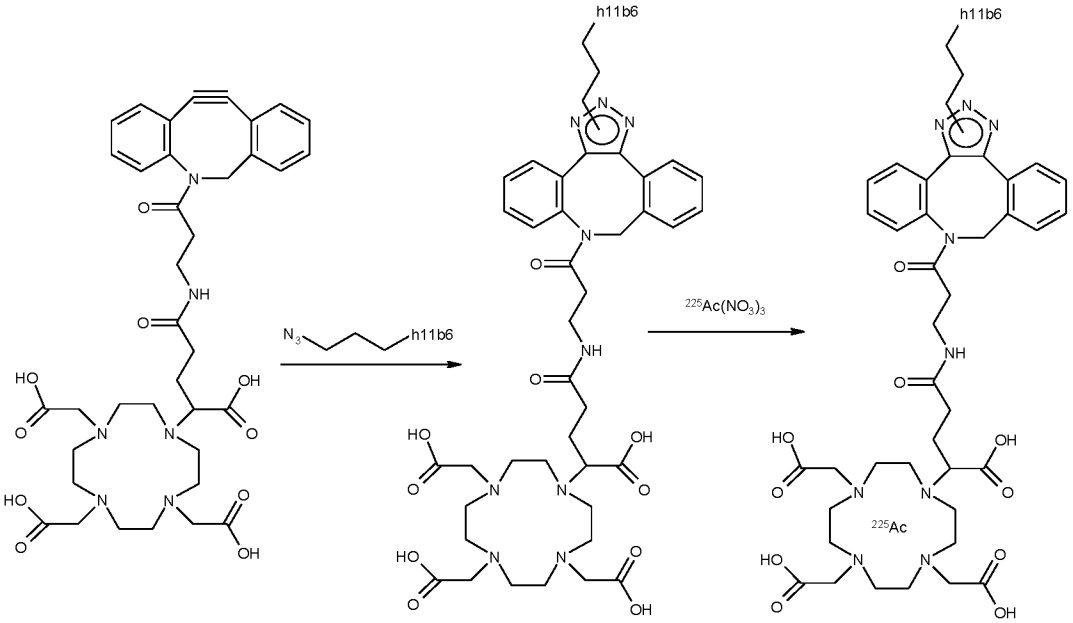
Очищення: Реакційну суміш очищали на колонці PD-10: Смолу PD-10 кондиціонували в буферному розчині NaOAc, пропускаючи 5 мл x 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) через колонку та видаляючи змиви. Всю реакційну суміш наносили в резервуар колонки, а елюат збирали в попередньо пронумеровані пластикові пробірки. Реакційний флакон промивали 0,2 мл x 3 буферного розчину NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) і змиви піпетували в резервуар колонки PD-10 і збирали елюат. Кожна пробірка містила ~1 мл елюату. Подальше застосування буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) у резервуарі колонки PD-10 відбувалося до досягнення загального об'єму елюювання 10 мл.

Стимуляція DTPA: 10 мкл фракції №3, зібраної після колонки PD-10, змішували з 15 мкл 10 мМ розчину DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA і сушили протягом ночі. Сканували на радіо-TLC сканері Bioscan AR-2000. За умов, описаних в цьому документі, вільний Ac-225 мігрує разом з розчинником на фронт розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігали радіоактивного сигналу, що вказує на відсутність вільного Ac-225 у фракції № 3.

Аналіз ВЕРХ: Фракцію №3, зібрану після колонки PD-10, аналізували за допомогою ВЕРХ. Метод ВЕРХ: Колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; час аналізу 20 хв; об'єм ін'єкції: 40 мкл Після ВЕРХ фракції збирали з інтервалами часу 30 секунд або 1 хвилина. Зібрані фракції ВЕРХ залишали при кімнатній температурі на ніч. Радіоактивність у кожній із зібраних фракцій підраховували за допомогою гамма-лічильника. Радіослід для ВЕРХ був побудований на основі радіоактивності кожної фракції ВЕРХ. Радіослід ВЕРХ показав радіоактивний пік, відповідний піку H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO-PSMB127 на ВЕРХ UV-сліді.

Приклад 16. Отримання DOTA-DBCO-H11B6 (сайт-специфічний) та $^{225}AC(III)$ мічення

Схема 19. Пряме хелатування $^{225}Ac(III)$ до DOTA-H11B6 (сайт-специфічний, утворений клік-реакцією DOTA-DBCO з сайт-специфічним азидом-H11B6)

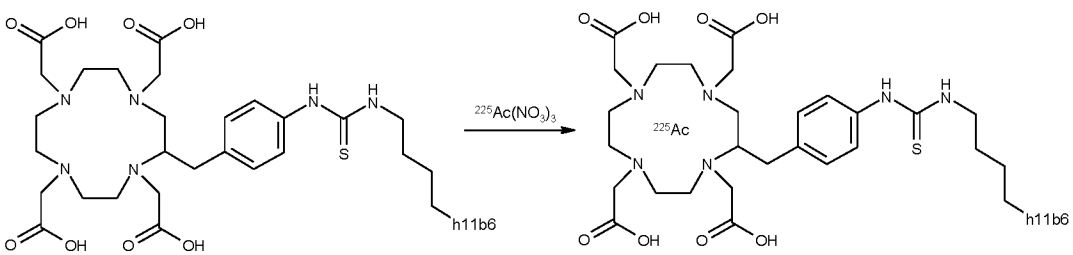


Азидна модифікація mAb і клік-реакція: H11B6 було сайт-селективно модифіковане 200-кратним молярним надлишком 3-азидопропіламіну та мікробної трансглутамінази (MTG; Activa TI) при 37 °C. Додавання двох азидів до важких ланцюгів mAb контролювали за допомогою ESI-TOF PX-MC інтактної маси на приладі Agilent G224. Надлишок 3-азидопропіламіну та MTG очищали за допомогою колонки GE Healthcare MabSelect на 1 мл. Азидо-mAb елюють зі смоли за допомогою 100 мМ цитрату натрію pH 3,0 і потім замінюють на 1x dPBS за допомогою знесолювальної колонки 7K Zeba. 10-кратний молярний надлишок DOTA-DBCO реагував із сайт-специфічним азидом-H11B6 (DOL=1,94) в 1x dPBS при 37 °C протягом 1 години без струшування. Завершення клік-реакції DBCO-азид контролювали за допомогою інтактної мас-спектрометрії. Надлишок вільного хелатора видаляли шляхом знесолення кон'югату на колонці для знесолення Zeba 7K в 1xdPBS з подальшими трьома послідовними 15-кратними стадіями розведення та концентрування в PBS за допомогою концентратора 30K MWCO Amicon шляхом обертання при 3800 x г. Це забезпечило кінцевий сайт-специфічний кон'югат DOTA-DBCO-H11B6 з CAR=1,94. Було підтверджено, що кінцевий кон'югат є мономерним, за допомогою аналітичної розмірної ексклюзійної хроматографії на колонці Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм x 30 см, 5 мкм; температура колонки: кімнатна температура; колонку елюювали буфером DPBS (X1, без кальцію й магнію); швидкість потоку: 0,7 мл/хв; 18 хв початок; об'єм ін'єкції: 18 µL.

Мічення із співвідношенням H11B6: AC-225 на рівні 50: 1: До розчину NaOAc (3 M в H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 µ л) і DOTA-H11B6 (сайт-специфічний, CAR=1,94, 2,4 мг/мл у буферному розчині PBS, 12,5 µл, 30 мкг). Співвідношення H11B6: AC-225 складає 50: 1. Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. Сигнал радіоактивності ~ 21 % спостерігався на фронті розчинника iTLC-SG, що вказує на те, що ~ 79 % Ac-225 було хелатовано в реакційному розчині через 2 години.

Приклад 17. Мічення DOTA-DBCO-H11B6 (випадкова кон'югація) з $^{225}AC(III)$ націлюванням на різні SA

Схема 20. Пряме хелатування 225Ac(III) до DOTA-H11B6 (випадковий сайт)



Мічення із співвідношенням H11B6: AC-225 на рівні 880: 1: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 20 µ л) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 µ л), DOTA-H11B6 (випадковий кон'югат, CAR ~ 2,5, 10 мг/мл у 25 мМ ацетатному буферному розчині, pH 5,5, 50 µ л, 500 µ г) та розчині NaOH (0,1 M, 2 µл). Співвідношення H11B6: AC-225 складає 880: 1. Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

Мічення із співвідношенням H11B6: AC-225 на рівні 440: 1: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 20 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 µл), DOTA-H11B6 (випадковий кон'югат, CAR ~ 2,5, 10 мг/мл у 25 мМ ацетатному буферному розчині, pH 5,5, 25 µл, 250 µ г) та розчині NaOH (0,1 M, 1 µл). Співвідношення H11B6: AC-225 складає 440:1. Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. На фронті розчинника iTLC-SG не спостерігалося радіоактивного сигналу, що вказує на те, що весь Ac-225 був повністю хелатований в реакційному розчині через 2 години.

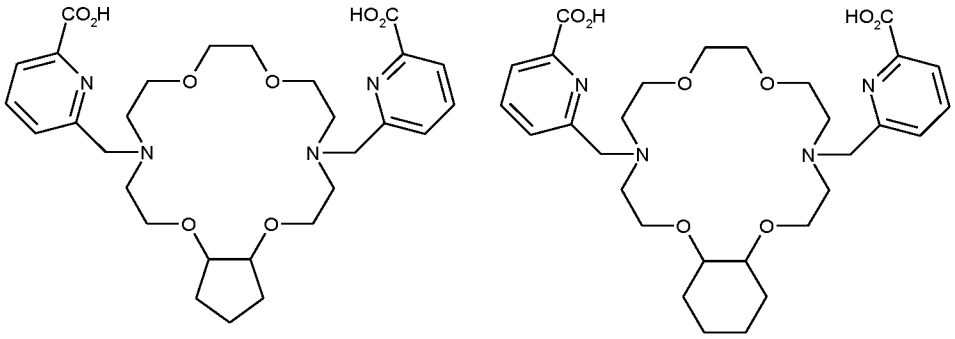
Мічення із співвідношенням H11B6: AC-225 на рівні 220: 1: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 20 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 µ л), DOTA-H11B6 (випадковий кон'югат, CAR ~ 2,5, 10 мг/мл у 25 мМ ацетатному буферному розчині, pH 5,5, 12,5 µл, 125 µ г) та розчині NaOH (0,1 M, 1 µл). Співвідношення H11B6: AC-225 складає 220:1. Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. Сигнал радіоактивності 5 % спостерігався на фронті розчинника iTLC-SG, що вказує на те, що 95 % Ac-225 було хелатовано в реакційному розчині через 2 години.

Мічення із співвідношенням H11B6: AC-225 на рівні 110: 1: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 µл), DOTA-H11B6 (випадковий кон'югат, CAR ~ 2,5, 10 мг/мл в 25 мМ ацетатному буферному розчині, pH 5,5, 6,25 µл, 62,5 µ г) та розчині NaOH (0,1 M, 1 µл). Співвідношення H11B6: AC-225 складає 110:1. Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. Сигнал радіоактивності 71 % спостерігався на фронті розчинника iTLC-SG, що вказує на те, що 29 % Ac-225 було хелатовано в реакційному розчині через 2 години.

Мічення із співвідношенням H11B6: AC-225 на рівні 55: 1: До розчину NaOAc (3 M у H_2O, 10 µл) у пластиковому флаконі послідовно додавали $^{225}Ac(NO_3)_3$ (~10 мКі/мл в 0,1 N HCl, 5 µл) DOTA-H11B6 (випадковий кон'югат, CAR ~2,5, 10 мг/мл у 25 мМ ацетатному буферному розчині, pH 5,5, 3,13 µл, 31,3 µ г) і розчин NaOH (0,1 M, 1 µл). Співвідношення H11B6: AC-225 складає 55:1. Після змішування pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Реакційний розчин залишали при 37 °C протягом 2 год. Потім 0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. Сигнал радіоактивності 64 % спостерігався на фронті розчинника iTLC-SG, що вказує на те, що 36 % Ac-225 було хелатовано в реакційному розчині через 2 години.

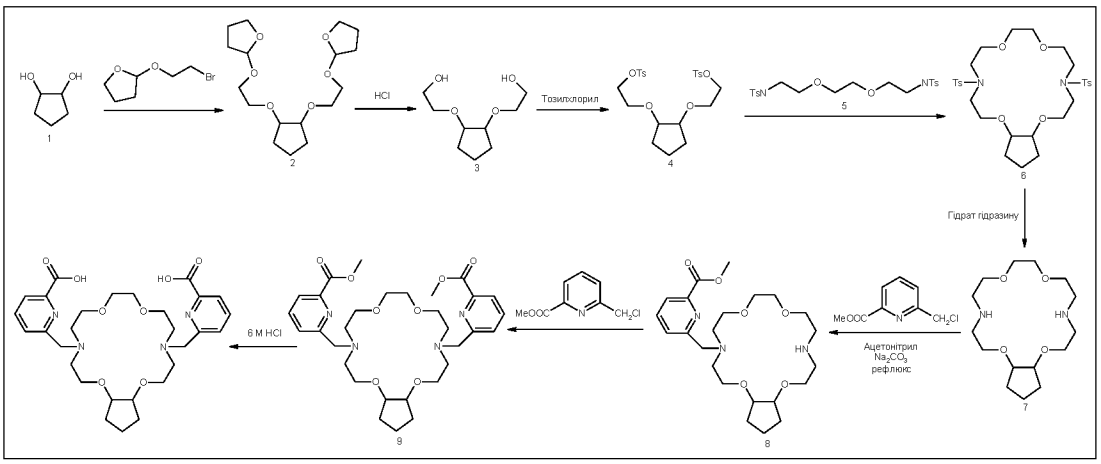
Висновки. Приклади 9, 16 і 17 продемонстрували, що хелатори, що містять DOTA, мають нижчу ефективність хелатування актинія порівняно з хелатором, що містить H2bp18c6.

Приклад 18. Синтез H2bp18c6-цис-циклопентил-конденсованого макроциклу та $^{225}Ac(III)$ хелатування



Наведені вище похідні H_2bp18c6, які мають злиття кільця на макроциклічному кільці, синтезуються, як правило, згідно зі Схемою 21 нижче:

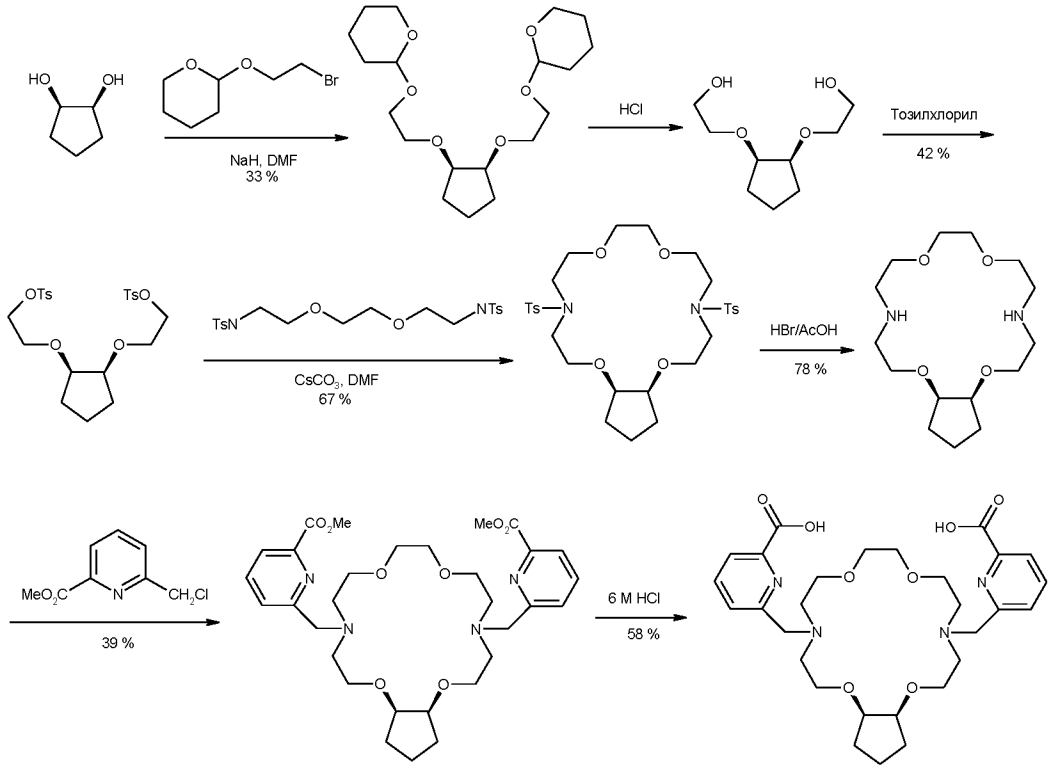
Схема 21: Синтез похідних конденсованого кільця H_2bp18c6



Лінкер для кон'югації з цільовим лігандом можна ввести, наприклад, у "бензильну" позицію шляхом взаємодії проміжного продукту 7 з метил-6-(бром(4-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)метил)піколінатом, як описано вище щодо Схеми 3 і 4. Циклопентан 1,2-діол (сполука 1) можна замінити на циклогексан 1,2-діол для отримання похідного H_2bp18c6, що має конденсацію циклогексильного кільця.

Далі описується синтез макроциклу конденсованого H2bp18c6-цис-циклопентилу.

Схема 22. Синтез конденсованого макроциклу H2bp18c6-цис-циклопентилу



До суспензії гідриду натрію (5,63 г, 60 % в мінеральному маслі, 147,05 ммоль) у DMFA (30 мл) додавали (1R,2S)-циклопентан-1,2-діол (3,0 г, 29,41 ммоль) у DMFA (30 мл) по краплях при 0 °C. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Знову охолоджували до 0 °C і по краплях додавали 2-(2-брометокси)тетрагідро-2H-піран (18,44 г, 88,23 ммоль) у DMFA (30 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакцію гасили насиченим хлоридом амонію та екстрагували етилацетатом (3×500 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Неочищене масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (1R,2S)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклопентану (3,5 г, 33 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (1R,2S)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклопентану (3,5 г, 9,77 ммоль) у 100 мл метанолу додали 1 мл HCl в діоксані, перемішували зі зворотним холодильником протягом 1 години, охолоджували і випарювали, одержуючи 2,2'-(((1R,2S)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (2,0 г), який використовували на наступній стадії без очищення.

