

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048132**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.28</p> <p>(21) Номер заявки
202193076</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2020.05.08</p> | <p>(51) Int. Cl. C07D 413/06 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) МАКРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ХЕЛАТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

- | | |
|---|---|
| <p>(31) 62/846,044</p> <p>(32) 2019.05.10</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2022.02.16</p> <p>(86) PCT/IB2020/054381</p> <p>(87) WO 2020/229974 2020.11.19</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Салтер Рис, Дудкин Вадим, Сун
Фынбинь, Чжан Вэй, Голдберг
Шалом, Кейт Джон (US)</p> <p>(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2020106886
WO-A1-2018183906
NIKKI A. THIELE ET AL.: "An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy", ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, vol. 56, no. 46, 16 October 2017 (2017-10-16), pages 14712-14717, XP055543785, DE, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201709532, cited in the application, the whole document
WO-A1-2018187631
W.F. MAGUIRE ET AL.: "Efficient 1-Step Radiolabeling of Monoclonal Antibodies to High Specific Activity with 225Ac for α-Particle Radioimmunotherapy of Cancer", THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 55, no. 9, 30 June 2014 (2014-06-30), pages 1492-1498, XP055568060, US, ISSN: 0161-5505, DOI: 10.2967/jnumed.114.138347, the whole document
ADRIÁN ROCA-SABIO ET AL.: "Macrocyclic Receptor Exhibiting Unprecedented Selectivity for Light Lanthanides", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 131, no. 9, 11 March 2009 (2009-03-11), pages 3331-3341, XP055543760, US, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja808534w, cited in the application, the whole document</p> |
|---|---|

- (57) Предложены макроциклические хелаторы (I) для хелатирования ионов альфа-излучающих радиоактивных металлов, таких как актиний-225. Также предложены комплексы радиоактивных металлов, содержащие ион альфа-излучающего радиоактивного металла, связанный с макроциклическим хелатором посредством координационного связывания, и радиоактивные иммуноконъюгаты, содержащие комплексы радиоактивных металлов, ковалентно связанные с нацеливающим лигандом, таким как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Радиоактивные иммуноконъюгаты могут быть получены с помощью клик-химических реакций. Также описаны способы применения радиоактивных комплексов и радиоактивных иммуноконъюгатов для селективного нацеливания на неопластические клетки для лучевой терапии и лечения неопластических заболеваний и расстройств.

B1**048132****048132 B1**

Перекрестные ссылки на смежные заявки

Данная заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 62/846044, поданной 10 мая 2019 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который подается в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла JBI6072WOPCT1_SeqListing.txt и датой создания 1 мая 2020 г., размер 26 кБ. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Радионуклиды, испускающие альфа-частицы, имеют большие перспективы для лечения злокачественного новообразования благодаря комбинации в них высокой энергии с действием на короткие расстояния, что обеспечивает возможность значительного уничтожения, которое в основном локализуется в опухолевых клетках (Kim, Y.S. and M.W. Brechbiel, An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biol*, 2012. 33(3): p. 573-90). Целевая доставка альфа-излучателей с использованием антитела, каркасного белка, низкомолекулярного лиганда, аптамера или другого связывающего фрагмента, специфического к раковому антигену, обеспечивает способ селективной доставки радионуклида в опухоли для повышения их эффективности и ослабления побочных эффектов. В общепринятой практике связывающий фрагмент присоединен к хелатору, который связывается с альфа-излучающим радиоактивным металлом с образованием радиоактивного комплекса. Во многих таких примерах используют моноклональное антитело (мкАт) в качестве нацеливающего лиганда для получения того, что известно как радиоактивный иммуноконъюгат.

Актиний-225 (^{225}Ac) представляет собой альфа-излучающий радионуклид, который представляет особый интерес для применения в медицинских целях (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). 10-суточный период полураспада ^{225}Ac достаточно велик, чтобы облегчить получение радиоактивного конъюгата, но достаточно короток, чтобы соответствовать фармакокинетике циркуляции средств доставки, таких как антитела. Поэтому радиоактивные иммуноконъюгаты ^{225}Ac представляют особый интерес. Кроме того, ^{225}Ac распадается в течение ряда стадий так, что он в конечном итоге испускает 4 альфа-частицы, прежде чем достичь стабильного изотопа ^{209}Bi , тем самым увеличивая эффективность. Другой радионуклид, представляющий интерес для применения в медицинских целях, представляет собой лютеций-177 (^{177}Lu), который испускает как гамма-излучение, подходящее для визуализации, так и бета-излучение средней энергии, подходящее для лучевой терапии. Было показано, что Lu-меченные пептиды демонстрируют уменьшенное повреждение нормальной ткани, и что ^{177}Lu -мечение позволяет использовать один радиоактивно меченный агент как для терапии, так и для визуализации (Kwekkeboom DJ, et al. [^{177}Lu -DOTA⁰,Tyr³]octreotate: comparison with [^{111}In -DTPA⁰]octreotide in patients. *Eur J Nucl Med*. 2001;28: p. 1319-1325). Другие радионуклиды, которые используются для применения в терапевтических целях, включают, например, бета- или альфа-излучатели, такие как, например, ^{32}P , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{165}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{255}Fm и ^{227}Th . Другие радионуклиды, которые используются для визуализации, включают гамма-излучающие радионуклиды, такие как, например, ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr , и ^{111}In .

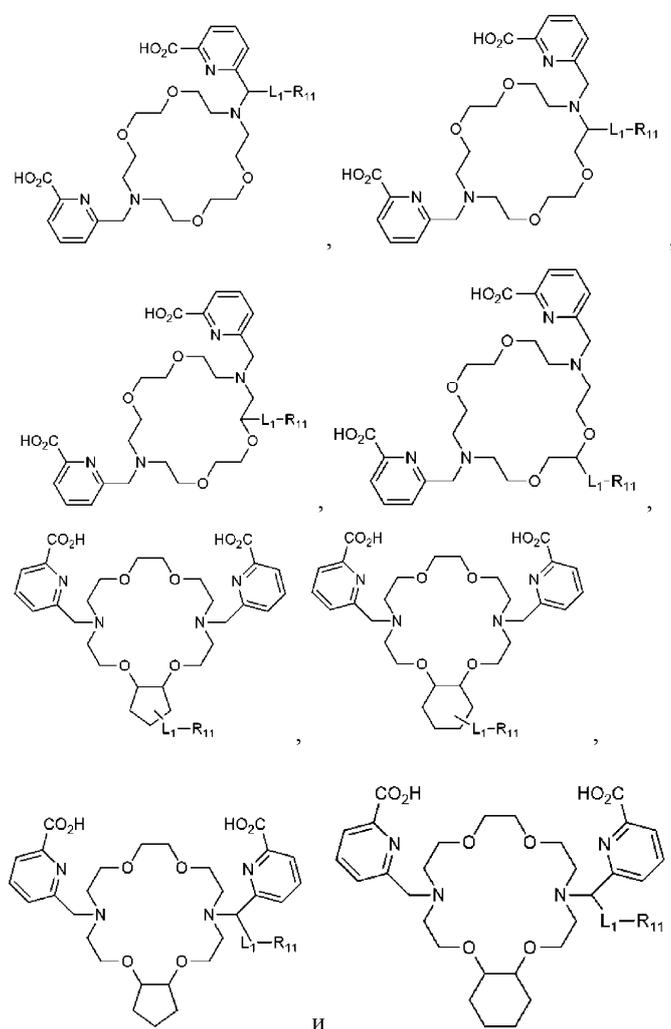
В настоящее время наиболее широко используемым хелатором для актиния-225 и лантанидов является DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота; тетракетан); в предшествующих программах клинических и доклинических исследований, как правило, использовали 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA) для хелатирования актиния. Однако известно, что хелатирование актиния с использованием DOTA может представлять собой сложную задачу (Deal, K.A., et al., Improved in vivo stability of actinium-225 macrocyclic complexes. *J Med Chem*, 1999. 42(15): p. 2988-92). Например, при присоединении к нацеливающим лигандам, таким как белки или антитела, DOTA обеспечивает соотношение для DOTA : актиний-225 по меньшей мере > 500 : 1 для хелатирования и часто требует жестких условий или высоких уровней DOTA на антитело. Другие макроциклические хелаты для лантанидов и актиния-225 описаны, например, в публикации международной заявки на патент 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-специфичность стала наиболее важным направлением в разработке конъюгатов антитело-лекарственное средство (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), поскольку было продемонстрировано, что как эффективность, так и безопасность ADC могут быть повышены с помощью способов сайт-специфической конъюгации по сравнению со случайной конъюгацией. Считается, что для радиоактивных иммуноконъюгатов могут быть достигнуты аналогичные преимущества в отношении безопасности и эффективности.