До розчину 2,2'-(((1R,2S)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) 2 (2,0 г, 10,52 ммоль) у дихлорметані (50 мл) і триетиламіні (7,60 мл, 52,63 ммоль) при 10 °C додавали порціями р-толуенсульфонілхлорид (6,0 г, 31,56 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 16 год. Після завершення реакції суспензію розбавляли 200 мл дихлорметану, промивали холодною 1 M HCl (3 × 100 мл), потім крижаною водою (2 × 100 мл), сушили над сульфатом натрію та випарювали до одержання твердої камеді. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (((1R,2S)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл)біс(4-метилбензенсульфонат) (2,2 г, 42 %) у вигляді безбарвної рідини.

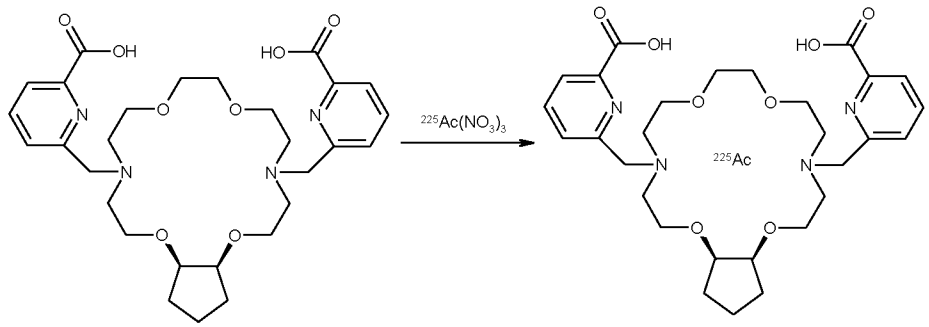
Суміш (((1R,2S)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл)біс(4-метилбензенсульфонату) (2,2 г, 4,42 ммоль) та карбонату цезію (4,32 г, 13,25 ммоль) в 50 мл сухого DMFA перемішували протягом 1,5 год. при температурі навколишнього середовища. До суспензії додавали 1,2-біс(2-(тозил-λ²-азаніл)етокси)етан (2,06 г, 4,42 ммоль) у 50 мл DMFA по краплях протягом 2 год. Суміш перемішували ще 20 год. при температурі навколишнього середовища. Розчинник видаляли в умовах зниженого тиску з отриманням твердої пасти. Її суспендували в 200 мл дихлорметану і перемішували протягом 30 хв. Тверді речовини, що випали в осад, відфільтровували і фільтрат випарювали у високому вакуумі. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (16aR,19aS)-4,13-дитозилтетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (1,8 г, 67 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (16aR,19aS)-4,13-дитозилтетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (1,8 г, 2,95 ммоль) у бромистоводневій кислоті в оцтовій кислоті (50 %, 10 мл) додавали фенол (1,38 г, 14,75 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Після завершення реакції її охолоджували до кімнатної температури і оцтову кислоту видаляли у високому вакуумі. Залишок очищали очищенням колонки з оберненою фазою з використанням 0-100 % ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA) з одержанням (16aR,19aS)-тетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецина (0,7 г, 78 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суспензію (16aR,19aS)-тетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (0,7 г, 2,32 ммоль), метил 6-(хлорметил)піколіната (1,73 г, 5,80 ммоль) і карбоната натрію (0,74 г, 6,96 ммоль) у сухому ацетонітрилі (10 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 год. Після завершення реакції реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через целіт і концентрували при зниженому тиску. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-(((16aR, 19aS)-тетрадекагідро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл)біс(метилен))дипіколіната (0,55 г, 39 %) у вигляді коричневої рідини.

Розчин диметил 6,6'-(((16aR,19aS)-тетрадекагідро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл)біс(метилен))дипіколіната (0,55 г, 0,92 ммоль) у 6 N соляній кислоті (5 мл) нагрівали при 80 °C протягом 5 год. Після завершення реакції реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ з одержанням конденсованого макроциклу H2bp18c6-цис-циклопентилу (0,3 г, 58 %) у вигляді безбарвної клейкої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C29H40N4O8 572,66; Спостерігається m/z [M+H] $^{+}$ 572,9. Чистота по РХ-МС: 99,27 % К.Т.: 1,17. Чистота по ВЕРХ: 99,05 % К.Т.: 2,12. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 7,86-7,84 (м, 4H), 7,59-7,56 (м, 2H), 3,80 (с, 4H), 3,60-3,49 (м, 10H), 3,44-3,41 (м, 4H), 2,75-2,68 (м, 8H), 1,57-1,47 (м, 6H).

Схема 23. Хелатування H2bp18c6-цис-циклопентил-конденсованого макроциклу з ^{225}Ac(III)



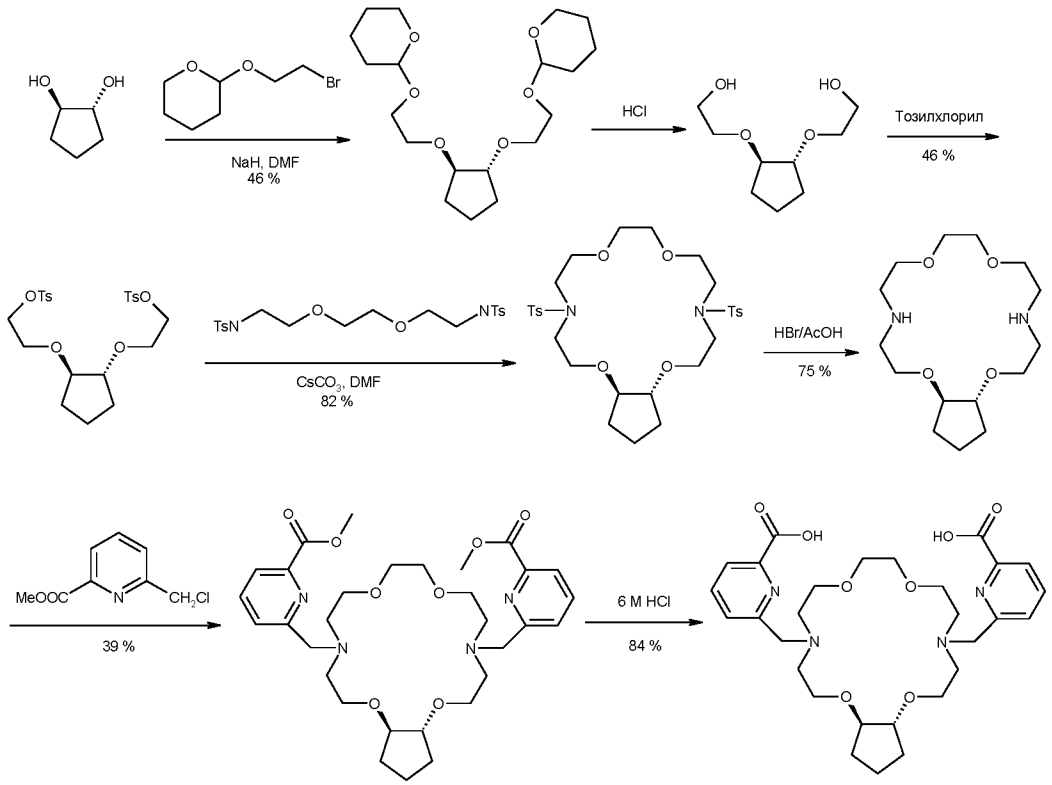
Хелатування з ^{225}Ac(III): Ацетат тетраметиламонію (1M, 10 мкл), H2bp18c6-цис-циклопентил-конденсований макроцикл (2 мг/мл у воді, 3 мкл), ^{225}Ac(NO$_3$)$_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 19. Синтез H2bp18c6-транс-циклопентил-конденсованого макроциклу та ^{225}Ac(III) хелатування

Схема 24. Синтез H2bp18c6-транс-циклопентил-конденсованого макроциклу



До суспензії гідриду натрію (5,63 г, 60 % у мінеральній олії, 147,05 ммоль) у DMFA (30 мл) додавали (1R,2R)-циклопентан-1,2-діол (3,0 г, 29,41 ммоль) у DMFA (30 мл) по краплях при 0 °C. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Знову охолоджували до 0 °C, по краплях додавали 2-(2-брометокси)тетрагідро-2H-піран (18,44 г, 88,23 ммоль) у DMFA (30 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакцію гасили насиченим хлоридом амонію та екстрагували етилацетатом (3 × 500 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Неочищене масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням (1R,2R)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклопентану (4,8 г, 46 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (1R,2R)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклопентану (4,8 г, 13,40 ммоль) у 100 мл метанолу додали 1 мл HCl в діоксані, перемішують зі зворотним холодильником протягом 1 години, охолоджують і випарюють, одержуючи 2'-(((1R,2R)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (2,9 г), який використовували на наступній стадії без очищення.

До 2'-(((1R,2R)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (2,9 г, 10,52 ммоль) у дихлорметані (50 мл) і триетиламіні (11,03 мл, 76,31 ммоль) при 10 °C додавали порціями p-толуенсульфонілхлорид (8,70 г, 45,78 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 16 год. Після завершення реакції суспензію розбавляли 200 мл дихлорметану, промивали холодною 1 M HCl (3 × 100 мл), потім крижаною водою (2 × 100), сушили над сульфатом натрію та випарювали з отриманням твердої камеді. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату у петролейному етері (0-40 %) з отриманням (((1R,2R)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл) біс(4-метилбензенсульфонат) (3,5 г, 46 %) у вигляді безбарвної рідини.

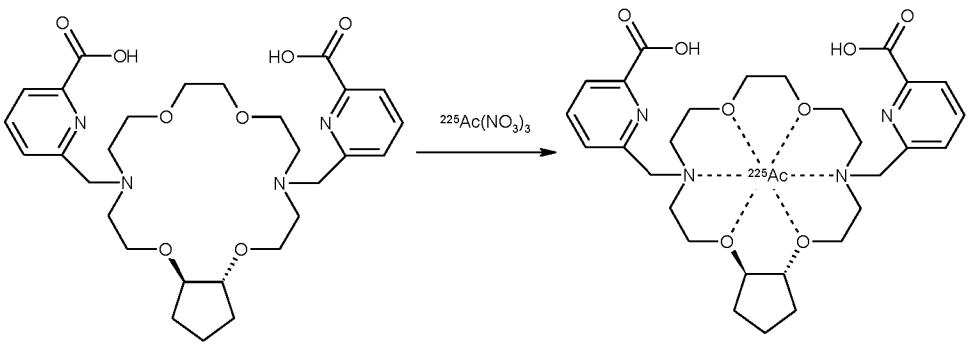
Суміш (((1R,2R)-циклопентан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл) біс(4-метилбензенсульфонат) (3,5 г, 7,03 ммоль) та карбонату цезію (6,87 г, 21,08 ммоль) в 50 мл сухого DMFA перемішували протягом 1,5 год. при температурі навколишнього середовища. До суспензії додавали 1,2-біс(2-(тозил-λ²-азаніл)етокси)етан ((3,19 г, 7,03 ммоль) у 50 мл DMFA по краплях протягом 2 год. Суміш перемішували додатково протягом 20 год. при температурі навколишнього середовища. Розчинник видаляли в умовах зниженого тиску з отриманням твердої пасти. Її суспендували в 200 мл дихлорметану і перемішували протягом 30 хв. Тверді речовини, що випали в осад, відфільтровували і фільтрат випарювали у високому вакуумі. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням (16aR,19aR)-4,13-дитозилтетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (3,5 г, 82 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (16aR,19aR)-4,13-дитозилтетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (3,5 г, 5,73 ммоль) у бромистоводневій кислоті в оцтовій кислоті (50 %, 15 мл) додавали фенол (2,70 г, 28,68 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Після завершення реакції її охолоджували до кімнатної температури і оцтову кислоту видаляли у високому вакуумі. Неочищений матеріал очищали шляхом очищення колонки з оберненою фазою з використанням 0-100 % ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA) з отриманням (16aR,19aR)-тетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецина (1,3 г, 75 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суспензію (16aR,19aS)-тетрадекагідро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (1,3 г, 4,30 ммоль), метил 6-(хлорметил)піколіната (1,99 г, 10,76 ммоль) і карбоната натрію (1,37 г, 12,90 ммоль) у сухому ацетонітрилі (20 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 год. Після завершення реакції реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через целіт і концентрували при зниженому тиску. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-(((16aR,19aR)-тетрадекагідро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл)біс(метилен))дипіколіната (1,0 г, 39 %) у вигляді коричневої рідини.

Розчин диметил 6,6'-(((16aR,19aR)-тетрадекагідро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл)біс(метилен))дипіколіната (1,0 г, 1,66 ммоль) у 6 N соляній кислоті (10 мл) нагрівали при 80 °C протягом 5 год. Після завершення реакції реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ з одержанням конденсованого макроциклу H2bp18c6-транс-циклопентилу (0,8 г, 84 %) у вигляді безбарвної клейкої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C29H40N4O8 572,66; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 573,0. Чистота по РХ-МС: 96,10 % К.Т.: 1,18. Чистота по ВЕРХ: 97,77 % К.Т.: 2,29. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,42 (с, 1H), 9,70 (с, 1H), 8,15-8,09 (м, 4H), 7,80-7,78 (м, 2H), 4,69 (с, 4H), 3,93-3,55 (м, 22H), 1,90-1,85 (м, 2H), 1,57-1,52 (м, 2H), 1,46-1,39 (м, 2H).

Схема 25. Хелатування H2bp18c6-транс-циклопентил-конденсованого макроциклу з ^{225}Ac(III)



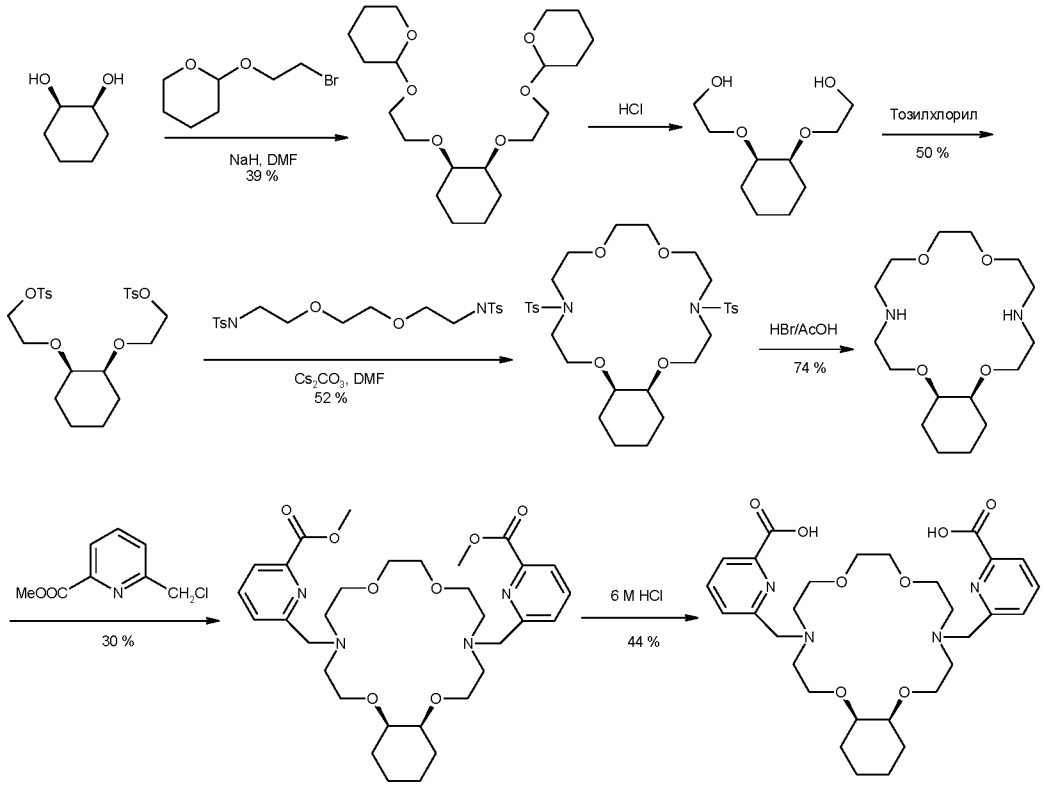
Хелатування з ^{225}Ac(III): Ацетат тетраметиламонію (1M, 10 мкл), H2bp18c6-транс-циклопентил-конденсований макроцикл (2 мг/мл у воді, 3 мкл), ^{225}Ac(NO$_3$)$_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 20. Синтез H2bp18c6-цис-циклогексил-конденсованого макроциклу і хелатування ^{225}Ac(III)

Схема 26. Синтез H2bp18c6-цис-циклогексил-конденсованого макроциклу



До суспензії гідриду натрію (3,3 г, 60 % в мінеральному маслі, 86,20 ммоль) у DMFA (20 мл) додавали (1R,2S)-циклогексан-1,2-діол (2,0 г, 17,24 ммоль) у DMFA (20 мл) по краплях при 0 °C. Реакційну суміш перемішували кімнатній температурі протягом 2 год. Знову охолоджували до 0 °C і по краплях додавали 2-(2-брометокси)тетрагідро-2H-піран (10,81 г, 51,72 ммоль) у DMFA (20 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакцію гасили насиченим хлоридом амонію та екстрагували етилацетатом (3×500 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Неочищене масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (1R,2S)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклогексану (2,5 г, 39 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (1R,2S)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклогексану (2,5 г, 6,7 ммоль) у 100 мл метанолу додали 1 мл HCl в діоксані, перемішували зі зворотним холодильником протягом 1 години, охолоджували і випарювали. Неочищений 2,2'-(((1R,2S)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (1,5 г) використовували на наступній стадії без очищення.

До розчину 2,2'-(((1R,2S)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (1,5 г, 7,35 ммоль) у дихлорметані (25 мл) і триетиламіні (5,31 мл, 36,76 ммоль) при 10 °C додавали порціями p-толуенсульфонілхлорид (4,20 г, 22,05 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 16 год. Після завершення реакції суспензію розбавляли 200 мл дихлорметану, промивали холодною 1 M HCl (3 × 100 мл), потім крижаною водою (2 × 100), сушили над сульфатом натрію та випарювали з отриманням твердої камеді. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням (((1R,2S)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл)біс(4-метилбензенсульфонату) (1,9 г, 50 %) у вигляді безбарвної рідини.

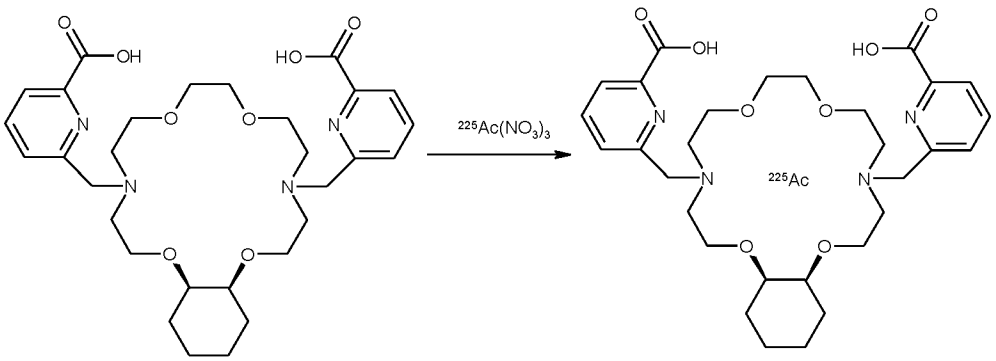
Суміш (((1R,2S)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл) біс(4-метилбензенсульфонату) (1,9 г, 3,71 ммоль) і карбонату цезію (3,63 г, 11,13 ммоль) в 50 мл сухого DMFA перемішували протягом 1,5 год. при температурі навколишнього середовища. До суспензії додавали 1,2-біс(2-(тозил-λ^2-азаніл)етокси)етан (1,68 г, 3,71 ммоль) у 50 мл DMFA по краплях протягом 2 год. Суміш перемішували ще 20 год. при температурі навколишнього середовища. Розчинник видаляли в умовах зниженого тиску з отриманням твердої пасти. Її суспендували в 200 мл дихлорметану і перемішували протягом 30 хв. Тверді речовини, що випали в осад, відфільтровували і фільтрат випарювали у високому вакуумі. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (16aR,20aS)-4,13-дитозилгексадекагідро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (1,2 г, 52 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (16aR,20aS)-4,13-дитозилгексадекагідро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (1,2 г, 1,92 ммоль) у бромистоводневій кислоті в оцтову кислоту (50 %, 5 мл) додавали фенол (0,9 г, 9,61 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Після завершення реакції її охолоджували до кімнатної температури і оцтову кислоту видаляли у високому вакуумі. Залишок очищали очищенням колонки з оберненою фазою з використанням 0-100 % ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA) з одержанням (16aR,20aS)-гексадекагідро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса [7,16]діазациклооктадецина (0,45 г, 74 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суспензію (16aR,20aS)-гексадекагідро-2H, 11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (0,45 г, 1,42 ммоль), метил 6-(хлорметил)піколіната (0,65 г, 3,56 ммоль) і карбоната натрію (0,45 г, 4,26 ммоль) у сухому ацетонітрилі (10 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через целіт і концентрували при зниженому тиску. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-(((16aR,20aS)-гексадекагідро-4H,13H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл)біс(метилен))дипіколіната (0,26 г, 30 %) у вигляді коричневої рідини.

Розчин диметил 6,6'-(((16aR,20aS)-гексадекагідро-4H,13H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл)біс(метилен))дипіколіната (0,26 г, 0,42 ммоль) у 6 N соляній кислоті (5 мл) нагрівали при 80 °C протягом 5 год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ з одержанням продукту H2bp18c6-цис-циклогексил-конденсованого макроциклу (0,11 г, 44 %) у вигляді білої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C30H42N4O8 586,69; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 587,0. Чистота по РХ-МС: 98,15 % К.Т.: 1,31. Чистота по ВЕРХ: 97,78 % К.Т.: 2,32. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,35 (с, 1H), 9,84 (с, 1H), 8,15-8,09 (м, 4H), 7,80-7,78 (м, 2H), 4,70 (с, 4H), 3,97-3,54 (м, 22H), 1,70-1,23 (м, 8H).

Схема 27. Хелатування H2bp18c6-цис-циклогексил-конденсованого макроциклу з ^{225}Ac(III)



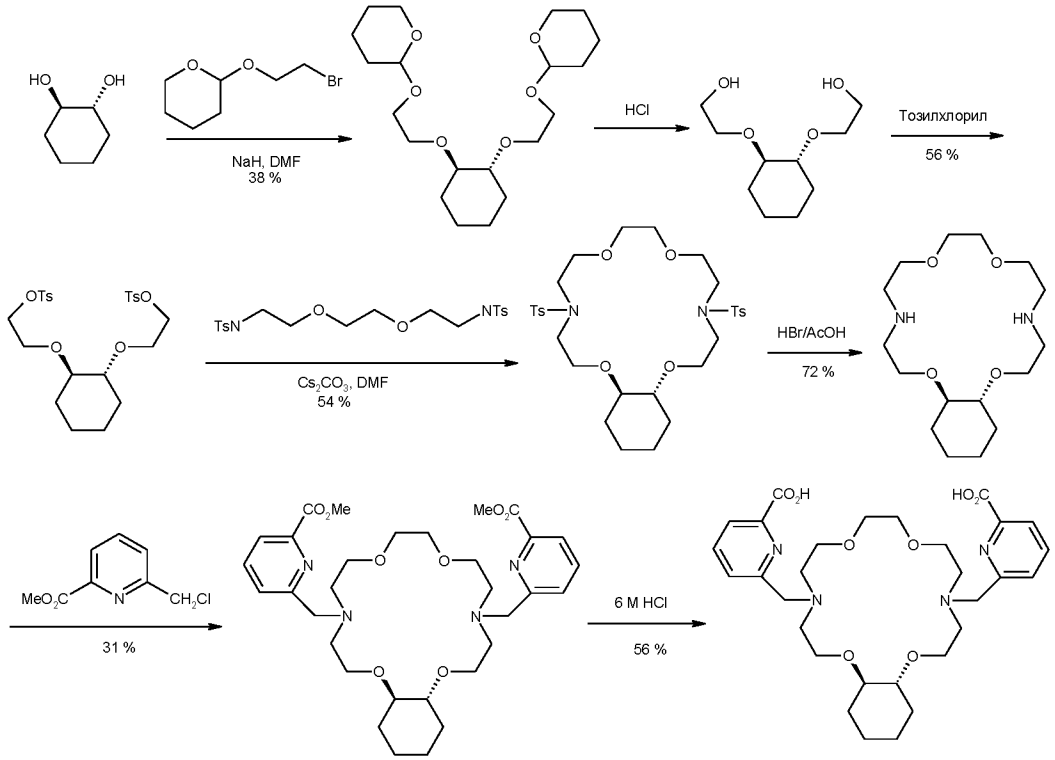
Хелатування з ^{225}Ac(III): Ацетат тетраметиламонію (1M, 10 мкл), H2bp18c6-цис-циклогексил-конденсованого макроциклу (2 мг/мл у воді, 3 мкл), $^{225}Ac(NO_3)_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 21. Синтез H2bp18c6-транс-циклогексил-конденсованого макроциклу та хелатування ^{225}Ac(III)

Схема 28. Синтез H2bp18c6-транс-циклогексил-конденсованого макроциклу



До суспензії гідриду натрію (3,3 г, 60 % у мінеральному маслі, 86,20 ммоль) у DMFA (20 мл) додавали (1R,2R)-циклогексан-1,2-діол (2,0 г, 17,24 ммоль) у DMFA (20 мл) по краплях при 0 °C. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Знову охолоджували до 0 °C і по краплях додавали 2-(2-брометокси)тетрагідро-2H-піран (10,81 г, 51,72 ммоль) у DMFA (20 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакцію гасили насиченим хлоридом амонію та екстрагували етилацетатом (3×500 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Неочищене масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням (1R,2R)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклогексану (2,45 г, 38 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (1R,2R)-1,2-біс(2-((тетрагідро-2H-піран-2-іл)окси)етокси)циклогексану (2,45 г, 6,5 ммоль) у 100 мл метанолу додавали 1 мл HCl в діоксані, перемішували зі зворотним холодильником протягом 1 години, охолоджували і випарювали. Неочищений 2,2'-(((1R,2R)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (1,5 г) використовували на наступній стадії без очищення.

До розчину 2,2'-(((1R,2R)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (1,5 г, 7,35 ммоль) у дихлорметані (25 мл) і триетиламіні (5,31 мл, 36,76 ммоль) при 10 °C додавали порціями p-толуенсульфонілхлорид (4,20 г, 22,05 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 16 год. Суспензію розбавляли ще 200 мл дихлорметану, промивали холодною 1 M HCl (3 × 100 мл), потім крижаною водою (2 × 100 мл), сушили над сульфатом натрію та випарювали з одержанням твердої камеді. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (((1R,2R)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл)біс(4-метилбензенсульфонату) (2,1 г, 56 %) у вигляді безбарвної рідини.

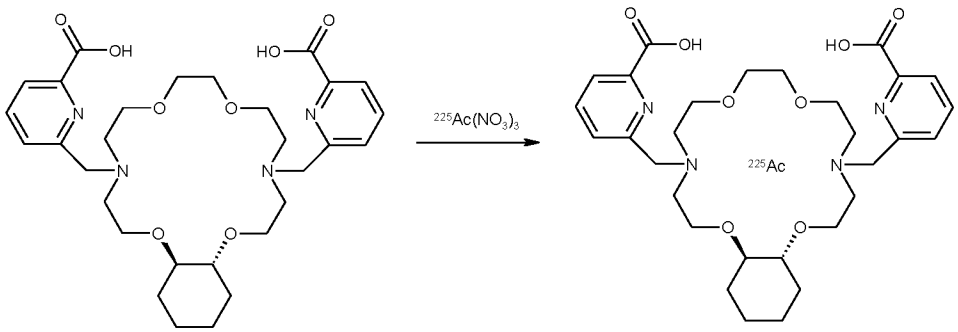
Суміш (((1R,2R)-циклогексан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл) біс(4-метилбензенсульфонату) (2,1 г, 4,1 ммоль) та карбонату цезію (4,01 г, 12,30 ммоль) в 30 мл сухого DMFA перемішували протягом 1,5 год. при температурі навколишнього середовища. До суспензії додавали 1,2-біс(2-(тозил-λ^2-азаніл)етокси)етан (1,86 г, 4,1 ммоль) у 30 мл DMFA по краплях протягом 2 год. Суміш перемішували ще 20 год. при температурі навколишнього середовища. Розчинник видаляли в умовах зниженого тиску з отриманням твердої пасти. Її суспендували в 200 мл дихлорметану і перемішували протягом 30 хв. Тверді речовини, що випали в осад, відфільтровували і фільтрат випарювали у високому вакуумі. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням (16aR,20aR)-4,13-дитозилгексадекагідро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (1,35 г, 54 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину (16aR,20aR)-4,13-дитозилгексадекагідро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (1,35 г, 2,16 ммоль) у бромистоводневій кислоті в оцтову кислоту (50 %, 5 мл) додавали фенол (1,01 г, 1,81 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Її охолоджували до кімнатної температури і оцтову кислоту видаляли під високим вакуумом. Залишок очищали очищенням колонки з оберненою фазою з використанням 0-100 % ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA) з отриманням (16aR,20aR)-гексадекагідро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецина (0,5 г, 72 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суспензію (16aR,20aR)-гексадекагідро-2H, 11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецину (0,5 г, 1,58 ммоль), метил 6-(хлорметил)піколіната (0,73 г, 3,95 ммоль) і карбоната натрію (0,5 г, 4,74 ммоль) у сухому ацетонітрилі (10 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 год. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через целіт і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-(((16aR,20aR)-гексадекагідро-4H, 13H-бензо [b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл)біс(метилен))дипіколіната (0,3 г, 31 %) у вигляді коричневої рідини.

Розчин диметил 6,6'-(((16aR,20aR)-гексадекагідро-4H,13H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]діазациклооктадецин-4,13-діїл) біс(метилен))дипіколіната (0,3 г, 0,49 ммоль) у 6 N соляній кислоті (5 мл) нагрівали при 80 °C протягом 5 год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ з одержанням конденсованого макроциклу H2bp18c6-транс-циклогексила (0,16 г, 56 %) у вигляді білої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C30H42N4O8 586,69; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 587,0. Чистота по РХ-МС: 98,97 % К.Т.: 1,31. Чистота по ВЕРХ: 97,08 % К.Т.: 2,27. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,35 (с, 1H), 9,84 (с, 1H), 8,16-8,10 (м, 4H), 7,80-7,78 (м, 2H), 4,71 (с, 4H), 4,00-3,82 (м, 8H), 3,73-3,53 (м, 12H), 3,20-3,18 (м, 2H), 2,03-2,00 (м, 2H), 1,61-1,60 (м, 2H), 1,15-1,02 (м, 4H).

Схема 29. Хелатування H2bp18c6-транс-циклогексил-конденсованого макроциклу з ^{225}Ac(III)



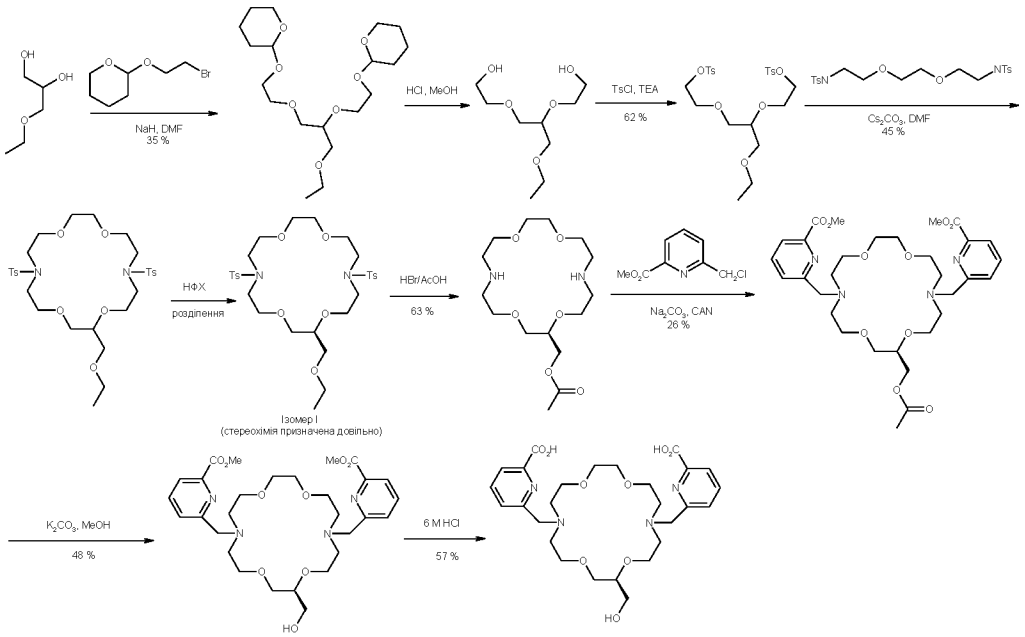
Хелатування з ^{225}Ac(III): Ацетат тетраметиламонію (1M, 10 мкл), H2bp18c6-транс-циклогексил-конденсований макроцикл (2 мг/мл у воді, 3 мкл), $^{225}Ac(NO_3)_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 22: Синтез H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру I та хелатування ^{225}Ac(III)

Схема 30. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру I



До суспензії гідриду натрію (3,33 г, 60 % у мінеральному маслі, 83,33 ммоль) у DMFA (20 мл) по краплях додавали 3-етоксипропан-1,2-діол (2,0 г, 16,66 ммоль) у DMFA (20 мл) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Знову охолоджували до 0 °C і по краплях додавали 2-(2-брометокси)тетрагідро-2H-піран (10,44 г, 49,98 ммоль) у DMFA (20 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакцію гасили насиченим хлоридом амонію та екстрагували етилацетатом (3×500 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок масла очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням 2,2'-((((3-етоксипропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл))біс(окси))біс(тетрагідро-2H-пірану) (2,2 г, 35 %) у вигляді безбарвної рідини.

До розчину 2,2'-((((3-етоксипропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл))біс(окси))біс(тетрагідро-2H-пірану) (2,2 г, 5,85 ммоль) у 50 мл метанолу додавали 1 мл HCl у діоксані. Реакційну суміш перемішували зі зворотним холодильником протягом 1 години, охолоджували та випарювали. Неочищений 2,2'-((3-етоксипропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (1,3 г) використовували на наступному етапі без очищення.

До розчину 2,2'-((3-етоксипропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-1-ол) (1,3 г, 6,25 ммоль) у дихлорметані (30 мл) і триетиламіні (4,51 мл, 31,25 ммоль) при 10 °C додавали порціями p-толуенсульфонілхлорид (3,56 г, 18,75 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 16 год. Суспензію розбавляли 200 мл дихлорметану, промивали холодною 1 M HCl (3 × 100 мл), крижаною водою (1 × 100 мл), сушили над сульфатом натрію та випарювали, одержуючи тверду камідь. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з одержанням ((3-етоксипропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл)біс(4-метилбензенсульфонату) (2,0 г, 62 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суміш ((3-етоксипропан-1,2-діїл)біс(окси))біс(етан-2,1-діїл) біс(4-метилбензенсульфонату) (2,0 г, 3,87 ммоль) і карбонату цезію (3,79 г, 11,62 ммоль) у 25 мл сухого DMFA перемішували протягом 1,5 год. при температурі навколишнього середовища. До суспензії додавали 1,2-біс(2-(тозил-λ^2-азаніл)етокси)етан (1,75 г, 3,87 ммоль) у 25 мл DMFA по краплях протягом 2 год. Суміш перемішували ще 20 год. при температурі навколишнього середовища. Розчинник видаляли в умовах зниженого тиску з отриманням твердої пасти. Її суспендували в 200 мл дихлорметану і перемішували протягом 30 хв. Тверді речовини, що випали в осад, відфільтровували і фільтрат випарювали у високому вакуумі. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0-40 %) з отриманням 2-(етоксиметил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекана (1,1 г, 45 %) у вигляді безбарвної рідини. Продукт додатково очищали за допомогою НФХ, щоб розділити два енантіомери ізомер-I (0,3 г, 12 %) та ізомер-II (0,26 г, 11 %). Стереохімія ізомерів I та II була визначена довільно.

До розчину (S)-2-(етоксиметил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекану (ізомер I, 0,3 г, 0,48 ммоль) у бромистоводневій кислоті в оцтовій кислоті (50 %, 1 мл) додавали фенол (0,22 г, 2,39 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Її охолоджували до кімнатної температури і оцтову кислоту видаляли під високим вакуумом. Залишок очищали колонкою з оберненою фазою з використанням 0-100 % ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA) з

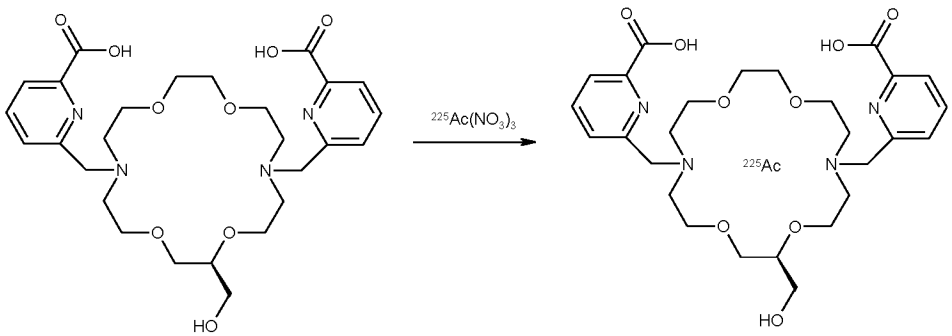
одержанням (R)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-2-іл)метилацетату (стереохімія призначається довільно) (0,1 г, 63 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суспензію (R)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-2-іл)метилацетату (стереохімія призначається довільно) (100 мг, 0,30 ммоль), метил 6-(хлорметил)піколінату (138 мг, 0,75 ммоль) і карбоната натрію (159 мг, 1,5 ммоль) у сухому ацетонітрилі (3 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через целіт і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13- тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен)-(R)-дипіколіната (стереохімія призначається довільно) (50 мг, 26 %) у вигляді коричневої рідини.