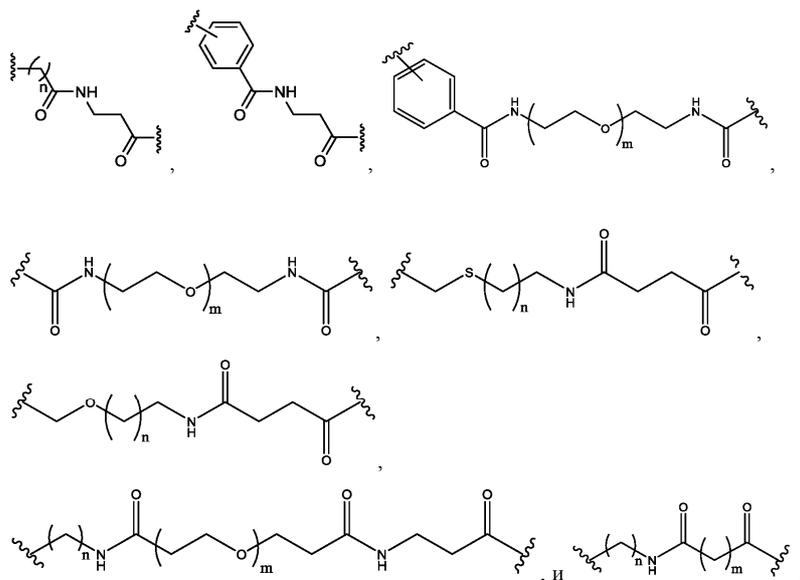
Краткое изложение сущности изобретения

Соответственно, в данной области существует потребность в новых хелаторах, которые связывают радиоактивные металлы, предпочтительно альфа-излучающие радиоактивные металлы, такие как актиний-225 (^{225}Ac), и которые можно использовать для получения стабильных радиоактивных иммуноконъюгатов с высокой удельной радиоактивностью и высоким выходом. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, предлагая макроциклический хелатор, способный связывать радиоактивные металлы, такие как альфа-излучающие радиоактивные металлы, в частности ^{225}Ac , независимо от удельной радиоактивности или содержания наиболее распространенных примесей металлов. Хелаторы изобретения можно использовать для получения радиоактивных иммуноконъюгатов, имеющих высокую стабильность *in vitro* и *in vivo*, путем конъюгации с нацеливающим лигандом, таким как антитело, белок, аптамер, низкомолекулярный лиганд и т.д., предпочтительно сайт-специфическим образом с использованием "клик-реакций". Радиоактивные иммуноконъюгаты, полученные путем конъюгации хелатора изобретения с нацеливающим лигандом, можно использовать для нацеленной радиотерапии, например, для целевой радиотерапии неопластической клетки и/или целенаправленного лечения неопластического заболевания или неопластической патологии, включая рак.

В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к хелатору, выбранному из группы, состоящей из



где L₁ отсутствует или представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6;

R_{11} представляет собой $-NH_2$, $-NCS$, $-NCO$, $-N_3$, алкинил, циклоалкинил, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, или R_{11} содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

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

где алкил представляет собой метил, этил, пропил, бутил или пентил;

циклоалкинил представляет собой циклоалкильную группу, содержащую от 8 до 10 атомов углерода и содержащую по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода;

алкинил определяется как алкильная группа, имеющая от 2 до 10 атомов углерода и

содержащая по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода; и

ацилгалогенид относится к фрагменту $-C(O)X$, где X представляет собой галоген.

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

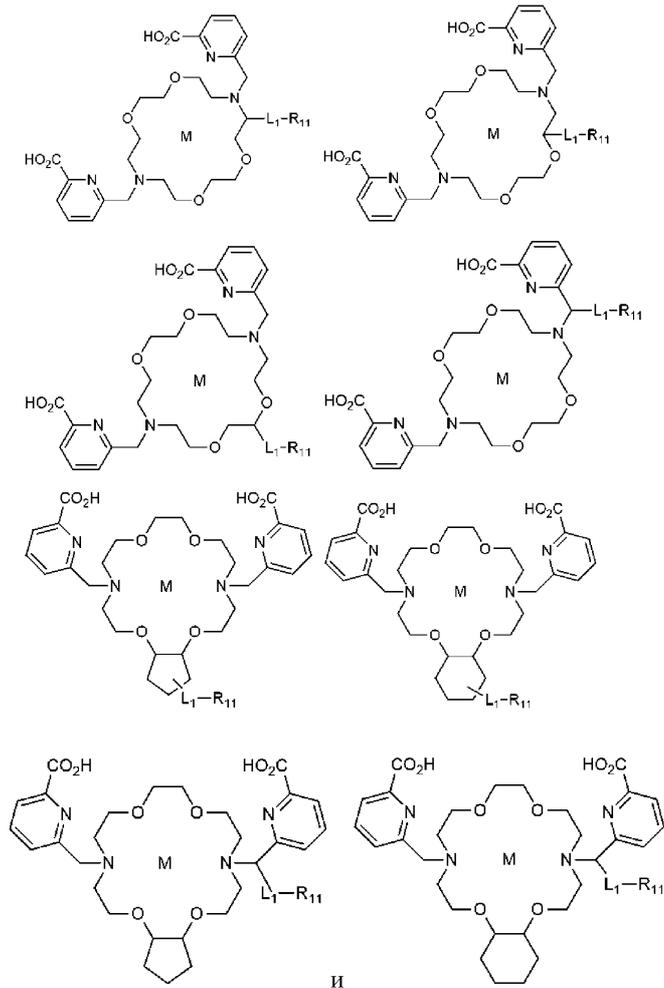
В определенных вариантах осуществления R_{11} выбран из группы, состоящей из бициклононила (BCN), дифтористого циклооктинила (DIFO), дибензоциклооктинила (DIBO), кето-DIBO, биарилаза-циклооктинонила (BARAC), дибензоаза-циклооктинила (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиаза-циклооктинила (DIMAC), дифторбензоциклооктинила (DIFBO), монобензоциклооктинила (MOBO) и тетраметоксидибензоциклооктинила (TMDIBO).

В конкретных вариантах осуществления R_{11} представляет собой DBCO или BCN.

В некоторых вариантах осуществления R_{11} содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

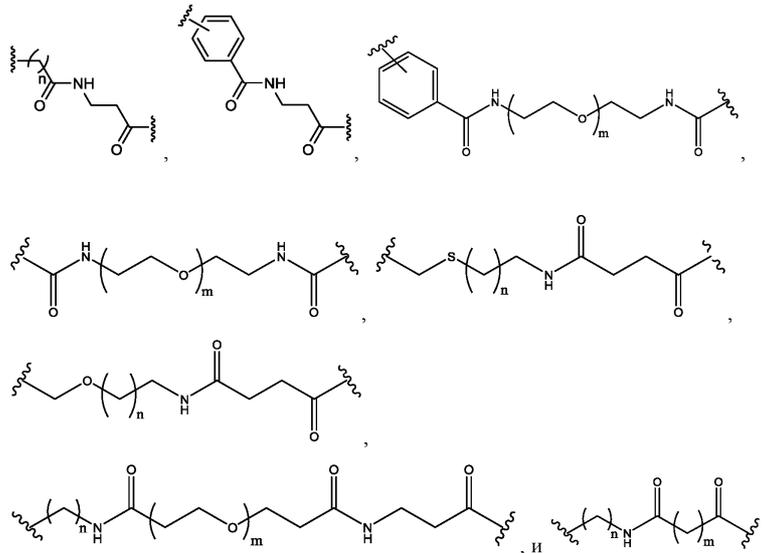
В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к комплексу радиоактивного металла, выбранного из группы, состоящей из



и

где М представляет собой актиний-225 (^{225}Ac);

L_1 отсутствует или представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6;

R_{11} представляет собой -NH_2 , -NCS , -NCO , -N_3 , алкинил, циклоалкинил, -C(O)R_{13} , -COOR_{13} , $\text{-CON(R}_{13})_2$, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, или R_{11} содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

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

где алкил представляет собой метил, этил, пропил, бутил или пентил;