До розчину диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен)-(R)-дипіколінату (стереохімія призначена довільно) (50 мг, 0,08 ммоль) в метанолі (1 мл) додавали карбонат калію (1 мг, 0,008 ммоль) при кімнатній температурі і перемішували протягом 10 хв. Концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13- тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))-(S)-дипіколіната (стереохімія визначена довільно) (22 мг, 48 %) у вигляді коричневої рідини.

Розчин диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))-(S)-дипіколінату (стереохімія призначена довільно) (22 мг, 0,04 ммоль) у 6 N соляній кислоті (0,5 мл) нагрівали при 80 °C протягом 5 год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ до H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру I (12 мг, 57 %) у вигляді клейкої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C27H38N4O9 562,62; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 562,8. Чистота по РХ-МС: 96,89 % К.Т.: 1,61. Чистота по ВЕРХ: 96,47 % К.Т.: 1,57. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 3,39 (с, 1H), 9,81 (с, 1H), 8,14-8,09 (м, 4H), 7,80-7,78 (м, 2H), 4,70 (с, 4H), 3,98-3,85 (м, 10H), 3,60-3,42 (м, 15H).

Схема 31. Хелатування H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру I з ^{225}Ac(III)



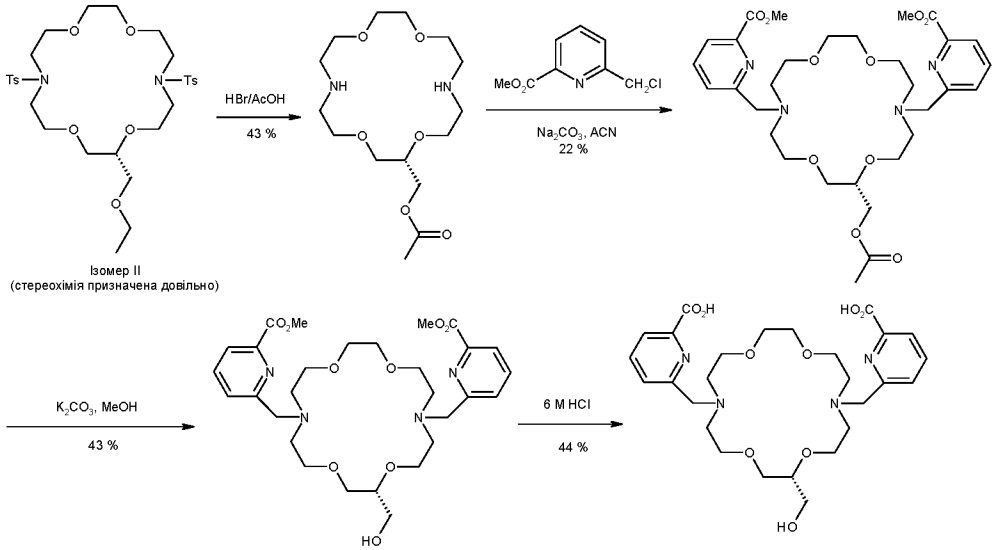
Хелатування з ^{225}Ac(III): Ацетат тетраметиламонію (1M, 10 мкл), H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметил ізомер I (2 мг/мл у воді, 3 мкл), ^{225}Ac(NO$_3$)$_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 23: Синтез H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру II і хелатування ^{225}Ac(III)

Схема 32. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру II



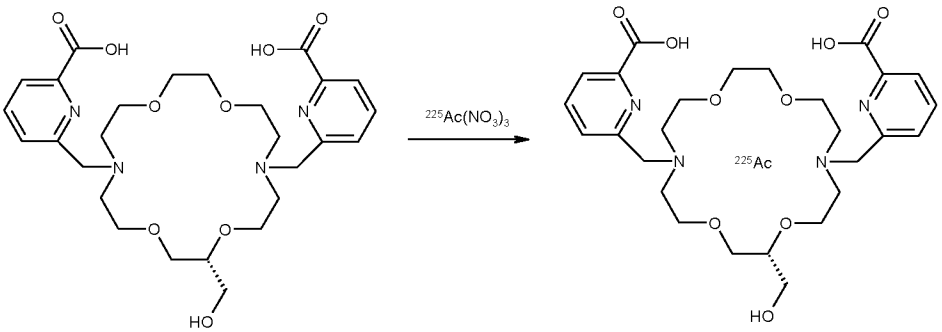
До розчину (R)-2-(етоксиметил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекану (стереохімія визначена довільно) (ізомер II, 0,26 г, 0,42 ммоль) у бромистоводневій кислоті в оцтовій кислоті (50 %, 1 мл) додавали фенол (197 мг, 2,07 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Її охолоджували до кімнатної температури і оцтову кислоту видаляли під високим вакуумом. Залишок очищали колонковим очищенням з використанням 0-100 % ацетонітрилу у воді (0,1 % TFA) з отриманням (S)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-2-іл)метил ацетата (стереохімія визначена довільно) (0,06 г, 43 %) у вигляді безбарвної рідини.

Суспензію (S)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-2-іл)метилацетату (стереохімія визначена довільно) (0,06 г, 0,18 ммоль), метил 6-(хлорметил)піколіната (0,083 г, 0,45 ммоль) і карбоната натрію (0,095 г, 0,9 ммоль) у сухому ацетонітрилі (3 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 год. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через целіт і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230-400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0-10 %) з одержанням диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))-(S)-дипіколіната (стереохімія визначена довільно) (0,025 г, 22 %) у вигляді коричневої рідини.

До розчину диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))-(S)-дипіколіната (стереохімія призначається довільно) (0,025 г, 0,04 ммоль) в метанолі (0,5 мл) додавали карбонат калію (0,5 мг, 0,004 ммоль) при кімнатній температурі. Суміш перемішували протягом 10 хв. Її концентрували при зниженому тиску. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на діоксиді кремнію (230-400 меш) з елююванням градієнтом 0-10 % метанолу в дихлорметані з одержанням диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))-(R)-дипіколіната (0,01 г, 43 %) у вигляді коричневої рідини.

Розчин диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))-дипіколінату (0,01 г, 0,02 ммоль) у 6 N соляній кислоті (0,5 мл) нагрівали при 80 °C протягом 3 год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ з отриманням H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру II (4 мг, 44 %) у вигляді смоляної рідини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C27H38N4O9 562,62; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 562,8. Чистота по РХ-МС: 96,89 % К.Т.: 6,31. Чистота по ВЕРХ: 93,97 % К.Т.: 6,67. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,34 (с, 1H), 9,86 (с, 1H), 8,13-8,11 (м, 4H), 7,80-7,78 (м, 2H), 4,70 (с, 4H), 3,95-3,84 (м, 10H), 3,58-3,42 (м, 15H).

Схема 33. Хелатування H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметилового ізомеру II з ^{225}Ac(III)



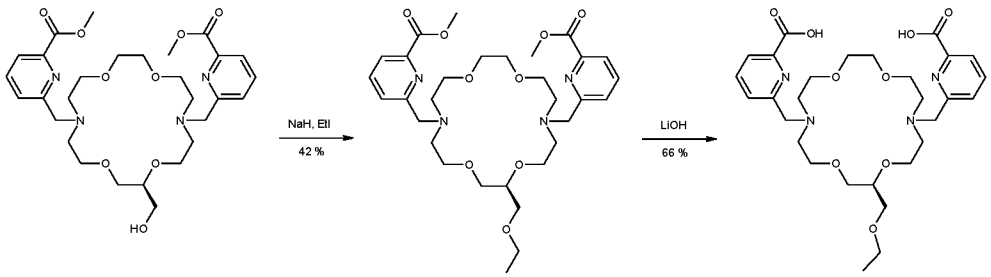
Хелатування з $^{225}Ac(III)$: Ацетат тетраметиламонію (1M, 10 мкл), H2bp18c6-off макроцикл-гідроксилметил ізомер II (2 мг/мл у воді, 3 мкл), $^{225}Ac(NO_3)_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 24: Синтез H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру I та хелатування $^{225}Ac(III)$

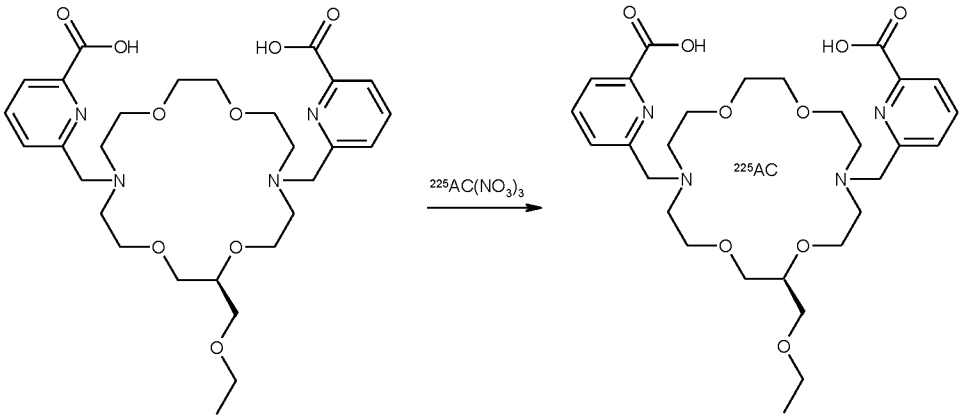
Схема 34. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру I



До перемішуваного розчину диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколіната (100 мг, 0,17 ммоль) (стереохімія призначена довільно) в DMFA (2 мл) при 0 °C в атмосфері азоту повільно додавали гідрид натрію (10 мг, 60 % дисперсія в мінеральному маслі, 0,25 ммоль). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і потім перемішували протягом 10 хвилин. Реакційну суміш знову охолоджували до 0 °C і додавали по краплях розчин етилйодиду (39 мг, 0,25 ммоль, 20 мкл) у DMFA (1 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і потім перемішували при цій температурі протягом 2 годин. Після завершення реакції (контрольованої за допомогою РХМС) реакційну суміш гасили насиченим розчином NH_4Cl та екстрагували етилацетатом. Потім об'єднані органічні екстракти сушили над безводним сульфатом натрію і концентрували. Залишок очищали колонковою флеш-хроматографією на силікагелі (230–400 меш) з використанням 5 % метанолу в дихлорметані в якості елюентів з одержанням продукту диметил 6,6'-((2-(етоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколіната (стереохімія довільно призначена) (45 мг, 42 %) у вигляді рідини коричневого кольору.

До розчину диметил 6,6'-((2-(етоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(S)-дипіколіната (45 мг, 0,07 ммоль) (стереохімія призначена довільно) у THF (0,25 мл), воді (0,5 мл) і метанолі (0,25 мл) додавали моногідрат гідроксиду літію (9 мг, 0,21 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Після завершення реакції (контрольованої за допомогою УВЕРХ-МС) pH реакції доводили до 3–4 за допомогою 1,5 М водного розчину HCl і концентрували. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ з отриманням H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру I (28 мг, 66 %) у вигляді смоляної рідини. РХ-МС XIAT: Розраховано для $C_{29}H_{42}N_4O_9$ 590,30; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 591,2. Чистота по РХ-МС: 99,59 % К.Т.: 1,19. Чистота по ВЕРХ: 96,12 % К.Т.: 2,01. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,40 (с, 1H), 9,75 (с, 1H), 8,16-8,09 (м, 4H), 7,80-7,78 (м, 2H), 4,69 (с, 4H), 3,98-3,34 (м, 28H), 1,06 (т, J = 6,80 Гц, 3H).

Схема 35. Хелатування H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру I з $^{225}Ac(III)$



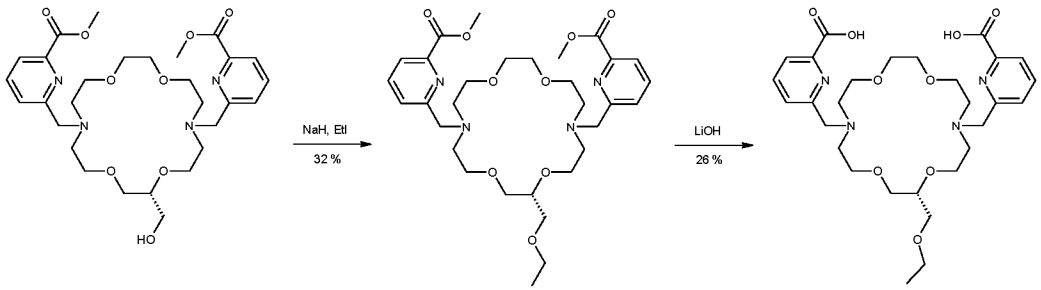
Хелатування з $^{225}Ac(III)$: Ацетат тетраметиламонію (1M, 10 мкл), H2bp18c6-off макроцикл етоксиметиловий ізомер I (1 мг/мл у воді, 1 мкл), $^{225}Ac(NO_3)_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 25: Синтез H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру II і хелатування $^{225}Ac(III)$

Схема 36. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру II

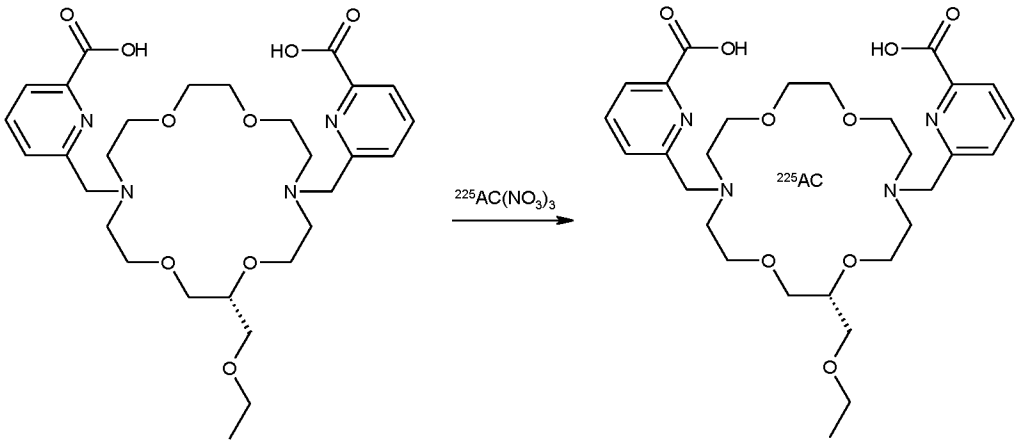


До розчину диметил 6,6'-((2-(гідроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(R)-дипіколіната (стереохімія призначена довільно) (60 мг, 0,1 ммоль) в DMFA (1,5 мл) при 0 °C в атмосфері азоту повільно додавали гідрид натрію (6 мг, 60 % дисперсія в мінеральному маслі, 0,15 ммоль). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і потім перемішували протягом 10 хвилин. Реакційну суміш знову охолоджували до 0 °C і додавали по краплях розчин етилйодиду (23 мг, 0,15 ммоль, 12 мкл) у DMFA (0,5 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і потім перемішували при цій температурі протягом 2 годин. Після завершення реакції (контрольованої за допомогою РХМС) реакційну суміш гасили насиченим розчином NH_4Cl та екстрагували етилацетатом. Потім об'єднані органічні екстракти сушили над безводним сульфатом натрію і концентрували. Залишок очищали колонковою флеш-хроматографією на силікагелі (230–400 меш) з використанням 5 % метанолу в дихлорметані в якості елюентів з одержанням диметил 6,6'-((2-(етоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(R)-дипіколіната (стереохімія призначена довільно) (20 мг, 32 %) у вигляді рідини коричневого кольору.

До розчину диметил 6,6'-((2-(етоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-діазациклооктадекан-7,16-діїл)біс(метилен))(R)-дипіколіната (стереохімія призначена довільно) (20 мг, 0,03 ммоль) у THF (0,1 мл), додавали воду (0,25 мл) та метанол (0,1 мл) моногідрат гідроксиду літію (4 мг, 0,09 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Після завершення реакції (контрольованої за допомогою УВЕРХ-МС) pH реакції доводили до 3–4 за допомогою 1,5 М водного

розчину HCl і концентрували. Залишок очищали препаративною ВЕРХ з отриманням H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру II (5 мг, 26 %) у вигляді смоляної рідини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C29H42N4O9 590,30; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 591,3. Чистота по РХ-МС: 99,28 %, К.Т.: 1,199. Чистота по ВЕРХ: 97,60 % К.Т.: 2,01. ^{1}Н ЯМР 1Н-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,40 (с, 1Н), 9,72 (с, 1Н), 8,16-8,00 (м, 4Н), 7,80-7,77 (м, 2Н), 4,69 (с, 4Н), 4,34-3,38 (м, 28Н), 1,06 (т, J = 6,80 Гц, 3Н).

Схема 37. Хелатування H2bp18c6-off макроцикл-етоксиметилового ізомеру II з ^{225}Ac(III)



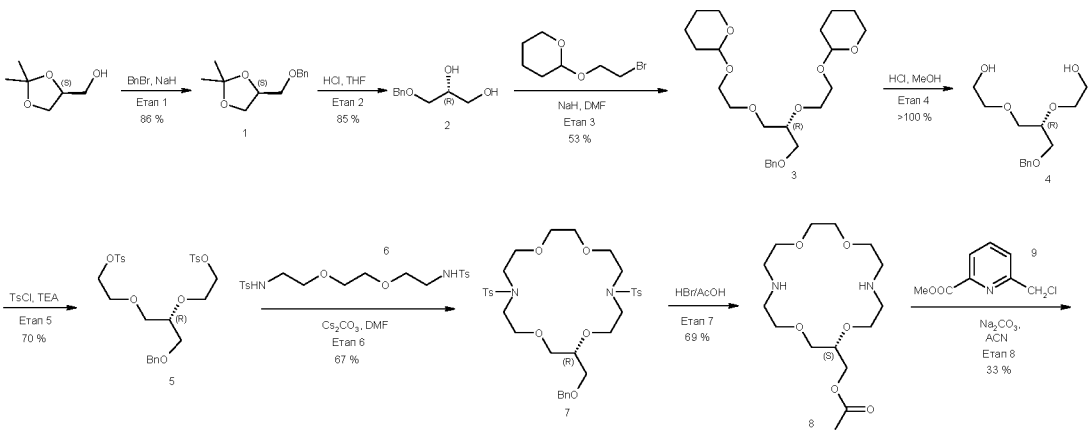
Хелатування з ^{225}Ac(III): Ацетат тетраметиламонію (1М, 10 мкл), H2bp18c6-off макроцикл етокси метиловий ізомер II (1 мг/мл у воді, 1 мкл), $^{225}Ac(NO_3)_3$ в 0,1 N HCl (10 мКі/мкл, 3 мкл, 30 мкКі) додавали в пластиковий флакон послідовно. pH був ~ 6,5 pH при вимірювання лакмусовим папером. Флакон нагрівали при 37 °C протягом 2 години.