циклоалкинил представляет собой циклоалкильную группу, содержащую от 8 до 10 атомов углерода и содержащую по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода;

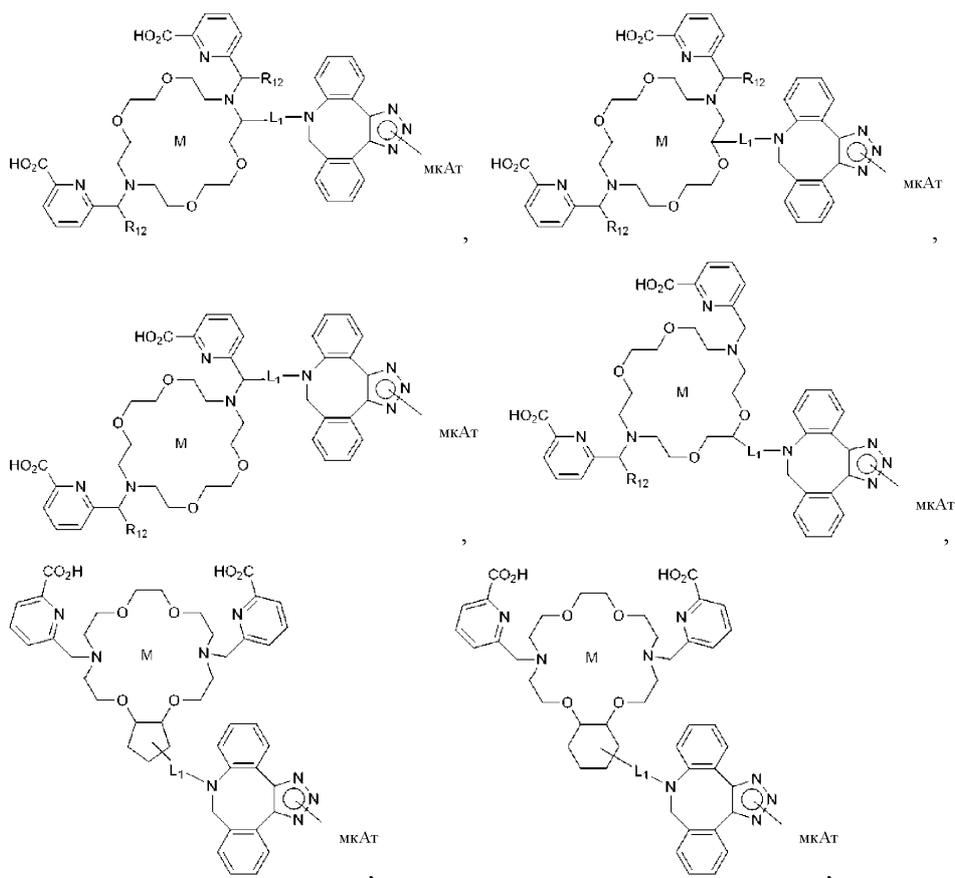
алкинил определяется как алкильная группа, имеющая от 2 до 10 атомов углерода и содержащая по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода; и ацилгалогенид относится к фрагменту $-C(O)X$, где X представляет собой галоген.

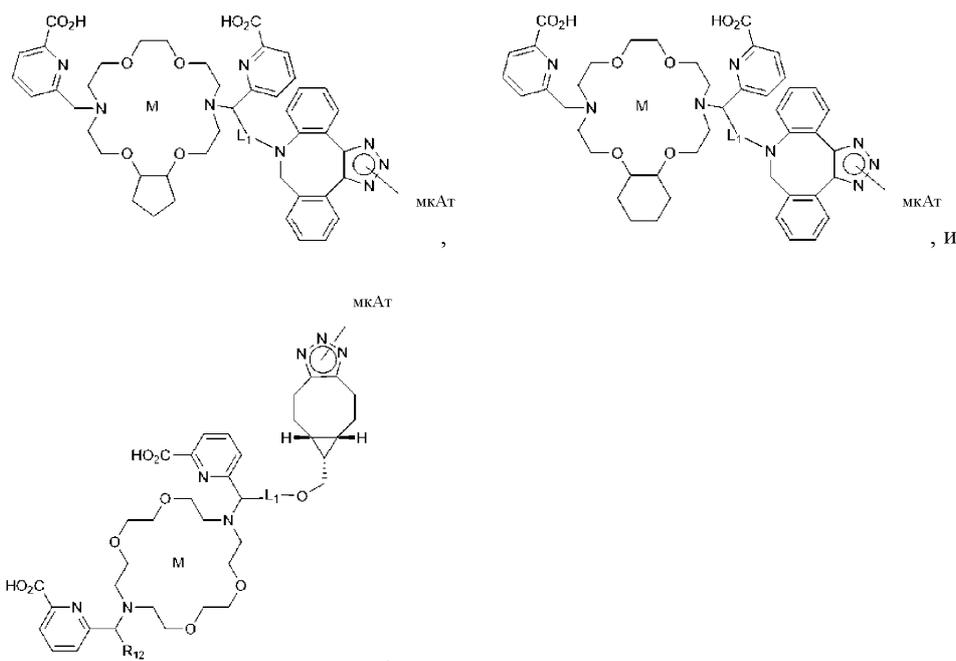
В другом общем аспекте изобретение относится к радиоактивному иммуноконъюгату, содержащему комплекс радиоактивного металла по изобретению, конъюгированный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к радиоактивному иммуноконъюгату, содержащему комплекс радиоактивного металла изобретения, связанный посредством R_{11} с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

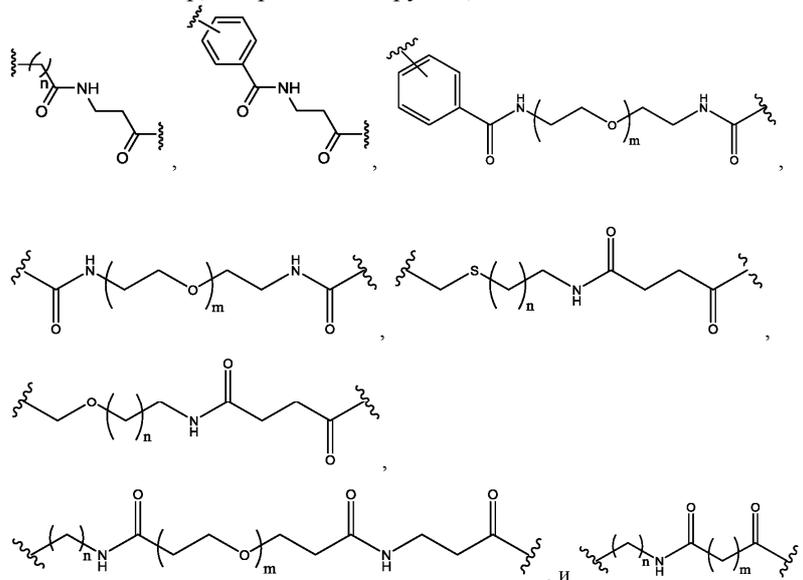
В одном варианте осуществления радиоактивный иммуноконъюгат содержит радиоактивный комплекс изобретения, связанный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, посредством триазольного фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления радиоактивный иммуноконъюгат выбирают из группы, состоящей из





где М представляет собой актиний-225 (^{225}Ac);
 L_1 представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6;
 мкАт представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и
каждый R_{12} представляет собой водород.

В другом общем аспекте изобретение относится к способам получения радиоактивного иммуноконъюгата изобретения, которые включают ковалентное связывание хелатора или радиоактивного комплекса металла изобретения с нацеливающим лигандом, предпочтительно посредством R_{11} хелатора, или радиоактивного комплекса металла с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В конкретном варианте осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата изобретения включает способ "одностадийного прямого радиоактивного мечения" (например, как проиллюстрировано на фиг. 2С), включающий:

(i) обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции (например, азидной группой);

(ii) обеспечение хелатирующего комплекса, содержащего хелатор изобретения, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции (например, алкинильной или циклоалкинильной группой);

(iii) приведение модифицированного полипептида в контакт с хелатирующим комплексом в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции (например, азидной группе) реагировать со вторым партнером по клик-реакции (например, алкинильной или циклоалкинильной группой) с образовани-

ем таким образом полипептид-хелатного комплекса (т.е. иммуноконъюгата); и

(iv) приведение полипептид-хелатного комплекса в контакт с ионом радиоактивного металла с получением таким образом радиоактивного иммуноконъюгата (причем радиоактивный иммуноконъюгат содержит полипептид, меченный ионом радиоактивного металла, например, модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, меченые ионом альфа-излучающего радиоактивного металла, связанным с хелатором посредством координационного связывания).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления стадию (iv) проводят в условиях отсутствия металлов. Предпочтительно способ осуществляют сайт-специфическим образом, как описано в настоящем документе.