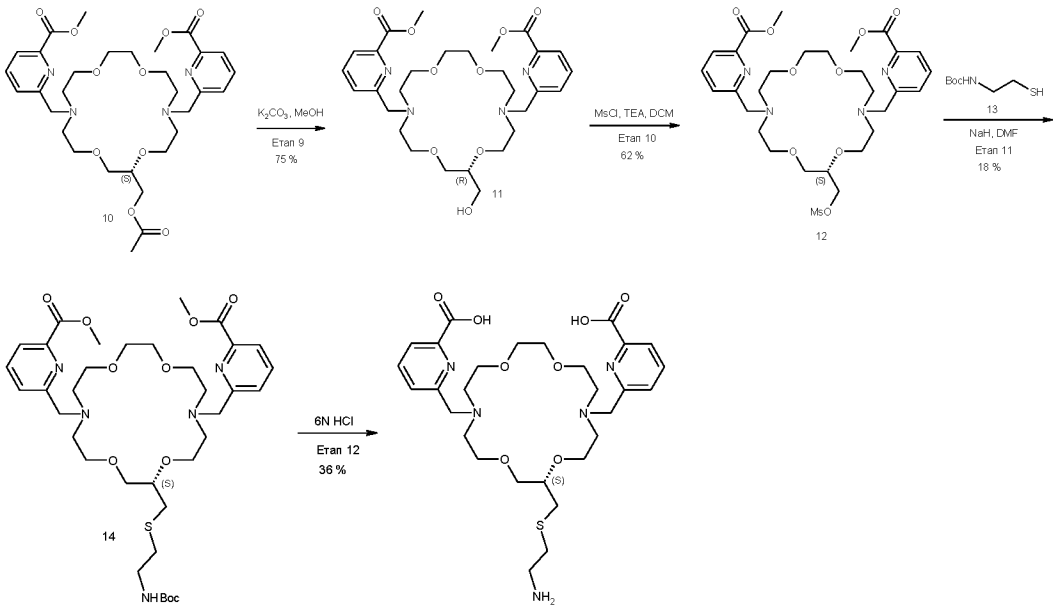
0,5 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

0,5 мкл реакційної суміші змішували з 15 мкл 10 мМ DTPA (pH 6,5) та інкубували протягом 30 хв. 10 мкл суміші завантажували на iTLC-SG, який був розроблений за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC сканували через 20 годин на радіо-TLC-сканері Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. iTLC показала 99 % хелатного Ac-225.

Приклад 26: Синтез H2bp18c6-off макроцикл-NCS

Схема 38. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід аміну





Етап 1. Гідрид натрію (18,16 г, 60 % в мінеральному маслі, 454 ммоль) додавали до розчину (S)-(+)-2,2-диметил-1,3-діоксолан-4-метанолу (50 г, 378 ммоль) у безводному DMFA (500 мл) при 0 °С. Після перемішування при цій температурі протягом 10 хвилин до цієї суспензії повільно додавали бензилбромід (77,63 г, 454 ммоль). Реакцію доводили до кімнатної температури через 30 хв і перемішували ще 8 годин. Реакційну суміш гасили насиченим розчином хлориду амонію та екстрагували дихлорметаном (2х500 мл). Об'єднаний органічний шар промивали сольовим розчином і сушили над сульфатом натрію. Після видалення розчинника залишок очищали колонковою флеш-хроматографією (силікагель, 230–400 меш) з використанням петролейного етеру та етилацетату з одержанням сполуки 1 (72 г, 86 %) у вигляді безбарвної рідини.

Етап 2. Сполуку 1 (72 г, 324 ммоль) розчиняли в THF (100 мл), додавали водний розчин HCl (1,5N, 100 мл) і перемішували при кімнатній температурі протягом 16 годин. Реакційну суміш розбавляли етилацетатом (500 мл) і нейтралізували 10 % розчином бікарбонату натрію. Розчин екстрагували етилацетатом (2х500 мл) і об'єднаний органічний шар промивали водою, сольовим розчином, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали колонковою флеш-хроматографією (силікагель, 230–400 меш) з використанням петролейного етеру та етилацетату з одержанням сполуки 2 (51 г, 85 %) у вигляді безбарвного масла.

Етап 3. До суспензії гідриду натрію (26,29 г, 60 % в мінеральному маслі, 686 ммоль) у DMFA (20 мл) додавали по краплях сполуку 2 (25,0 г, 137 ммоль) у DMFA (100 мл) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Знову охолоджували до 0 °С, по краплях додавали 2-(2-брометокси)тетрагідро-2Н-піран ((85,89 г, 411 ммоль) у DMFA (100 мл). Реакційній суміші давали досягти кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакцію гасили насиченим розчином хлориду амонію та екстрагували етилацетатом (3Х300 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Неочищене масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230–400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0–40 %). Продукт 3 (32 г, 53 %) отримували у вигляді безбарвної рідини.

Етап 4. До розчину сполуки 3 (32 г, 73,05 ммоль) у 500 мл метанолу додавали 5 мл HCl у діоксані, перемішували зі зворотним холодильником протягом 1 години, охолоджували та випарювали. Неочищений матеріал 4 (20 г) використовували на наступній стадії без очищення.

Етап 5. Сполуку 4 (20 г, 74,07 ммоль) розчиняли в дихлорметані (250 мл) і триетиламіні (53 мл, 370 ммоль). Розчин охолоджували до 10 °С і порціями додавали твердий р-толуенсульфонілхлорид (42,20 г, 222 ммоль). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 16 годин. Після завершення реакції суспензію додатково розбавляли 1000 мл дихлорметану, промивали холодним водн. розчином HCl (1 М, 3 х 200 мл), крижаною водою (2 х 200 мл), сушили над сульфатом натрію і випарювали до твердої камеді. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230–400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0–40 %). Продукт 5 (30 г, 70 %) отримували у вигляді безбарвної рідини.

Етап 6. Суміш сполуки 5 (30 г, 51,9 ммоль) і карбонату цезію (50,76 г, 155,7 ммоль) в 200 мл сухого DMFA перемішували протягом 1,5 год при температурі навколишнього середовища. До суспензії додавали сполуку 6 (23,56 г, 51,9 ммоль) у 200 мл DMFA по краплях протягом 2 годин. Суміш перемішували протягом додаткових 20 годин при температурі навколишнього середовища. Розчинник

видаляли в умовах зниженого тиску з отриманням твердої пасти. ЇЇ суспендували в 1000 мл дихлорметану і перемішували протягом 30 хв. Тверді речовини, що випали в осад, відфільтровували і фільтрат випарювали у високому вакуумі. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230–400 меш) з використанням етилацетату в петролейному етері (0–40 %). Продукт 7 (24 г, 67 %) отримували у вигляді безбарвної рідини.

Етап 7. До розчину сполуки 7 (24 г, 34,78 ммоль) у бромистоводневій кислоті (50 % в оцтовій кислоті, 100 мл) додавали фенол (16,35 г, 174 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 60 °C протягом 6 годин. Після завершення реакції її охолоджували до кімнатної температури, оцтову кислоту видаляли у високому вакуумі. Неочищену сировину очищали очищенням колонки з оберненою фазою, використовуючи ацетонітрил і 0,1 % TFA у воді, щоб отримати сполуку 8 (8,0 г, 69 %) у вигляді безбарвної рідини.

Етап 8. Суспензію сполуки 8 (8,0 г, 23,95 ммоль), сполуки 9 (11,07 г, 59,88 ммоль) і карбонату натрію (12,69 г, 119,75 ммоль) у сухому ацетонітрилі (100 мл) нагрівали при 90 °C протягом 16 годин. Після завершення реакції реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували через целіт і концентрували при зниженому тиску. Неочищений матеріал очищали флеш-хроматографією (силікагель, 230–400 меш) з використанням метанолу в дихлорметані (0–10 %). Продукт 10 (5,0 г, 33 %) отримували у вигляді рідини коричневого кольору.

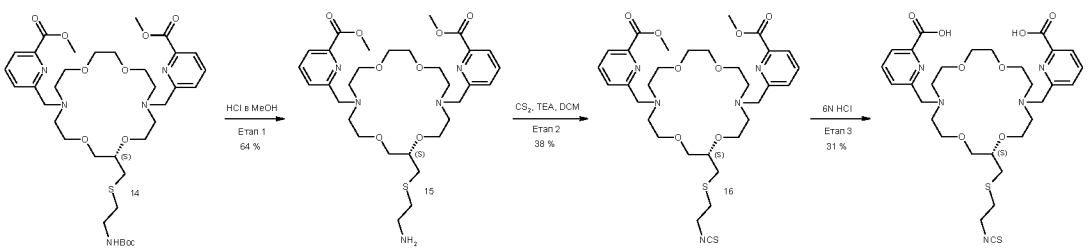
Етап 9. До розчину сполуки 10 (5,0 г, 7,91 ммоль) в метанолі (50 мл) додавали карбонат калію (0,11 г, 0,79 ммоль) при кімнатній температурі і перемішували протягом 10 хв. Після завершення реакції його концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією на діоксиді кремнію (230–400 меш), елюючи градієнтом 0–10 % метанолу в дихлорметані. Продукт 11 (3,5 г, 75 %) отримували у вигляді рідини коричневого кольору.

Етап 10. До розчину сполуки 11 (1,0 г, 1,7 ммоль) у дихлорметані (20 мл) додавали триетиламін (0,51 г, 0,70 мл, 5,1 ммоль). До цього розчину при 0 °C по краплях додавали мезилхлорид (0,39 г, 0,26 мл, 3,4 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою TLC. Після завершення реакції суміш концентрували і неочищену очищали колонковою хроматографією (оксид алюмінію – нейтральний) з використанням метанолу в дихлорметані (1–2 %) у якості елюенту, щоб отримати сполуку 12 (0,7 г, 62 %) у вигляді коричневої рідини.

Етап 11. До розчину сполуки 13 (53 мг, 0,3 ммоль) у DMFA (2 мл) додавали гідрид натрію (12 мг, 60 % у мінеральному маслі, 0,3 ммоль) при 0°C. Реакційну суміш перемішували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. До реакційної суміші додавали сполуку 12 (100 мг, 0,15 ммоль) у DMFA (1 мл) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували протягом 2 год при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою TLC. Після завершення реакції реакційну суміш гасили насиченим розчином хлориду амонію та екстрагували етилацетатом (3x5 мл). Об'єднаний органічний шар промивали водою, сольовим розчином, сушили над безводним сульфатом натрію і концентрували. Неочищений продукт очищали за допомогою препаративної ВЕРХ з використанням ацетонітрилу і 0,1 % TFA в воді, щоб отримати сполуку 14 (20 мг, 18 %) у вигляді коричневої рідини.

Етап 12. Розчин сполуки 14 (20 мг, 0,02 ммоль) у 6 N соляній кислоті (0,5 мл) перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакції реакційну суміш концентрували в умовах зниженого тиску. Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ з отриманням продукту H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфідаміну (6 мг, 36 %) у вигляді смоляної твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C29H43N5O8S 621,75; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 622,2. Чистота по РХ-МС: 97,94 % К.Т.: 1,38. Чистота по ВЕРХ: 94,11 % К.Т.: 2,94. ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 11,02-11,00 (м, 2H), 8,21 (с, 2H), 8,16-8,09 (м, 4H), 7,93-7,90 (м, 2H), 4,78-4,75 (м, 4H), 4,15-3,93 (м, 9H), 3,56-3,50 (м, 14H), 2,97-2,96 (м, 2H), 2,81-2,79 (м, 2H), 2,70-2,67 (м, 2H).

Схема 39. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфіду NCS



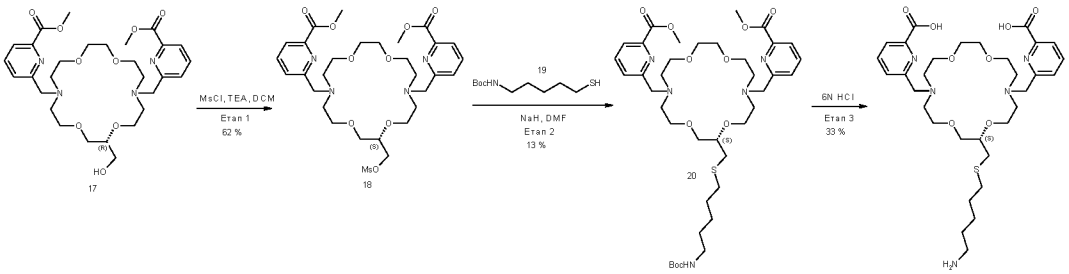
Етап 1. До сполуки 14 (100 мг, 0,15 ммоль) додавали холодний розчин HCl в метанолі (2 мл, 4N) і перемішували протягом 2 год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням сполуки 2 у вигляді рідини жовтого кольору (55 мг, 64 %).

Етап 2. До розчину сполуки 15 (50 мг, 0,08 ммоль) і триетиламіну (24 мг, 0,24 ммоль) у сухому дихлорметані (2 мл) у флаконі під тиском додавали сірковуглець (12 мг, 0,16 ммоль). Флакон

піддавали MW-опроміненню (потужність 150 Вт) при 90 °C протягом 30 хв. Після цього реакційну суміш розбавляли дихлорметаном (10 мл), промивали послідовно водою (5 мл), 1 M HCl (5 мл), водою (5 мл) і сушили над безводним сульфатом натрію. Після концентрування неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230–400 меш) з використанням 0–10 % метанолу в дихлорметані в якості елюентів з одержанням сполуки 16 (20 мг, 38 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

Етап 3. Розчин сполуки 16 (20 мг, 0,03 ммоль) у соляній кислоті (6N, 0,5 мл) перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакції його концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ з отриманням H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфіда NCS (6 мг, 31 %) у вигляді білої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C30H41N5O8S2: 663,81; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 664,2. Чистота по РХ-МС: 99,94 % К.Т.: 1,41. Чистота по ВЕРХ: 98,77 % К.Т.: 2,76. ^{1}Н ЯМР(400 МГц, ДМСО-d_6): δ 9,78 (с, 1Н), 8,10 (с, 4Н), 7,78 (д, J = 6,00 Гц, 2Н), 4,69 (с, 4Н), 3,96-3,52 (м, 23Н), 2,85 (т, J = 6,40 Гц, 2Н), 2,70 (т, J = 8,00 Гц, 2Н).

Схема 40. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід аміну

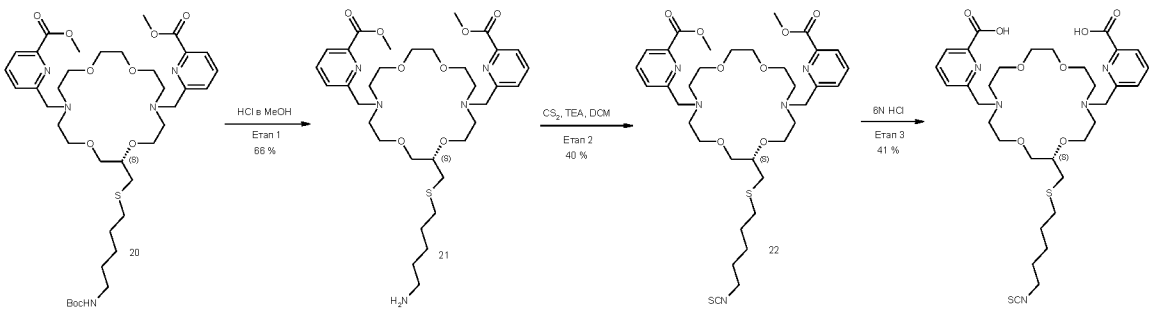


Етап 1. До розчину сполуки 17 (1,0 г, 1,7 ммоль) у дихлорметані (20 мл) додавали триетиламін (0,51 г, 0,70 мл, 5,1 ммоль). До цього розчину при 0 °C по краплях додавали мезилхлорид (0,39 г, 0,26 мл, 3,4 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою TLC. Після завершення реакції, суміш концентрували і залишок очищали колонковою хроматографією (нейтральний оксид алюмінію) з використанням метанолу в дихлорметані (1–2 %) в якості елюентів з одержанням сполуки 18 (0,7 г, 62 %) у вигляді коричневої рідини.

Етап 2. До розчину сполуки 19 (65 мг, 0,3 ммоль) у DMFA (2 мл) додавали гідрид натрію (12 мг, 60 % у мінеральному маслі, 0,3 ммоль) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували протягом 10 хв при кімнатній температурі. До реакційної суміші додавали сполуку 18 (100 мг, 0,15 ммоль) у DMFA (1 мл) при 0 °C. Реакційну суміш перемішували протягом 2 год при кімнатній температурі. Хід реакції контролювали за допомогою TLC. Після завершення реакції суміш концентрували і залишок очищали препаративною ВЕРХ, використовуючи ацетонітрил і 0,1 % TFA у воді, щоб отримати сполуку 20 (15 мг, 13 %) у вигляді коричневої рідини.

Етап 3. Розчин сполуки 20 (15 мг, 0,02 ммоль) у соляній кислоті (6N, 0,5 мл) перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакції його концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ з отриманням продукту H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфідаміну (4 мг, 33 %) у вигляді смоляної рідини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C32H49N5O8S 663,83; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 664,2. Чистота по РХ-МС: 90,31 % К.Т.: 1,43. Чистота по ВЕРХ: 90,69 % К.Т.: 3,11. ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 7,85-7,83 (м, 2Н), 7,79-7,75 (м, 2Н), 7,30 (дд, J = 6,80, 24,00 Гц, 2Н), 4,01-3,38 (м, 29Н), 2,89-2,85 (м, 4Н), 1,80-1,60 (м, 2Н), 1,44-1,39 (м, 4Н).

Схема 41. Синтез H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфіду NCS



Етап 1. До сполуки 20 (120 мг, 0,15 ммоль) додавали холодний розчин HCl в метанолі (2 мл, 4N) і перемішували протягом 2 годин. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням сполуки 21 у вигляді жовтої рідини (70 мг, 66 %).

Етап 2. До розчину сполуки 21 (70 мг, 0,1 ммоль) і триетиламіну (20 мг, 0,2 ммоль) у сухому

дихлорметані (2 мл) у флаконі під тиском додавали сірковуглець (15 мг, 0,2 ммоль). Флакон піддавали MW-опроміненню (потужність 150 Вт) при 90 °C протягом 30 хв. Після цього реакційну суміш розбавляли дихлорметаном (10 мл), промивали послідовно водою (5 мл), 1 M HCl (5 мл), водою (5 мл) і сушили над безводним сульфатом натрію. Після концентрування неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на силікагелі (230–400 меш) з використанням 0–10 % метанолу в дихлорметані в якості елюенту з одержанням сполуки 22 (30 мг, 40 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

Етап 3. Розчин сполуки 22 (30 мг, 0,04 ммоль) у соляній кислоті (6N, 0,5 мл) перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Після завершення реакції його концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ з одержанням H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфіду NCS (12 мг, 41 %) у вигляді білої твердої речовини. РХ-МС XIAT: Розраховано для C33H47N5O8S2: 705,89; Спостерігається m/z $[M+H]^+$ 706,2. Чистота по РХ-МС: 99,33 % К.Т.: 1,58. Чистота по ВЕРХ: 98,92 % К.Т.: 2,76. ^{1}H ЯМР 1H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6): δ 13,40 (с, 1H), 9,90 (с, 1H), 8,17-8,09 (м, 4H), 7,78 (д, J = 6,80 Гц, 2H), 4,70 (с, 4H), 3,93-3,17 (м, 27H), 2,68-2,67 (м, 2H), 1,64-1,60 (м, 2H), 1,53-1,49 (м, 2H), 1,40-1,38 (м, 2H).

Приклад 26: Властивості радіоімунокон'югату

Таблиця 1 підсумовує ефективність хелатування радіоімунокон'югатів, отриманих у прикладах.

Таблиця 1

Підсумок ефективності хелатування

Назва	Ефективність хелатування перед DTPA	Ефективність хелатування після DTPA	Співвідношення Хелатор: Ac-225
H2bp18c6-Бензил-Феніл-DBCO IgG4	99 %	-	100: 1
H2bp18c6-Бензил-Феніл-DBCO PSMB127	99 %	-	100: 1
H2bp18c6-Бензил-Феніл-DBCO Пертузумаб	99 %	96 %	100: 1
H2bp18c6-Бензил-Феніл-DBCO Цетуксимаб	99 %	95 %	100: 1
H2bp18c6-Бензил-Феніл-DBCO Герцептин	99 %	93 %	100: 1
H2bp18c6-Бензил-Феніл-DBCO Панітумумаб	99 %	85 %	100: 1
H2bp18c6-Бензил-Феніл-DBCO H11B6	99 %	97 %	91: 1
H2bp18c6-Бензил-Феніл-BCN PSMB127	99 %	97 %	100: 1
H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO PSMB127	99 %	94 %	80: 1
H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO PSMB127	99 %	97 %	76: 1
DOTA-H11B6 (сайт-специфічний)	79 %		100: 1
DOTA-H11B6 (випадковий сайт)	36 %		130: 1

Стабільність сироватки людини чотирьох кон'югатів ^{225}Ac-Хелатор-mAb вимірюють за таким методом:

^{225}Ac-H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-PSMB127

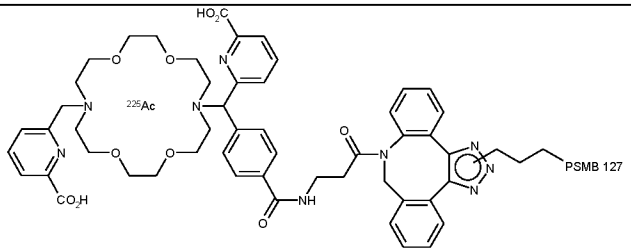
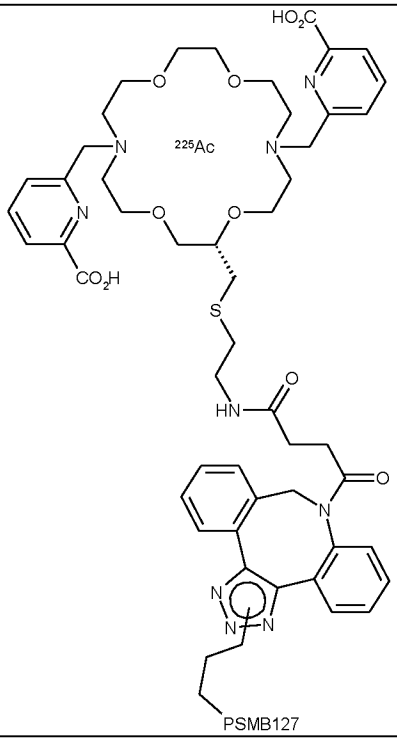
^{225}Ac-H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO-PSMB127

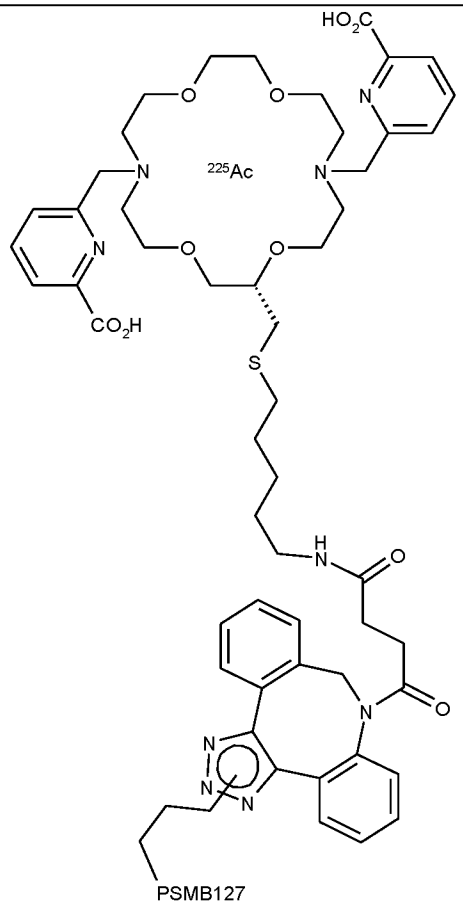
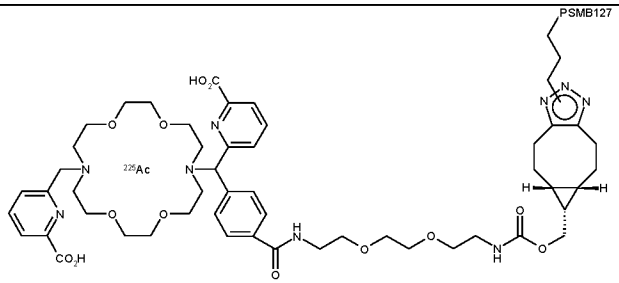
^{225}Ac-H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO-PSMB127

^{225}AC-H2bp18c6-бензил-феніл-BCN-PSMB127

До кожного розчину 900 µл об'єднаної сироватки людини (BioIVT) додають 100 µл ~ 300 мкКі/мг одного з чотирьох кон'югатів. Індивідуальний розчин кон'югату змішують, а потім збирають 10 µл у кілька моментів часу протягом семи днів. Кожен зразок об'ємом 10 µл переносять в окремий пластиковий флакон, що містить 30 µл 50 мМ DTPA, і залишають на 5 хвилин при кімнатній температурі. 10 мкл реакційної суміші завантажували на iTLC-SG з проявленням за допомогою 10 мМ EDTA. Висушений iTLC-SG залишали при кімнатній температурі на ніч перед скануванням на сканері для тонкошарової радіохроматографії Bioscan AR-2000. За умов елюювання, описаних в цьому документі, будь-який вільний Ac-225 міг би мігрувати разом з розчинником до фронту розчинника. Результати стабільності наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

^{225}Ac Кон'югат	Структура	Дні дослідження	Стабільність
^{225}Ac H2bp18c6-бензил-феніл-DBCO-PSMB127		14	Стабільний
^{225}Ac H2bp18c6-off макроцикл-етилсульфід-DBCO-PSMB127		7	Стабільний

^{225}Ac H2bp18c6-off макроцикл-пентилсульфід-DBCO-PSMB127		7	Стабіль-ний
^{225}Ac H2bp18c6-бензил-феніл-BCN-PSMB127		7	Стабіль-ний

Приклад 27: Аналіз зв'язування клітин радіоімунокон'югатів

Клітинне зв'язування азид-модифікованих антитіл та азид-модифікованих антитіл, кон'югованих з хелатором або радіометалевим комплексом за цим винаходом, порівнюють з вихідним антитілом. Клітини, що експресують антиген-мішень антитіла, інкубують з вихідним антитілом, азид-модифікованим антитілом або кон'югованим антитілом, розведеним у буфері, а потім аналізують на клітинне зв'язування за допомогою проточної цитометрії.

Зрозуміло, що приклади та варіанти здійснення, описані в цьому документі, призначені лише для ілюстративних цілей, і що в описані вище варіанти здійснення можуть бути внесені зміни без відхилення від їхньої загальної концепції винаходу. Отже, слід розуміти, що цей винахід не обмежений конкретними описаними варіантами здійснення, але передбачається, що він охоплює модифікації в межах суті й об'єму винаходу, визначених формулою винаходу, що додається.

ПОСИЛАННЯ НА ДЖЕРЕЛА

1. WO 2018/183906

2. Thiele et al. "An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy" Angew. Chem. Int. Ed. (2017) 56, 14712-14717.

3. Roca-Sabio et al. "Macrocyclic Receptor Exhibiting Unprecedented Selectivity for Light Lanthanides" J. Am. Chem. Soc. (2009) 131, 3331-3341.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Janssen Biotech, Inc.

<120> Макроциклічні хелатори та способи їх застосування

<130> JBI6072WOPCT1

<150> 62/846,044
<151> 2019-05-10

<160> 22

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1
<211> 447
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Контроль mAb HC

<400> 1

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Leu Tyr Gly Phe Thr Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

```
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
```

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 2
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Контроль mAb LC

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Asn Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr
20 25 30

Asn Gly Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Glu Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile

85 90 95

Ile Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSMB127) HC CDR1

<400> 3

Ser Asp Ala Met His
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSMB127) HC CDR2

<400> 4

Glu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSMB127) HC CDR3

<400> 5

Asp Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Tyr Val Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 6
<211> 11
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSMB127) LC CDR1

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSMB127) LC CDR2

<400> 7

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSMB127) LC CDR3

<400> 8

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 9
<211> 451
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSNB127) HC

<400> 9

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ser Asp
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Glu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Tyr Val Gly Asp Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
    130                 135                 140
```

```
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
    210                 215                 220

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
```

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Gly Lys
450

<210> 10
<211> 214
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Анти-PSMA mAb (PSMB127) LC

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

```
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність CDR H11B6

<400> 11
```
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1               5
```

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність CDR H11B6

<400> 12

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Se
1 5 10 15

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність CDR H1B6

<400> 13
Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Phe
1 5

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність CDR H1B6

<400> 14
Lys Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Phe Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність CDR H1B6

<400> 15
Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність CDR H11B6

<400> 16
Gln Gln Thr Arg Lys Val Pro Tyr Thr
1   5

<210> 17
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність вмінної ділянки H11B6 HC

<400> 17
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
1   5   10   15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Asp
            20   25   30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35   40   45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
    50   55   60
Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65   70   75   80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Thr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність амінної кислоти Hi1B6 LC

<400> 18
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Phe
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Arg
85 90 95
Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність константної ділянки Hi1B6 HC

<400> 19
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

```
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність константної ділянки Hi1B6 LC

<400> 20

```
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1               5                   10                  15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
            20                  25                  30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
```

```
        35                  40                  45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50                  55                  60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65                  70                  75                  80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85                  90                  95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

<210> 21
<211> 447
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність H11B6 HC

<400> 21

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
1               5                   10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Asp
            20                  25                  30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Thr Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
```

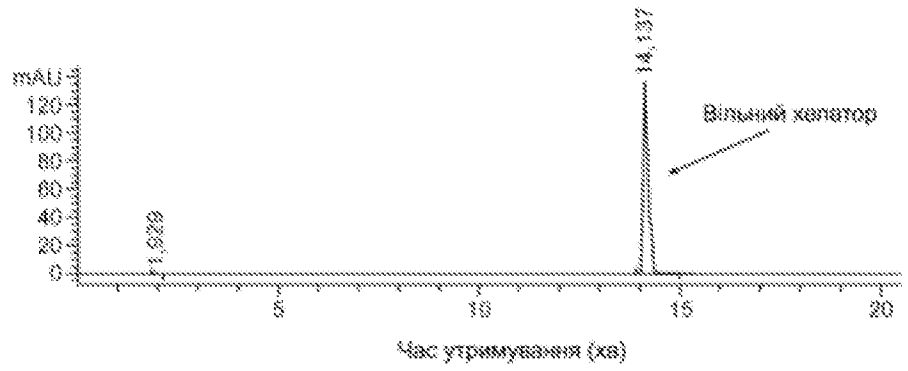
```
            180                 185                 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 22
<211> 218
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