В альтернативном варианте осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата изобретения включает способ "радиоактивного мечения с помощью клик-реакции" (например, как проиллюстрировано на фиг. 2D):

(i) обеспечение модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной группой;

(ii) обеспечение радиоактивного комплекса настоящего изобретения, содержащего ион альфа-излучающего радиоактивного металла, связанного с хелатором посредством координационной связи, причем хелатор ковалентно связан с алкинильной или циклоалкинильной группой; и

(iii) приведение в контакт модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих азидной группе реагировать с алкинильной или циклоалкинильной группой с получением таким образом радиоактивного иммуноконъюгата.

В некоторых вариантах осуществления циклоалкинильная группа представляет собой циклооктинил или производное циклооктинила, выбранное из группы, состоящей из бициклононина (BCN), двухфтористого циклооктина (DIFO), дибензоциклооктина (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинона (BARAC), дибензоазациклооктина (DIBAC), диметоксиазациклооктина (DIMAC), дифторбензоциклооктина (DIFBO), монобензоциклооктина (MOBO) и тетраметокси-дибензоциклооктинила (TMDIBO).

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

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способам применения радиоактивных иммуноконъюгатов и фармацевтических композиций изобретения для нацеленной лучевой терапии.

В одном варианте осуществления предложен способ селективного нацеливания на неопластические клетки для лучевой терапии пациента, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции изобретения.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения неопластического заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом; способ включает введение субъекту фармацевтической композиции изобретения.

Подробное описание графических материалов

Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения станут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми графическими материалами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

В графических материалах показано следующее.

На фиг. 1A-1B представлены хроматограммы ВЭЖХ из испытания на хелатирование с La^{3+} , описанного в примере 1; на фиг. 1A представлены хроматограммы ВЭЖХ H2bp18c6-бензилфенила перед смешиванием (сверху) и после смешивания с La^{3+} ; смещение времени удерживания от 14,137 до 12,047 мин после смешивания с La^{3+} указывает на быстрое хелатирование La^{3+} H2bp18c6-бензилфенилом; на фиг. 1B представлены хроматограммы ВЭЖХ H2bp18c6-бензилизопентила перед смешиванием (сверху) и после смешивания с La^{3+} ; смещение времени удерживания от 17,181 до 15,751 мин после смешивания с La^{3+} указывает на быстрое хелатирование La^{3+} H2bp18c6-бензилизопентилом; и

на фиг. 2 схематически представлено радиоактивное мечение антитела с получением радиоактивного иммуноконъюгата в соответствии с вариантами осуществления изобретения способами случайной конъюгации (например, способами мечения лизиновых остатков, цистеиновых остатков и т.д.) или способами сайт-специфической конъюгации (например, гликан-специфическими способами, способами с меткой конъюгации или внедренными цистеиновыми способами); на фиг. 2A схематично представлена случайная конъюгация посредством одностадийного прямого радиоактивного мечения; на фиг. 2B на схеме показана случайная конъюгация посредством радиоактивного мечения с помощью клик-реакции; на фиг. 2C представлена сайт-специфическая конъюгация посредством одностадийного прямого радиоактивного мечения; и

на фиг. 2D схематично представлена сайт-специфическая конъюгация посредством радиоактивного мечения с помощью клик-реакции.

Подробное описание изобретения

В разделе "Предпосылки создания изобретения" и в тексте изобретения приведены цитаты или опи-

сания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

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

Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

На протяжении всего данного описания и последующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как означающие включение упомянутого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. При применении в настоящем документе термин "содержащий" может быть заменен термином "состоящий из" или "включающий в себя" или иногда при применении в настоящем документе может быть заменен термином "имеющий".

При применении в настоящем документе термин "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не упомянутый в элементе формулы изобретения. При применении в настоящем документе термин "состоящий по существу из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любые из вышеупомянутых терминов "содержащий", "состоящий из", "включающий" и "имеющий" при применении в настоящем документе в контексте аспекта или варианта осуществления описания могут быть заменены термином "состоящий из" или "состоящий по существу из" для варьирования объемов описания.

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

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

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, описание "10-кратное" включает в себя 9-кратное и 11-кратное. В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которому будет или был введен радиоактивный иммуноконъюгат изобретения. В настоящем документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее.

Примеры млекопитающих включают, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов, не относящихся к человеку (ННП), таких как низшие и высшие обезьяны, людей и т.п., более предпочтительно человека.

Используемый в настоящем документе термин "алкил" означает насыщенную, одновалентную, неразветвленную или разветвленную углеводородную цепь. Примеры алкильных групп включают в себя, без ограничений, метил (Me), этил (Et), пропил (например, н-пропил, изопропил), бутил (например, н-

бутил, изобутил, трет-бутил) и пентил (например, н-пентил, изопентил, неопентил) и т.д.

Термин "циклоалкил" относится к моно- или полициклической алкильной группе, имеющей от 3 до 12, более предпочтительно от 3 до 8 атомов углерода в кольце(ах). Примеры моноциклических циклоалкильных колец включают, без ограничений, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогексил, циклогептил, циклооктил и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "алкокси" относится к -О-алкильной группе или -OR группе, в которой R представляет собой алкил, причем алкил соответствует приведенному выше определению. Алкоксигруппа присоединена к первичной молекуле через атом кислорода. Примеры алкокси включают в себя, без ограничений, метокси, этокси, пропокси (например, н-пропокси, изопропокси), бутокси (например, н-бутокси, изобутокси, трет-бутокси), пентилокси (например, н-пентилокси, изопентилокси, неопентилокси) и т.д. Алкоксигруппа может быть незамещенной или замещенной одним или более подходящими заместителями. Аналогичным образом "алкилтио" или "тиоалкокси" относится к группе -SR, в которой R представляет собой алкил, присоединенный к первичной молекуле посредством серного мостика, например, -S-метил, -S-этил и т.д. Типичные примеры алкилтио включают в себя, без ограничений, -SCH₃, -SCH₂CH₃ и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "галоген" означает фтор, хлор, бром или йод. Соответственно, термин "галоген" означает фтор, хлор, бром или йод.

Термины "гидрокси" и "гидроксил" могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к -ОН.

Термин "карбоксии" относится к -COOH.

Термин "циано" относится к -CN.

Термин "нитро" относится к -NO₂.

Термин "изотиоцианат" относится к -N=C=S.

Термин "изоцианат" относится к -N=C=O.

Термин "азидо" относится к -N₃.

Термин "алкенил" относится к линейной или разветвленной углеводородной цепи, имеющей по меньшей мере два атома углерода, например от 2 до 10 атомов углерода, и содержащей по меньшей мере одну двойную связь между двумя атомами углерода. Алкенил может иметь одну двойную связь углерод-углерод или множество двойных связей углерод-углерод, например, 2, 3, 4 или более двойных связей углерод-углерод. Примеры алкенильных групп включают, без ограничений, метенил, этенил, пропенил, бутенил и т.д.

Термин "циклоалкенил" относится к моно- или полициклической алкильной группе, имеющей от 3 до 12, более предпочтительно от 3 до 8 атомов углерода в кольце(ах) и содержащей по меньшей мере одну двойную связь между двумя атомами углерода. Циклоалкенил может иметь одну двойную связь углерод-углерод или множество двойных связей углерод-углерод, например 2, 3, 4 или более двойных связей углерод-углерод. Примеры циклоалкенильных групп включают, без ограничений, циклопропенил, циклобутенил, циклогептенил, циклогексенил и т.д.

В настоящем документе термин "алкинил", "алкиновая группа" или "алкиновый фрагмент" относится к линейной или разветвленной углеводородной цепи, имеющей по меньшей мере два атома углерода, например от 2 до 10 атомов углерода, и содержащей по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода. Алкинильная группа может представлять собой концевую алкинильную группу или циклическую алкинильную группу. Терминальный алкин имеет по меньшей мере один атом водорода, связанный с атомом углерода с тройной связью. "Циклоалкин" или "циклоалкинил" представляет собой циклоалкильное кольцо, содержащее по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода. Примеры циклоалкинов или циклоалкинильных групп включают, но не ограничиваются ими, циклооктин и производные циклооктина, такие как бициклононин (BCN), двухфтористый циклооктин (DIFO), дибензоциклооктин (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинон (BARAC), дибензоазациклооктин (DIBAC), диметоксиазациклооктин (DIMAC), дифторбензоциклооктин (DIFBO), монобензоциклооктин (MOBO) и тетраметокси-DIBO (TMDIBO).