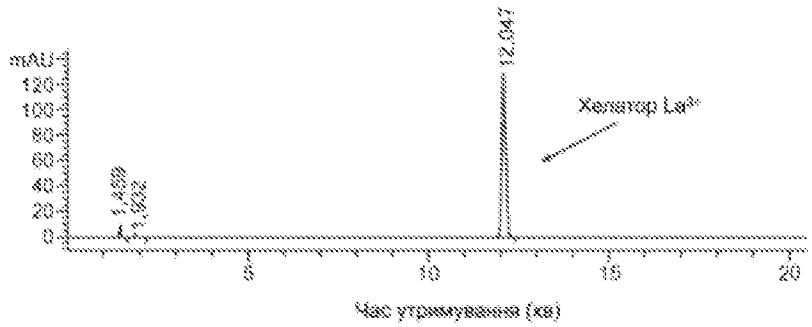
<220>
<223> Послідовність H11B6 LC

<400> 22

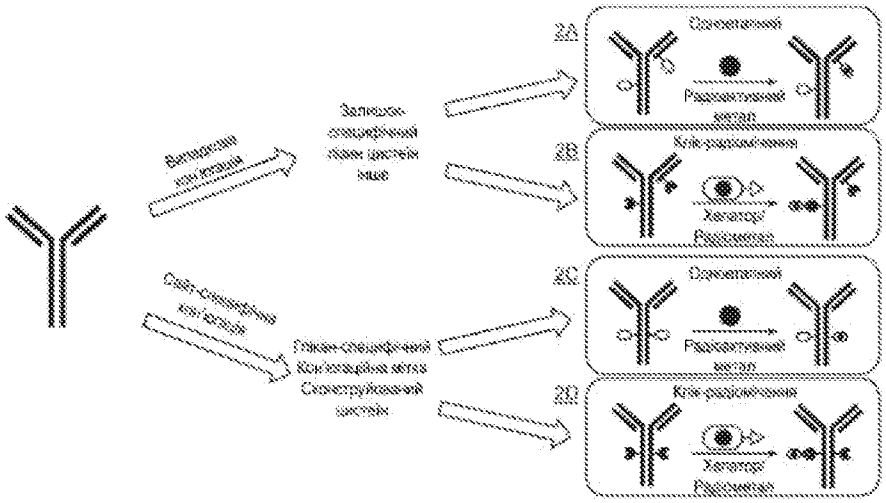
```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Phe
            20                  25                  30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65                  70                  75                  80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Arg
                85                  90                  95
Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```



Фіг. 1А

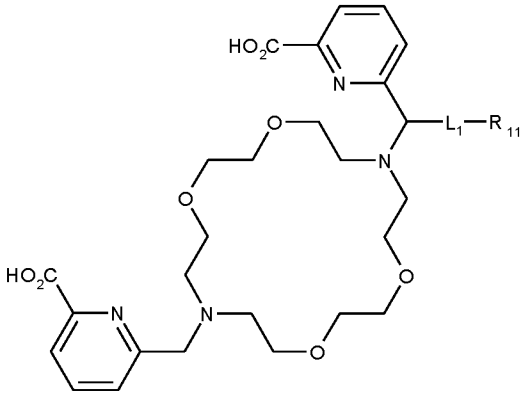

mAU
120
100
80
60
40
20
0
1,459
1,502
12,047
Хелатор La^{3+}
0
10
15
20
Час утримування (хв)

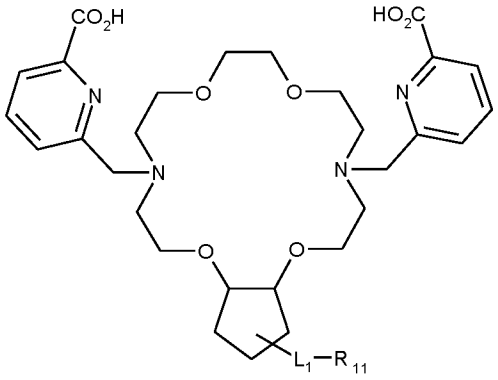
Фіг. 1B

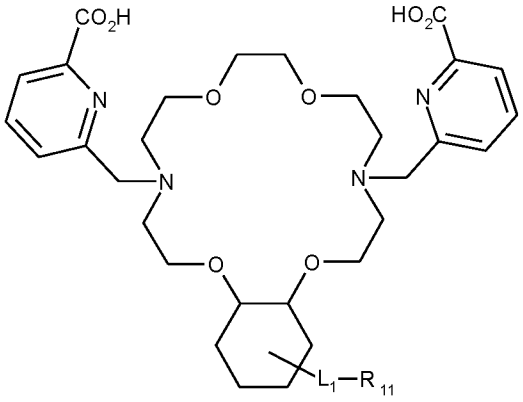

2A
Однопільний
Радіоактивний метал
2B
Клік-приєднання
Хелатор
Радіометал
2C
Однопільний
Радіоактивний метал
2D
Клік-приєднання
Хелатор
Радіометал

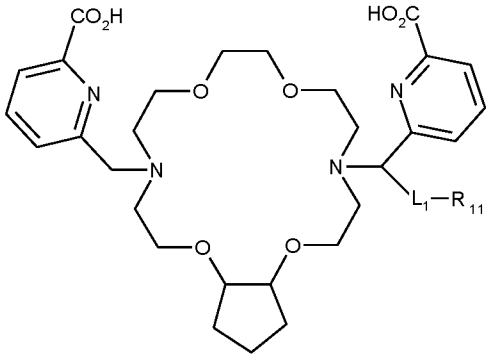
Фіг. 2

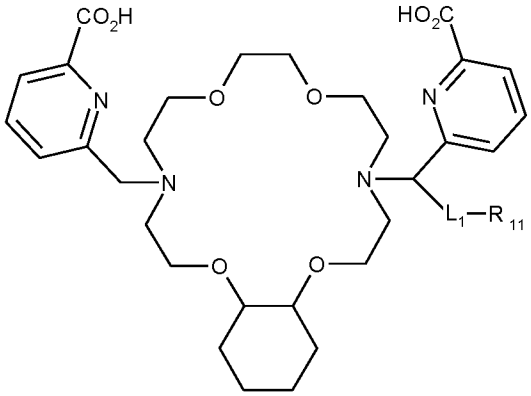
1. Хелатор, вибраний із групи, яка складається з:


,


,


,


та


,

де:

L_1 відсутній або L_1 включає алкільний фрагмент, гетероалкільний фрагмент, арильний фрагмент, гетероарильний фрагмент, поліетиленгліколевий (ПЕГ) фрагмент, пептидний лінкер, лінкер на основі цукру або розщеплюваний лінкер, де алкіл, гетероалкіл, арил і гетероарил є незаміщеними або заміщеними однією-трьома групами, вибраними із алкілу, циклоалкілу, алкокси, алкенілу, циклоалкенілу, алкінілу, циклоалкінілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, галогену, гідрокси, аміду, алкілтіо, аміно, алкіламіно, аміноалкілу, гідроксіалкілу, гідроксилу та карбоксилу;

R_{11} являє собою $-NH_2$, -NCS, -NCO, $-N_3$, алкініл, циклоалкініл, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеімідо, ацилгалогенід, тетразин або транс-циклооктен, або R_{11} включає -

NH_2, -NCS, -NCO, $-N_3$, алкініл, циклоалкініл, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеімідо, ацилгалогенід, тетразин або транс-циклооктен, або R_{11} включає антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, каркасний білок, малу молекулу або аптамер; і кожен R_{13} незалежно являє собою водень або алкіл.

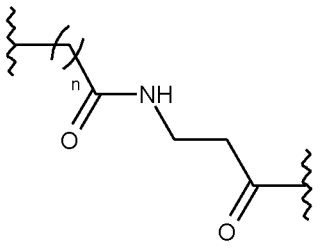
2. Хелатор за п. 1, де R_{11} являє собою -NCS, -NCO, $-N_3$, алкініл, циклоалкініл, малеімідо, і L_1 включає алкільний фрагмент, гетероалкільний фрагмент, арильний фрагмент, гетероарильний фрагмент або поліетиленгліколевий (ПЕГ) фрагмент.

3. Хелатор за п. 1, де R_{11} вибраний із групи, яка складається з біциклононінілу (BCN), дифторованого циклооктинілу (DIFO), дибензоциклооктинілу (DIBO), кето-DIBO, біарилазациклооктинонілу (BARAC), дибензоазациклооктинілу (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксіазациклооктинілу (DIMAC), дифторбензоциклооктинілу (DIFBO), монобензоциклооктинілу (MOBO) і тетраметоксидибензоциклооктинілу (TMDIBO).

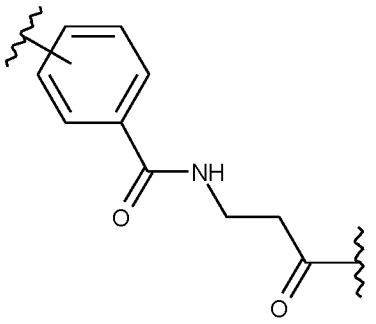
4. Хелатор за п. 3, де R_{11} являє собою DBCO або BCN.

5. Хелатор за п. 1, де R_{11} містить ліганд націлювання, де ліганд націлювання містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, каркасний білок, малу молекулу або аптамер.

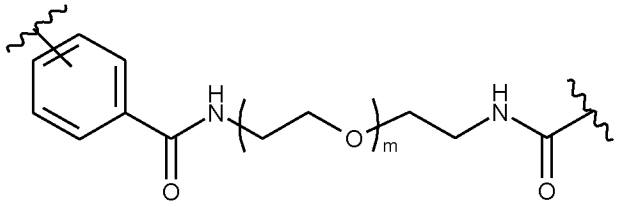
6. Хелатор за будь-яким із пп. 1-5, де L_1 вибраний із групи, яка складається з:



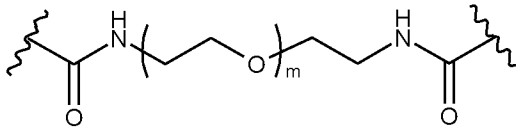
,



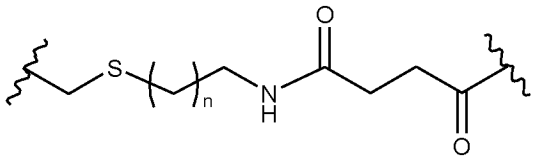
,



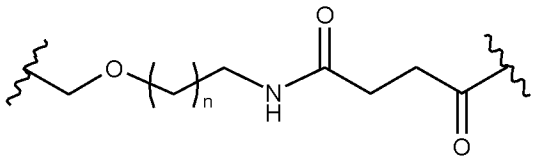
,

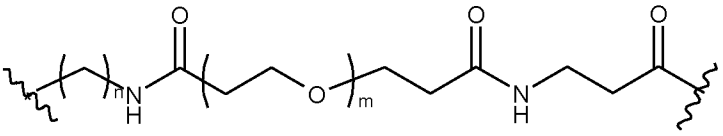
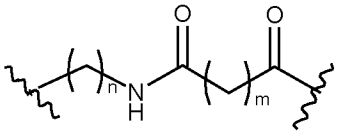


,



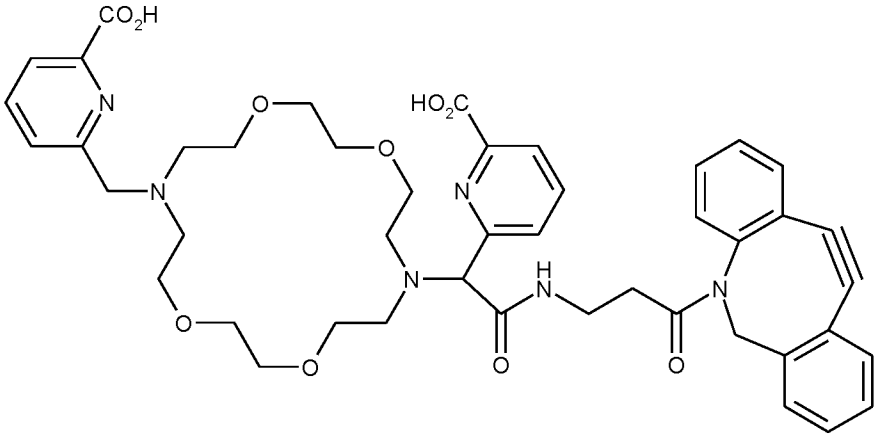
,

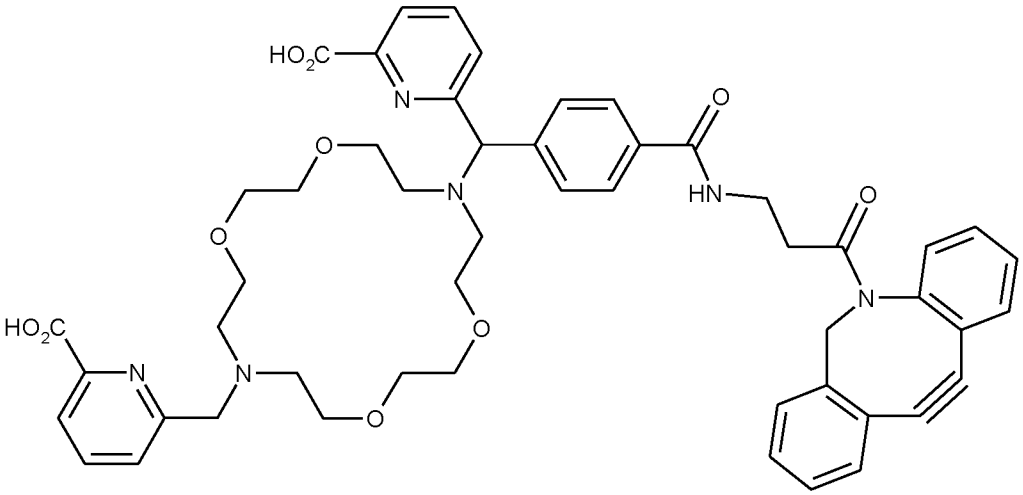

,

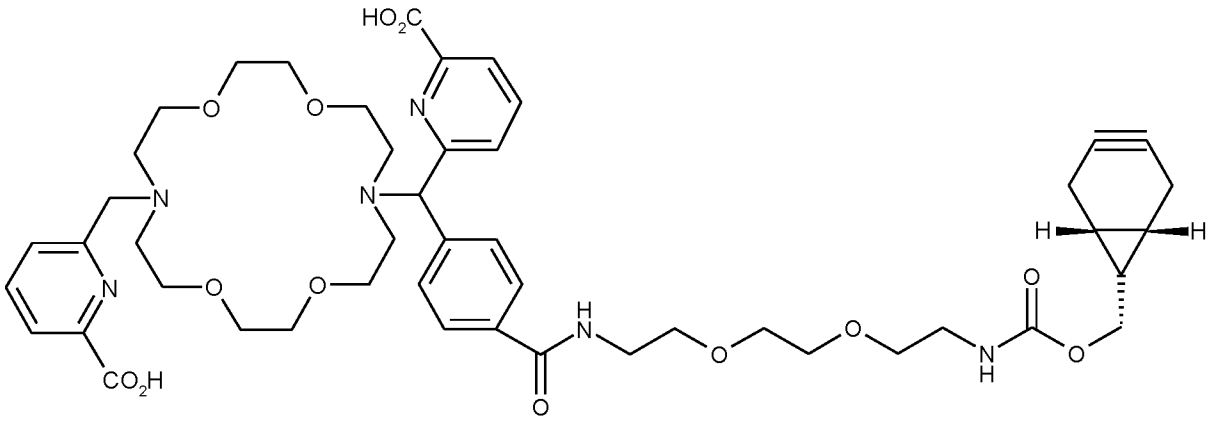

та 
,

де n дорівнює цілому числу від 0 до 10, переважно цілому числу від 1 до 4, і m дорівнює цілому числу від 0 до 12, переважно цілому числу від 0 до 6.

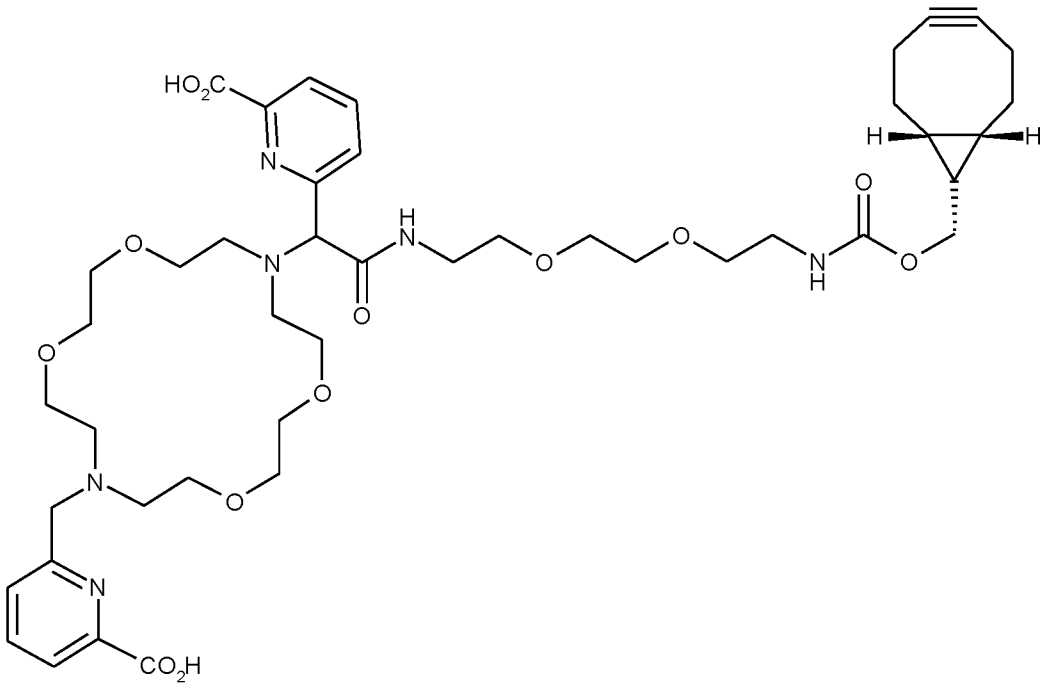
7. Хелатор за п. 1, вибраний із групи, яка складається з:


,


,



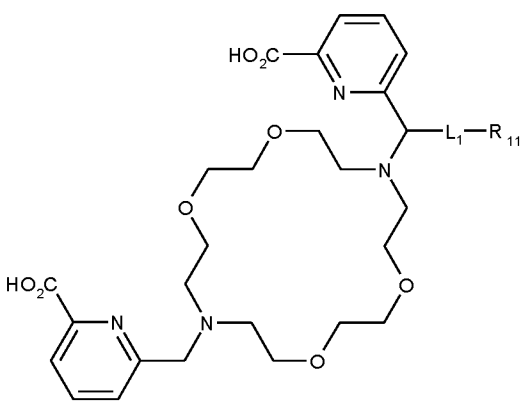
та



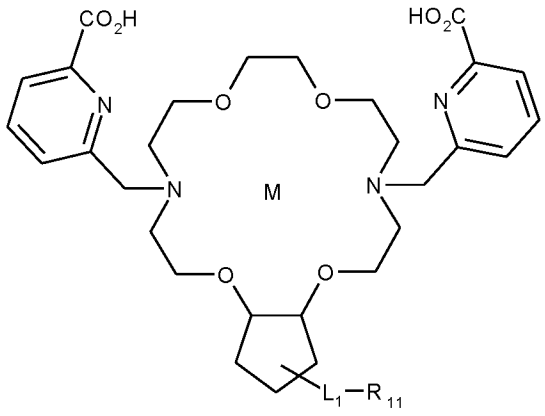
.

8. Хелатор за будь-яким із пп. 1-7, де хелатор додатково містить іон радіометалу, зв'язаний з хелатором за допомогою координатного зв'язку, утворюючи таким чином радіометалевий комплекс.

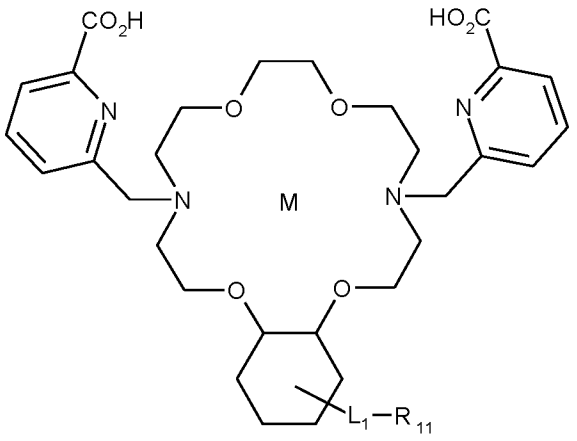
9. Радіометалевий комплекс, вибраний із групи, яка складається з:

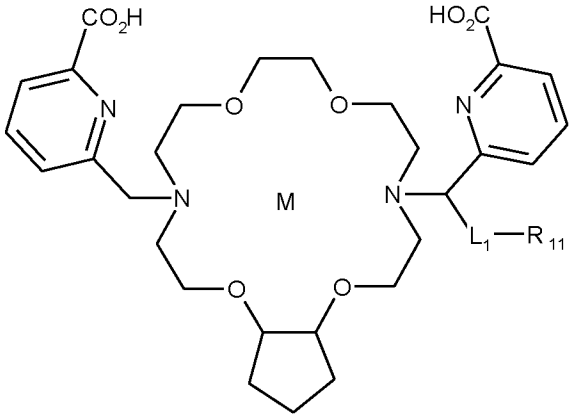


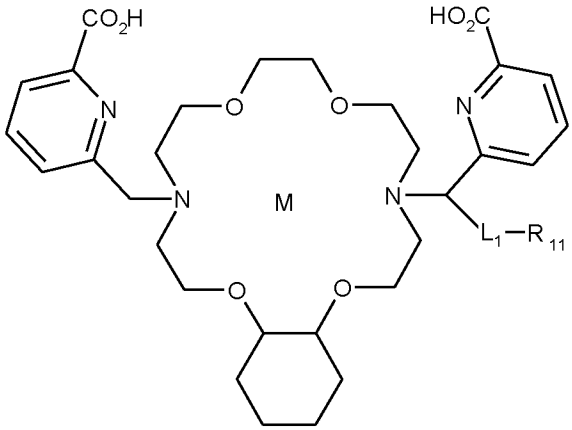
,



,



,


та


;

де:

M являє собою актиній-225 (^{225}Ac),

L_1 відсутній або L_1 включає алкільний фрагмент, гетероалкільний фрагмент, арильний фрагмент, гетероарильний фрагмент, поліетиленгліколевий (ПЕГ) фрагмент, пептидний лінкер, лінкер на основі цукру або розщеплюваний лінкер, де алкіл, гетероалкіл, арил і гетероарил є незаміщеними або заміщеними однією-трьома групами, вибраними із алкілу, циклоалкілу, алкокси, алкенілу, циклоалкенілу, алкінілу, циклоалкінілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, галогену, гідрокси, аміду, алкілтіо, аміно, алкіламіно, аміноалкілу, гідроксіалкілу, гідроксилу та карбоксилу; і