Термин "амино" относится к -NH₂. Термин "алкиламино" относится к аминогруппе, в которой один или оба атома водорода, связанные с азотом, замещены алкильной группой. Алкиламиногруппа может быть представлена как -NR₂, в которой каждый R независимо представляет собой водород или алкильную группу. Например, алкиламин включает метиламин (-NHCH₃), диметиламин (-N(CH₃)₂), -NHCH₂CH₃ и т.д. Предполагается, что используемый в настоящем документе термин "аминоалкил" включает в себя как разветвленные, так и линейные насыщенные алифатические углеводородные группы, замещенные одной или более аминогруппами. Типичные примеры аминоалкильных групп включают, без ограничений, -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂ и -CH₂CH(NH₂)CH₃.

Используемый в настоящем документе термин "амид" относится к -C(O)N(R)₂, где каждый R независимо представляет собой алкильную группу или водород. Примеры амидов включают, без ограничений, -C(O)NH₂, -C(O)NHCH₃ и -C(O)N(CH₃)₂.

Термины "гидроксиалкил" и "гидроксиалкил" используются взаимозаменяемо и относятся к алкильной группе, замещенной одной или более гидроксильными группами. Алкил может представлять собой разветвленный или линейный алифатический углеводород. Примеры гидроксилалкила включают в

себя, без ограничений, гидроксиметил ($-\text{CH}_2\text{OH}$), гидроксипропил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "арил" относится к группе, которая содержит любую ароматическую группу на основе углерода, включая, без ограничений, фенил, нафтил, антраценил, фенантрил и т.п. Арильные фрагменты хорошо известны и описаны, например, в работе R.J., ed., Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 13th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997). Арильная группа может представлять собой одну кольцевую структуру (т.е. моноциклическую) или содержать множество кольцевых структур (т.е. полициклическую), которые являются конденсированными кольцевыми структурами. Предпочтительно арильная группа представляет собой моноциклическую арильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "гетероцикл" включает стабильные моноциклические и полициклические углеводороды, которые содержат по меньшей мере один гетероатом, являющийся членом кольца, такой как сера, кислород или азот. Используемый в настоящем документе термин "гетероарил" включает стабильные моноциклические и полициклические ароматические углеводороды, которые содержат по меньшей мере один гетероатом, являющийся членом кольца, такой как сера, кислород или азот. Гетероарил может быть моноциклическим или полициклическим, например, бициклическим или трициклическим. Каждое кольцо гетероциклической или гетероарильной группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или от одного до четырех атомов азота при условии, что общее число гетероатомов в каждом кольце составляет четыре или менее, и каждое кольцо имеет по меньшей мере один атом углерода. Гетероарильные группы, которые являются полициклическими, например бициклическими или трициклическими, должны включать по меньшей мере одно полностью ароматическое кольцо, но другое конденсированное кольцо или кольца могут быть ароматическими или неароматическими. Гетероциклическая или гетероарильная группа может быть присоединена по любому доступному атому азота или углерода любого кольца гетероциклической или гетероарильной группы. Предпочтительно термин "гетероарил" относится к 5- или 6-членным моноциклическим группам и 9- или 10-членным бициклическим группам, имеющим по меньшей мере один гетероатом (O, S или N) в по меньшей мере одном из колец, причем кольцо, содержащее гетероатом, предпочтительно имеет 1, 2 или 3 гетероатома, более предпочтительно 1 или 2 гетероатома, выбираемых из O, S и/или N. Гетероатом(ы) азота гетероарила может(могут) быть замещенным(и) или незамещенным(и). Кроме того, гетероатом(ы) азота и серы гетероарила могут необязательно быть окисленными (т.е. $\text{N} \rightarrow \text{O}$ и $\text{S}(\text{O})_g$, где g равен 0, 1 или 2).

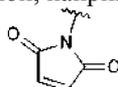
Термин "эфир" относится к $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}$, где R представляет собой алкил.

Термин "карбамат" относится к $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}_2$, где каждый R независимо представляет собой алкил или водород.

Термин "альдегид" обозначает группу $-\text{C}(\text{O})\text{H}$.

Термин "карбонат" относится к $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}$, где R представляет собой алкил.

Термин "малеимид" относится к группе с химической формулой $\text{H}_2\text{C}_2(\text{CO})_2\text{NH}$. Термин "малеимид" относится к малеимидной группе, ковалентно связанной с другой группой или молекулой. Предпочтительно малеимидная группа является N-связанной, например



Термин "ацилгалогенид" относится к $-\text{C}(\text{O})\text{X}$, где X представляет собой галоген (например, Br, Cl). Примеры ацилгалогенидов включают ацилхлорид ($-\text{C}(\text{O})\text{Cl}$) и ацилбромид ($-\text{C}(\text{O})\text{Br}$).

Используемый в настоящем документе термин "замещенный" означает, что по меньшей мере один атом водорода замещен неводородной группой при условии, что все нормальные валентности поддерживаются и что замещение приводит к получению стабильного соединения. Если конкретная группа является "замещенной", эта группа может иметь один или более заместителей, предпочтительно от одного до пяти заместителей, более предпочтительно от одного до трех заместителей, наиболее предпочтительно от одного до двух заместителей, независимо выбранных из списка заместителей. Термин "независимо" при использовании в отношении заместителей означает, что, когда возможно более одного из таких заместителей, такие заместители могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Любая из групп заместителей, описанных в данном документе (например, алкил, циклоалкил, алкокси, алкенил, циклоалкенил, алкинил, циклоалкинил, арил, гетероцикл, гетероарил и т.д.), может быть незамещенной или содержать один или более подходящих заместителей. Примеры подходящих заместителей включают в себя, без ограничений, алкил, галоген, гидрокси, алкокси, амид, алкилтио, amino, алкиламино, аминоалкил, гидроксиалкил, гидроксил, карбоксил и т.д.

В соответствии с общепринятыми в данной области правилами



используется в структурных формулах в настоящем документе для иллюстрации связи, которая является точкой присоединения фрагмента, функциональной группы или заместителя к сердцевине, родительской структуре или структуре каркаса, такой как хелатор или нацеливающий лиганд.

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

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

В контексте данного документа термин "ион радиоактивного металла" или "ион радиометалла" относится к одному или более изотопам элементов, которые испускают частицы и/или фотоны. В изобретении может быть использован любой ион радиоактивного металла, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Примеры ионов радиоактивных металлов, подходящих для применения в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, ^{32}P , ^{47}Sc , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{68}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 и ^{255}Fm . Предпочтительно ион радиоактивного металла представляет собой "терапевтический излучатель", т.е. ион радиоактивного металла, который можно использовать в терапевтических сферах применения. Примеры терапевтических излучателей включают, но не ограничиваются ими, бета- или альфа-излучатели, такие как ^{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 и ^{227}Th . Предпочтительно используемый в настоящем изобретении ион радиоактивного металла представляет собой ион альфа-излучающего радиоактивного металла, такой как актиний-225 (^{225}Ac).

В контексте данного документа термин "хелатор" или "хелатирующий агент" относится к химическому соединению, которое может хелатировать металл, предпочтительно радиоактивный металл, посредством координационного связывания. В типичном варианте осуществления хелатор представляет собой макроциклическое кольцо, содержащее один или более гетероатомов, например, кислород и/или азот в качестве атомов в кольце. Предпочтительно хелатор представляет собой производное 4,13-диаза-18-краун-6.

Используемый в настоящем документе термин "комплекс радиоактивного металла" относится к комплексу, содержащему ион радиоактивного металла, связанный с хелатором. Как правило, ион радиоактивного металла связан или координируется с хелатором посредством координационной связи. Гетероатомы макроциклического кольца могут участвовать в координированном связывании иона радиоактивного металла с хелатором. Хелатор может быть замещен одной или более замещающими группами, и одна или более замещающих групп также могут участвовать в координированном связывании иона радиоактивного металла с хелатором в дополнение, или в альтернативном варианте осуществления, с гетероатомами макроциклического кольца.

В контексте данного документа "клик-химия" относится к химическому понятию, введенному Шарплессом, которое описывает химические реакции, специально приспособленные для быстрого и надежного образования ковалентных связей путем соединения малых единиц, включающих реакционно-способные группы (см. Kolb, et al., *Angewandte Chemie International Edition* (2001) 40: 2004-2021). Клик-химия относится не к конкретной реакции, а к концепции, включающей, не ограничиваясь этим, реакции, которые имитируют реакции, обнаруженные в природе. В некоторых вариантах осуществления клик-реакции являются модульными, имеют широкую область применения, дают высокие продукты реакции, дают инертные побочные продукты, являются стереоспецифичными, демонстрируют большую термодинамическую движущую силу, которая способствует реакции с одним продуктом реакции, и/или могут проводиться при физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления клик-реакция может быть проведена в простых реакционных условиях, использует легко доступные исходные материалы и реагенты, не использует токсичных растворителей или использует растворитель, который является мягким или легко удаляемым, таким как вода, и/или обеспечивает простое выделение продукта нехроматографическими методами, такими как кристаллизация или дистилляция.

В клик-химических реакциях используются реактивные группы, которые редко встречаются в природных биомолекулах и химически инертны по отношению к биомолекулам, но когда партнеры по клик-реакции взаимодействуют между собой, реакция может происходить эффективно в биологически соответствующих условиях, например, в условиях культивирования клеток, таких как отсутствие избыточного тепла и/или агрессивных реагентов. Как правило, для клик-реакций необходимо по меньшей мере две молекулы, содержащие партнеров по клик-реакции, которые могут взаимодействовать друг с другом. Такие партнеры по клик-реакции, которые реагируют друг с другом, иногда упоминаются в данном документе как пары ручек клик-реакции или пары клик-реакции. В некоторых вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой азид и напряженный алкин, например циклооктин или производное циклооктина, или любой другой алкин. В других вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой реакционноспособные диены и подходящие тетраэндиенофилы. Например, транс-циклооктен, норборнен или бисциклононен можно соединить с подходящим тетраэндиенофилом в качестве пары клик-реакции. В еще других вариантах осуществления тетразолы могут высту-

пать в качестве скрытых источников нитрилиминов, которые могут соединяться с неактивированными алкенами в присутствии ультрафиолетового света с образованием пары клик-реакции, называемой парой "фотоклик"-реакции. В других вариантах осуществления партнеры клик-реакции представляют собой цистеин и малеимид. Например, цистеин из пептида (например, GGGC) может взаимодействовать с малеимидом, который связан с хелатирующим агентом (например, NOTA). Специалистам в данной области техники известны другие подходящие скобы клик-реакции (см., например, Spicer et al., Selective chemical protein modification. *Nature Communications*. 2014; 5: p. 4740). В других вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой компоненты лигирования по Штаудингеру, такие как фосфин и азид. В других вариантах осуществления партнеры по клик-реакции представляют собой компоненты реакции Дильса-Альдера, такие как диены (например, тетразин) и алкены (например, транс-циклооктен (ТСО) или норборнен). Иллюстративные партнеры по клик-реакции описаны в US 20130266512 и в WO 2015073746, соответствующее описание партнеров по клик-реакции в обоих случаях включено в данный документ посредством ссылки.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления в клик-реакции в качестве пары клик-реакций или партнеров по реакции используют азидную и алкиновую группу, более предпочтительно напряженную алкиновую группу, например, циклоалкин, такой как циклооктин или производное циклооктина. В таких вариантах осуществления клик-реакция представляет собой циклоприсоединение по Хьюгену или 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом ($-N_3$) и алкиновым фрагментом с образованием 1,2,3-триазольного линкера. Клик-реакции между алкинами и азидами обычно требуют добавления медного катализатора для ускорения реакции 1,3-циклоприсоединения и известны как катализируемые медью реакции азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC). Однако клик-реакции между циклооктином или производными циклооктина и азидами обычно не требуют добавления медного катализатора, а вместо этого протекают посредством промотируемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC) (Debets, M.F., et al., *Bioconjugation with strained alkenes and alkynes*. *Acc Chem Res*, 2011.44(9): p. 805-15).

При использовании в настоящем документе термин "нацеливающий лиганд" относится к любой молекуле, которая обеспечивает повышенную аффинность к выбранной мишени, например антигену, клетке, типу клетки, ткани, органу, области тела или компартменту (например, клеточному, тканевому или органному компартменту). Нацеливающие лиганды включают в себя, без ограничений, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, низкомолекулярные лиганды, аптамеры, полипептиды и каркасные белки. Нацеливающий лиганд предпочтительно представляет собой полипептид, более предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, сконструированный домен или каркасный белок.

В контексте данного документа термин "полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, связанных с ними природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями. Термин "полипептид" относится к полипептиду любого размера, структуры или функции. Как правило, полипептид имеет длину не менее трех аминокислот. Полипептид может быть природным, рекомбинантным или синтетическим, или любой их комбинацией. Синтетические полипептиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления полипептид представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело, или его фрагмент, такой как его антигенсвязывающий фрагмент. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления антитело или его фрагмент является специфическим для ракового антигена. В соответствии с другими вариантами осуществления полипептид представляет собой сконструированный домен или каркасный белок.

В контексте данного документа термин "антитело" или "иммуноглобулин" используется в широком значении и относится к молекулам иммуноглобулинов или антител, включая поликлональные антитела, моноклональные антитела включая мышьиные/крысиные, человеческие, адаптированные к человеку, гуманизированные и химерные моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

В общем смысле антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые специфически связываются со специфическим антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Антитела, использованные в изобретении, могут быть из любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа и лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела, использованные в изобретении, включают константные области тяжелой и/или легкой цепи, мышьиных антител или человеческих антител. Каждый из четырех подклассов IgG имеет различные биологические функции, известные как эффекторные функции. Эти эффекторные функции, как правило, опосредованы через взаимодействие с Fc-рецептором (FcγR) или путем связывания C1q и фиксации комплемента. Связывание с FcγR может приводить к антителозависимому клеточно-опосредованному цитолизу, тогда как связывание с факторами комплемента

может приводить к комплемент-опосредованному лизису клеток. Антитело, пригодное для изобретения, может не иметь или может иметь минимальную эффекторную функцию, но сохранять свою способность связывать FcRn.

В контексте данного документа термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), молекула одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (одАт), димер scFv (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит структуру полного антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. При использовании в настоящем документе термин "одноцепочечное антитело" относится к стандартному для данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом размером от около 15 до около 20 аминокислот. При использовании в настоящем документе термин "однодоменное антитело" относится к стандартному для данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

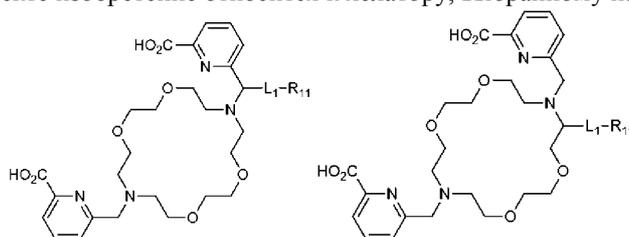
В контексте данного документа термин "каркас" или "каркасный белок" относится к любому белку, который имеет домен, связывающий мишень, и который может связываться с мишенью. Каркас содержит "каркасную область", которая, как правило, является структурной, и "связывающий домен", который вступает в контакт с мишенью и обеспечивает специфическое связывание. Связывающий домен каркаса не обязательно должен определяться одной непрерывной последовательностью каркаса. В некоторых случаях каркас может быть частью более крупного связывающего белка, который сам по себе может быть частью мультимерного связывающего белка, который содержит несколько каркасов. Некоторые связывающие белки могут быть би- или мультиспецифическими в том смысле, что они могут связываться с двумя или более различными эпитопами. Каркас может быть получен из одноцепочечного антитела, или каркас может быть получен не из антитела.