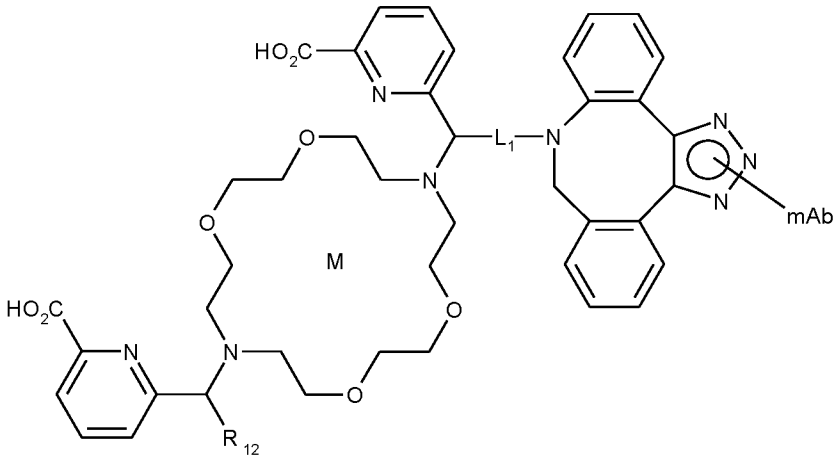
R_{11} являє собою $-NH_2$, -NCS, -NCO, $-N_3$, алкініл, циклоалкініл, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеімідо, ацилгалогенід, тетразин або транс-циклооктен, або R_{11} включає антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, каркасний білок, малу молекулу або аптамер; і

кожен R_{13} незалежно являє собою водень або алкіл.

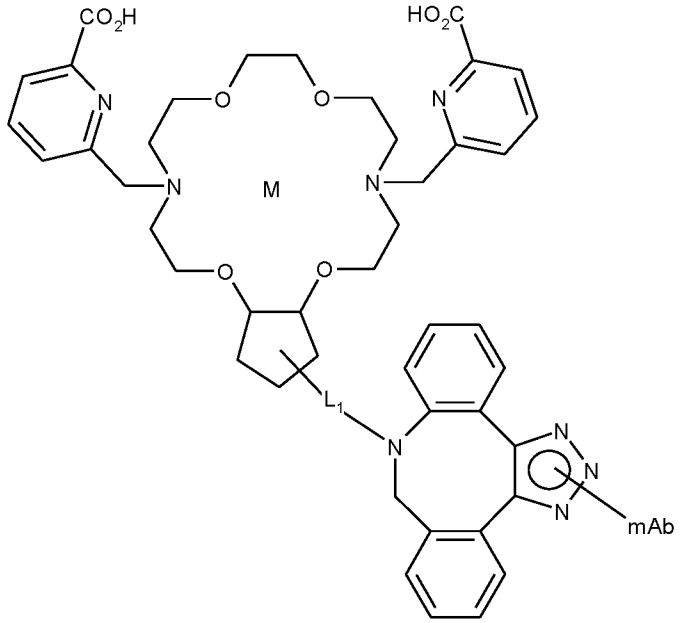
10. Радіоімунокон'югат, що містить радіометалевий комплекс за п. 9, кон'югований з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

11. Радіоімунокон'югат за п. 10, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язаний з R_{11} радіокомплексу через триазоловий фрагмент.

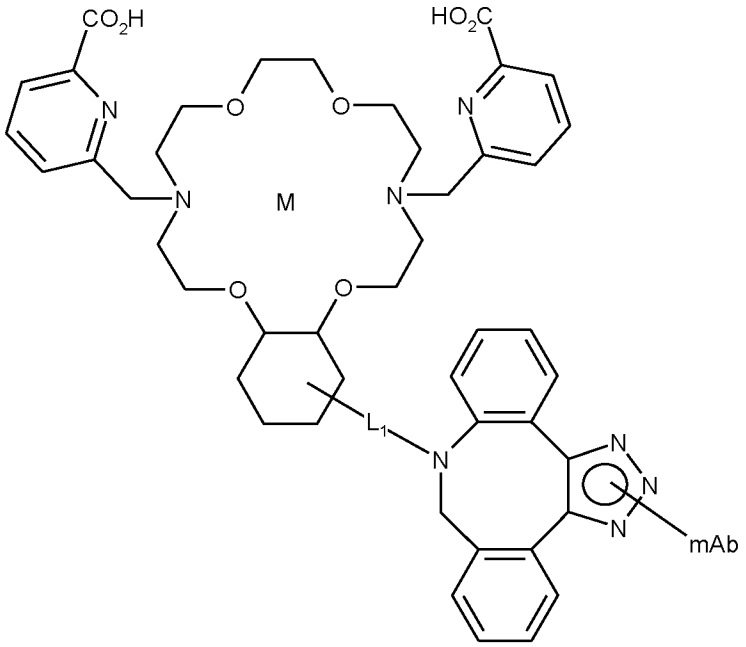
12. Радіоімунокон'югат, який має структуру, вибрану з групи, яка складається з:



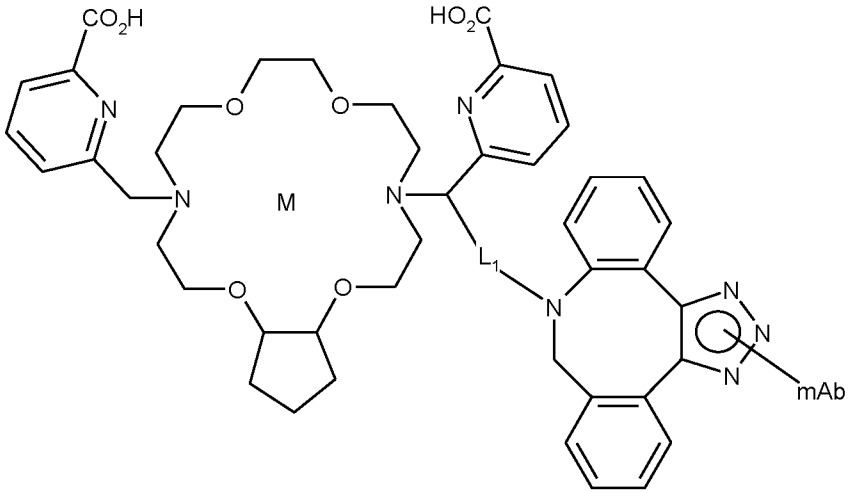
,



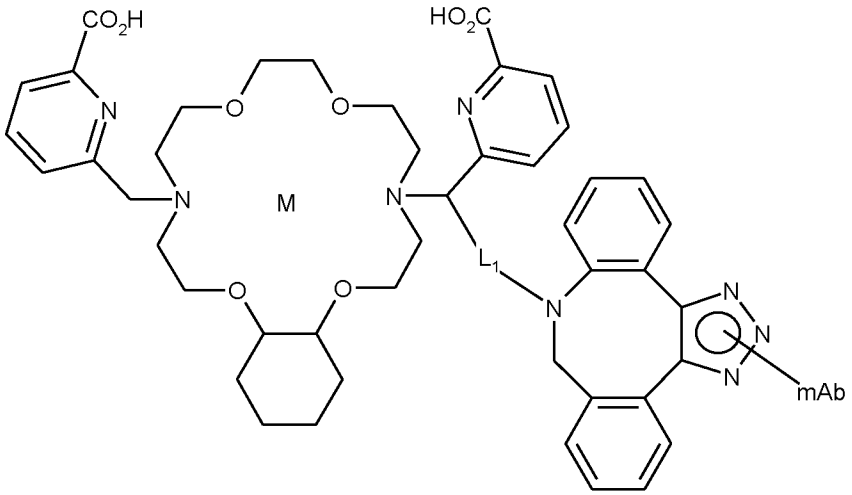
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
N
mAb

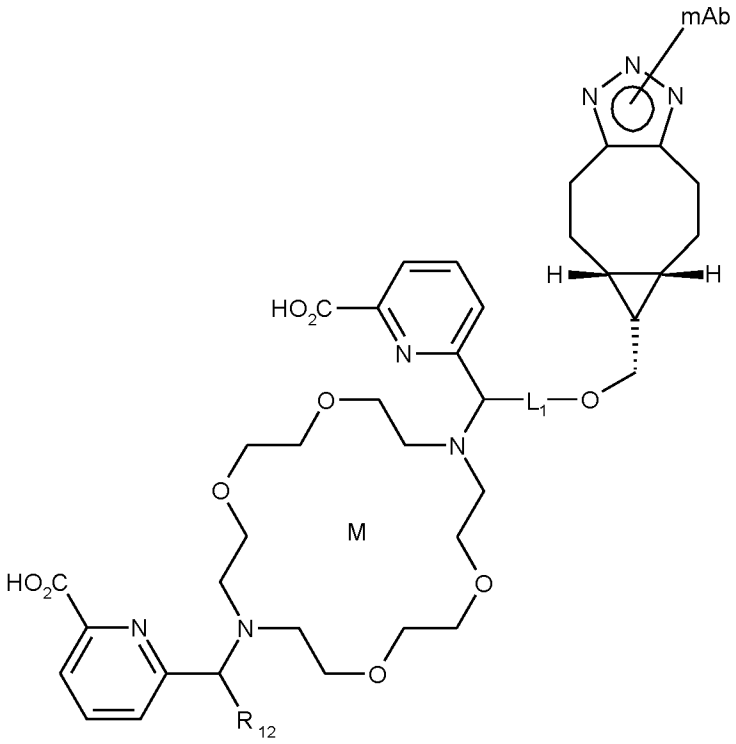
,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
N
mAb

,


CO2H
HO2C
N
O
O
N
M
N
O
O
L1
N
N
N
N
mAb

та



;

де:

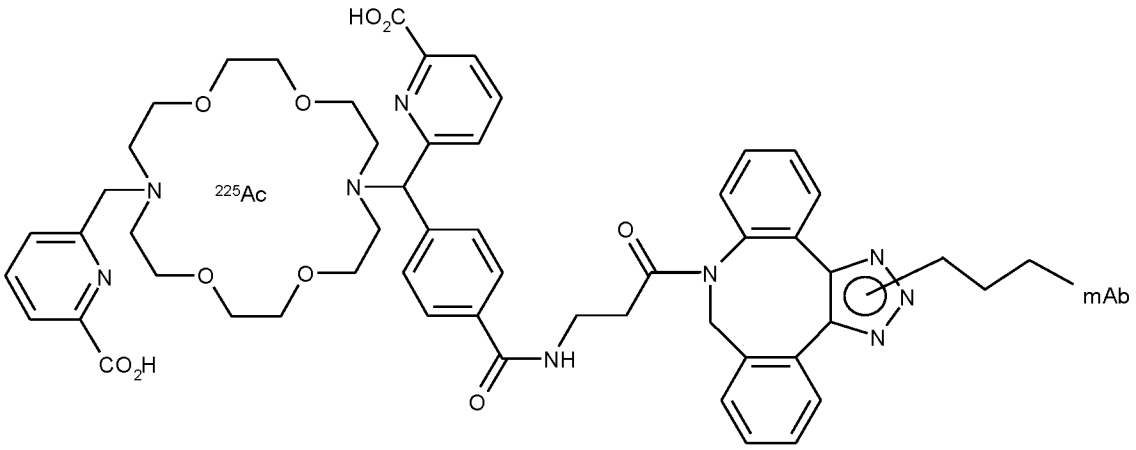
M являє собою іон радіометалу, переважно альфа-випромінюючий іон радіометалу, більш переважно актиній-225 (^{225}Ac);

L_1 включає алкільний фрагмент, гетероалкільний фрагмент, арильний фрагмент, гетероарильний фрагмент, поліетиленгліколевий (ПЕГ) лінкер, пептидний лінкер, лінкер на основі цукру або розщеплюваний лінкер, де алкіл, гетероалкіл, арил і гетероарил є незаміщеними або заміщеними однією-трьома групами, вибраними із алкілу, циклоалкілу, алкокси, алкенілу, циклоалкенілу, алкінілу, циклоалкінілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, галогену, гідрокси, аміду, алкілтіо, аміно, алкіламіно, аміноалкілу, гідроксіалкілу, гідроксилу та карбоксилу;

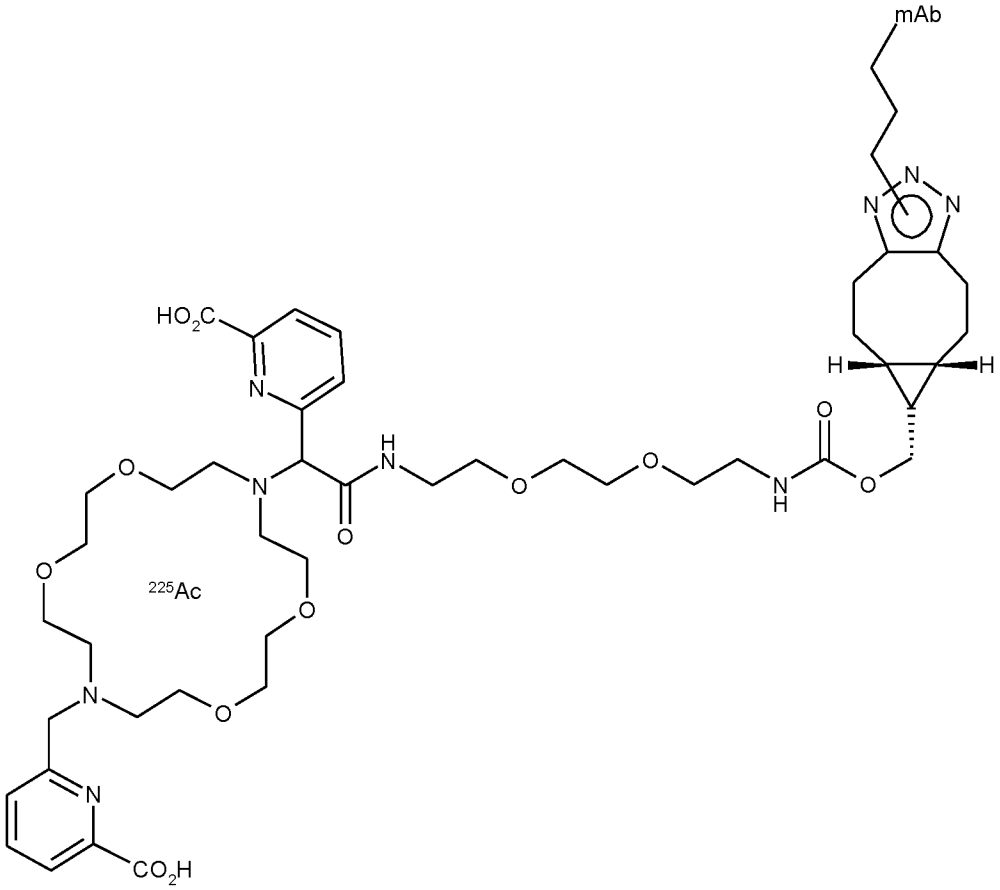
mAb являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент;

кожен R_{12} є воднем.

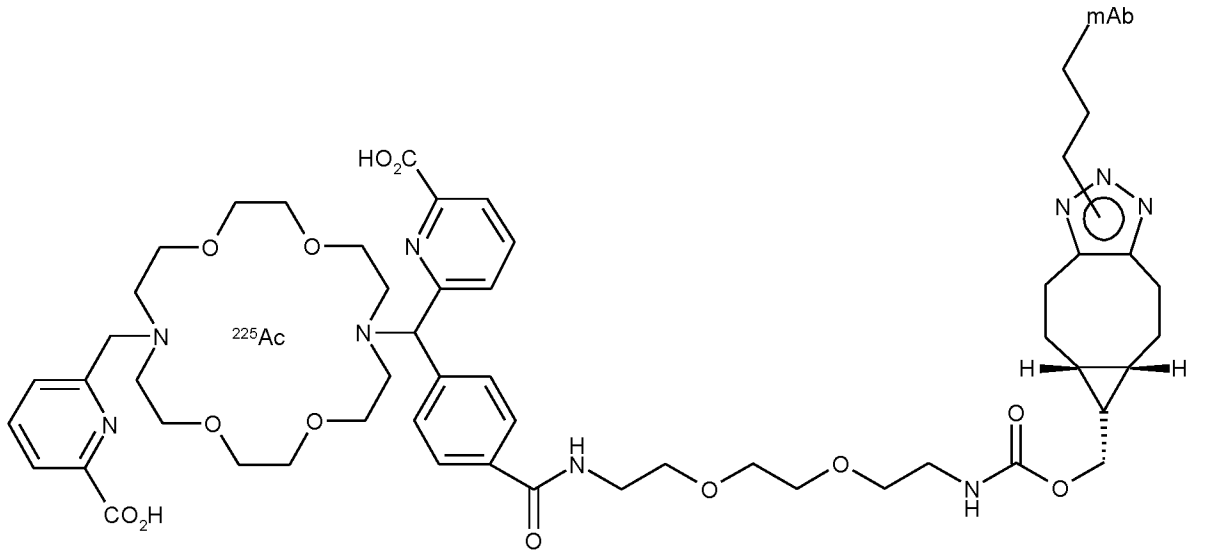
13. Радіоімунокон'югат за п. 12, де радіоімунокон'югат вибраний із групи, яка складається з:


HO2C
N
O
O
N
225Ac
N
O
O
N
CO2H
O
NH
O
N
N
N
mAb

,


mAb
N
N
N
H
H
HO2C
N
H
N
O
O
O
O
O
N
H
O
O
O
225Ac
O
N
O
N
CO2H

та



де mAb являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, переважно антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, який специфічно зв'язується з пухлинним антигеном, більш переважно mAb вибирають з PSMB127, пертузумабу, цетуксимабу, панітумумабу, герцептину і H11B6.

14. Спосіб одержання радіоімунокон'югата, який включає контактування хелатора за п. 5 з іоном радіометалу, утворюючи таким чином радіометалевий комплекс, зв'язаний з лігандом націлювання.

15. Спосіб за п. 14, де ліганд націлювання являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент.

16. Фармацевтична композиція, яка містить радіоімунокон'югат за будь-яким із пп. 10-13 і фармацевтично прийнятний носій.

17. Спосіб селективного націлення на неопластичні клітини для променевої терапії у суб'єкта, який цього потребує, який включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за п. 16.

18. Спосіб лікування неопластичного захворювання або розладу у суб'єкта, який цього потребує, який включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за п. 16.

19. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який цього потребує, який включає введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за п. 16.

Macrocyclic chelators (I) for chelation of alpha-emitting radiometal ions, such as actinium-225 are provided. Also provided are radiometal complexes containing an alpha-emitting radiometal ion bound to the macrocyclic chelator via coordinate bonding, and radioimmunoconjugates containing the radiometal complexes covalently linked to a targeting ligand, such as an antibody or antigen binding fragment thereof. The radioimmunoconjugates can be produced by click chemistry reactions. Methods of using the radiocomplexes and radioimmunoconjugates for selectively targeting neoplastic cells for radiotherapy and for treating neoplastic diseases and disorders are also described.

Запропоновано макроциклічні хелатори (I) для хелатування альфа-випромінюючих іонів радіометалів, таких як Актиній-225. Також запропоновано радіометалеві комплекси, що містять альфа-випромінюючий іон радіометалу, зв'язаний з макроциклічним хелатором за допомогою координатного зв'язку, і радіоімунокон'югати, що містять радіометалеві комплекси, ковалентно зв'язані з лігандом націлювання, таким як антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент. Радіоімунокон'югати можна отримати за допомогою реакцій клік-хімії. Також описані способи використання радіокомплексів і радіоімунокон'югатів для селективного націлення на неопластичні клітини для променевої терапії та для лікування неопластичних захворювань і розладів.