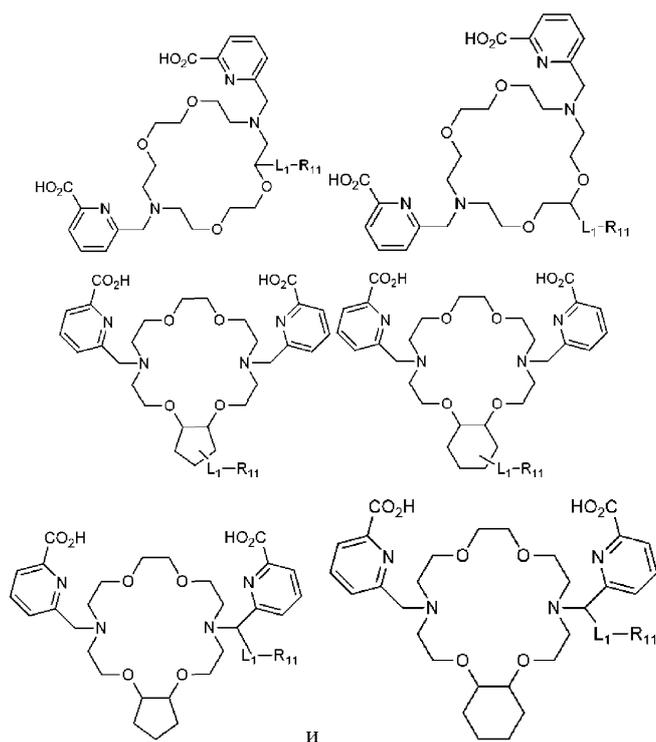
В контексте данного документа термин "аптамер" относится к одноцепочечному олигонуклеотиду (одноцепочечной молекуле ДНК или РНК), который может специфически связываться со своей мишенью с высокой аффинностью. Аптамер может быть использован в качестве молекулы, нацеленной на различные органические и неорганические вещества.

В контексте данного документа термин "низкомолекулярный лиганд" относится к низкомолекулярному органическому соединению. В контексте данного документа низкомолекулярные лиганды могут относиться к соединениям, которые имеют размер менее чем около 1000 Да, и могут быть синтезированы в лаборатории или найдены в природе.

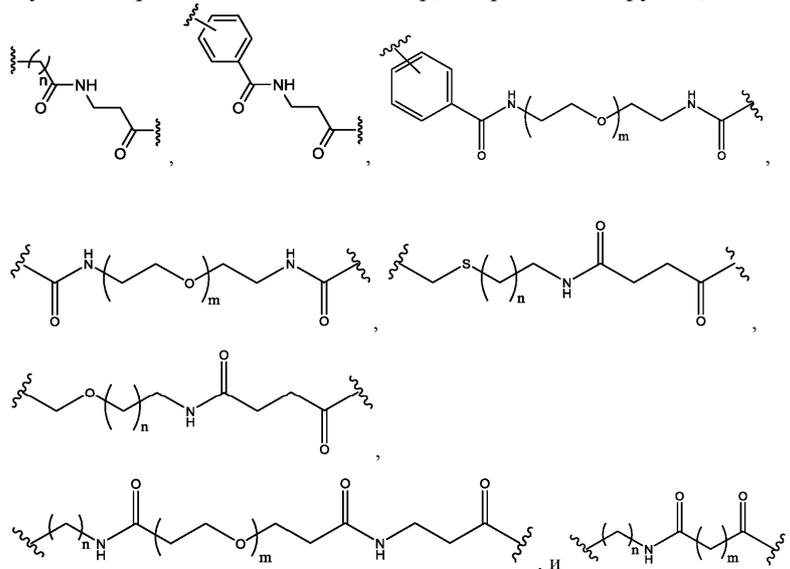
Хелаторы.

В одном общем аспекте изобретение относится к хелатору, выбранному из группы, состоящей из





где L₁ отсутствует или представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6;

R₁₁ представляет собой -NH₂, -NCS, -NCO, -N₃, алкинил, циклоалкинил, -C(O)R₁₃, -COOR₁₃, -CON(R₁₃)₂, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, или R₁₁ содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

каждый из R₁₃ независимо представляет собой водород или алкил;

где алкил представляет собой метил, этил, пропил, бутил или пентил;

циклоалкинил представляет собой циклоалкильную группу, содержащую от 8 до 10 атомов углерода и содержащую по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода;

алкинил определяется как алкильная группа, имеющая от 2 до 10 атомов углерода и содержащая по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода; и

ацилгалогенид относится к фрагменту -C(O)X, где X представляет собой галоген.

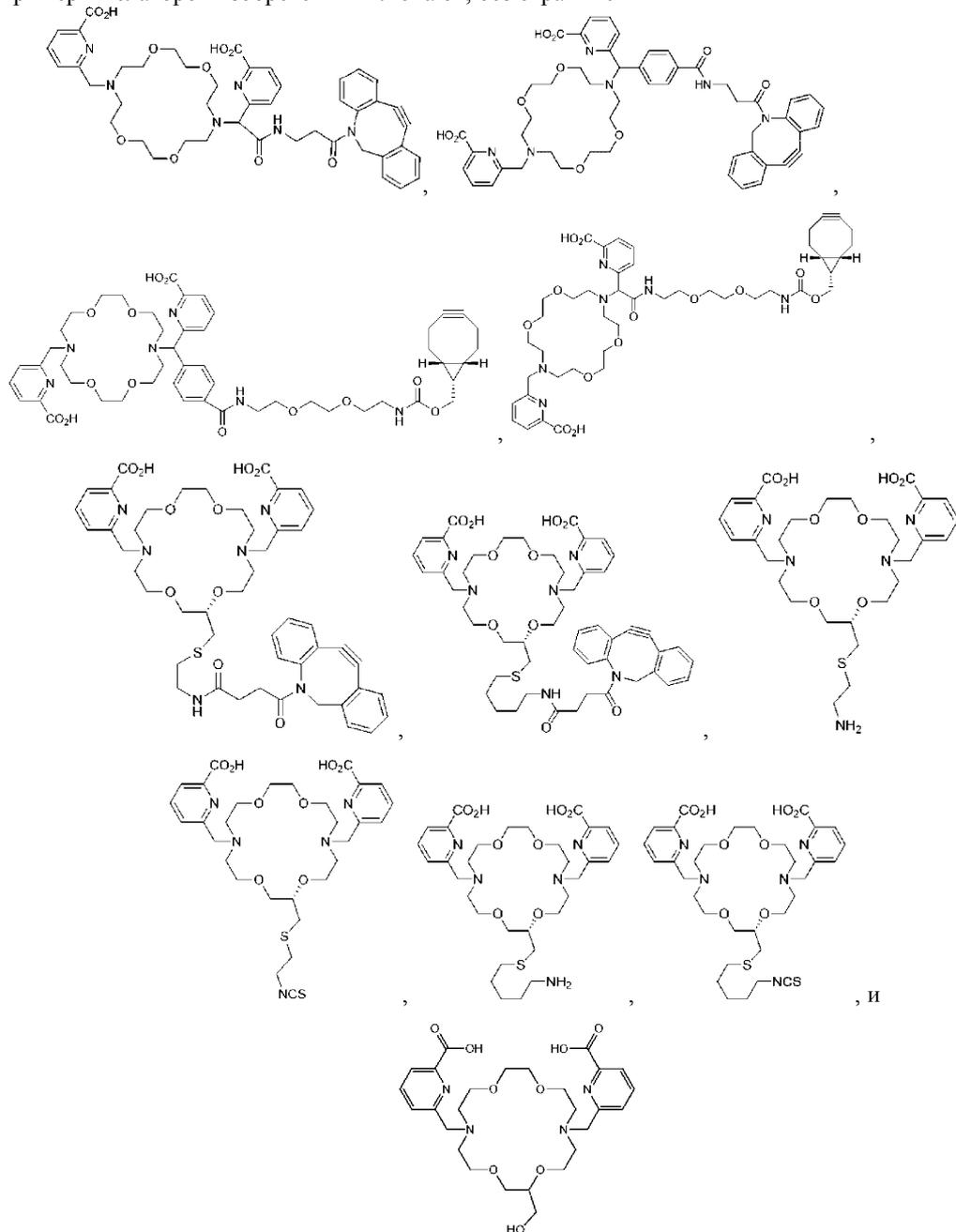
В некоторых вариантах осуществления R₁₁ представляет собой -NH₂, -NCS, -NCO, -N₃, алкинил, циклоалкинил, -C(O)R₁₃, -COOR₁₃, -CON(R₁₃)₂, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен.

В определенных вариантах осуществления R₁₁ представляет собой циклооктинил или производное циклооктинила, выбранное из группы, состоящей из бициклононила (BCN), дифтористого циклоокти-

нила (DIFO), дибензоциклооктинила (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклооктинонила (BARAC), дибензоазациклооктинила (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклооктинила (DIMAC), дифторбензоциклооктинила (DIFBO), монобензоциклооктинила (MOBO) и тетраметоксидибензоциклооктинила (TMDIBO).

Предпочтительно R₁₁ представляет собой алкинильную группу или циклоалкинильную группу, более предпочтительно циклоалкинильную группу, например DBCO или BCN.

Примеры хелаторов изобретения включают, без ограничений



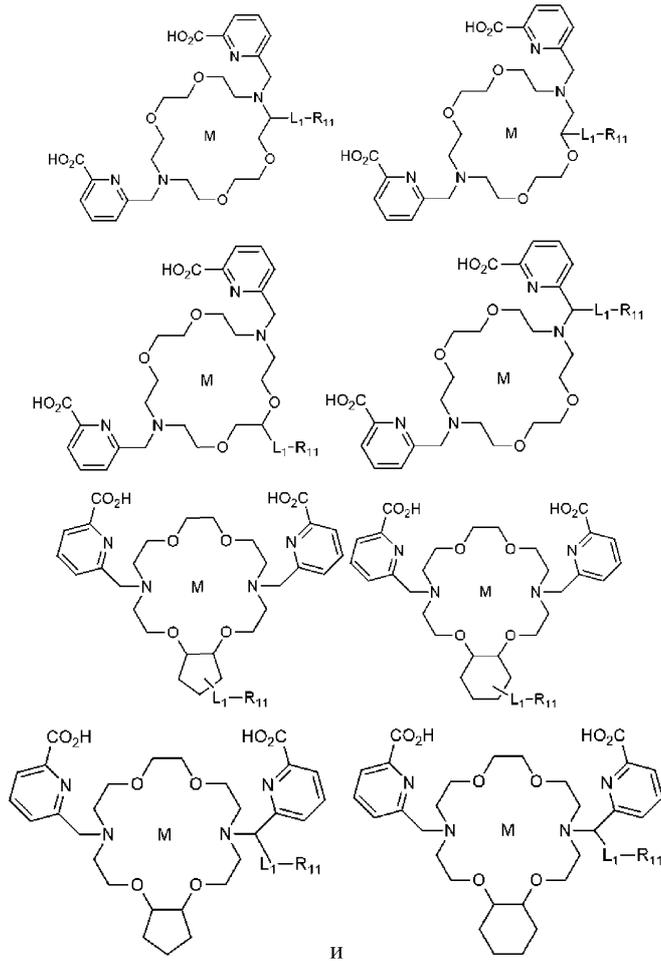
Такие хелаторы могут быть ковалентно присоединены к нацеливающему лиганду (например, анти-телу или его антигенсвязывающему фрагменту) с образованием иммуноконъюгатов или радиоактивных иммуноконъюгатов посредством взаимодействия хелатора с меченым азидом нацеливающим лигандом с образованием 1,2,3-триазольного линкера посредством клик-химической реакции, как более подробно описано ниже.

Хелаторы изобретения можно получать любым известным в данной области способом в контексте настоящего описания. Например, ароматические/гетероароматические группы боковых цепей могут быть присоединены к макроциклической кольцевой части с помощью способов, известных в данной области, таких как проиллюстрированы в примерах и описаны ниже.

Комплексы радиоактивных металлов.

В другом общем аспекте изобретение относится к комплексу радиоактивного металла, выбранному

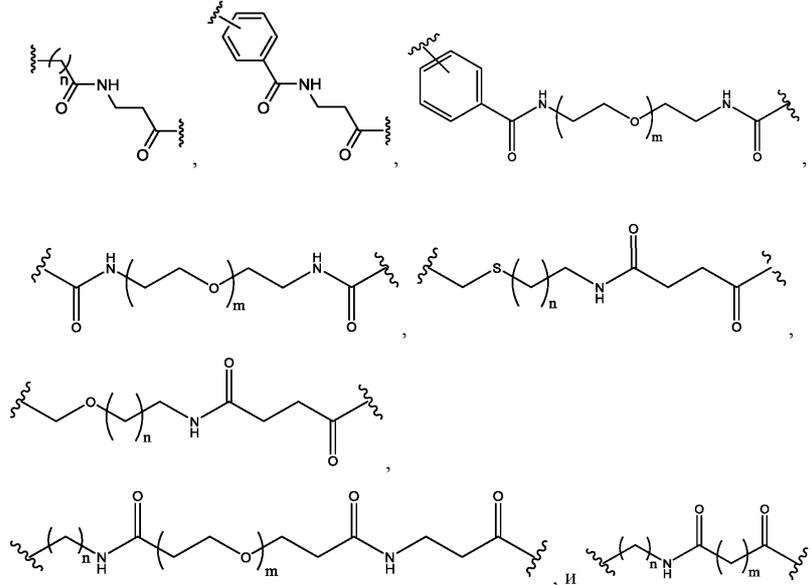
из группы, состоящей из



и

где М представляет собой актиний-225 (²²⁵Ac);

L₁ отсутствует или представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6;

R₁₁ представляет собой -NH₂, -NCS, -NCO, -N₃, алкинил, циклоалкинил, -C(O)R₁₃, -COOR₁₃, -CON(R₁₃)₂, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, или R₁₁ содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

каждый из R₁₃ независимо представляет собой водород или алкил;

где алкил представляет собой метил, этил, пропил, бутил или пентил;

циклоалкинил представляет собой циклоалкильную группу, содержащую от 8 до 10 атомов углеро-

да и содержащую по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода;

алкинил определяется как алкильная группа, имеющая от 2 до 10 атомов углерода и содержащая по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода; и

ацилгалогенид относится к фрагменту $-C(O)X$, где X представляет собой галоген.

Комплексы радиоактивных металлов можно получать любым известным в данной области способом в контексте настоящего описания. Например, хелатор настоящего изобретения можно смешивать с ионом радиоактивного металла и инкубировать смесь, чтобы обеспечить образование комплекса радиоактивного металла. В одном примере осуществления хелатор смешивают с раствором $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ с образованием радиоактивного комплекса, содержащего ^{225}Ac , связанный с хелатором посредством координационной связи. Как описано выше, хелаторы изобретения эффективно хелатируют радиоактивные металлы, в частности ^{225}Ac . Таким образом, в конкретных вариантах осуществления хелатор изобретения смешивают с раствором иона Ac в соотношении, составляющем 1 : 1000, 1 : 500, 1 : 400, 1 : 300, 1 : 200, 1 : 100, 1 : 50, 1 : 10 или 1 : 5, предпочтительно от 1 : 5 до 1 : 200, более предпочтительно от 1 : 5 до 1 : 100. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления отношение хелатора изобретения к ^{225}Ac , который можно использовать для образования комплекса радиоактивного металла, намного ниже отношения, которое может быть достигнуто с другими известными хелаторами ^{225}Ac , например, с DOTA. Радиоактивный комплекс можно охарактеризовать мгновенной тонкослойной хроматографией (например, iTLC-SG), ВЭЖХ, ЖХ-МС и т.д. Примеры способов описаны в настоящем документе, например, в примерах ниже.

Иммуноконъюгаты и радиоактивные иммуноконъюгаты.

В другом общем аспекте изобретение относится к иммуноконъюгатам и радиоактивным иммуноконъюгатам. Хелаторы и комплексы радиоактивных металлов изобретения могут быть конъюгированы (т.е. ковалентно связаны) с нацеливающими лигандами, такими как антитело, с получением иммуноконъюгатов и/или радиоактивных иммуноконъюгатов, подходящих, например, для применения в медицинских целях у субъектов, например, у людей, таких как нацеленная лучевая терапия. При использовании хелаторов и комплексов радиоактивных металлов изобретения нацеливающие лиганды, в частности антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут специфически связываться с мишенями, представляющими интерес (такими как раковые клетки), можно сайт-специфически метить ионами радиоактивных металлов с получением радиоактивных иммуноконъюгатов. В частности, при использовании хелаторов и/или комплексов радиоактивных металлов изобретения можно получать радиоактивные иммуноконъюгаты, имеющие высокий уровень хелатирования ионов радиоактивных металлов, в частности ^{225}Ac , и желаемое соотношение хелатор-антитело (CAR). В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы изобретения обеспечивают среднее CAR менее 10, менее 8, менее 6 или менее 4; или CAR от около 2 до около 8, или от около 2 до около 6, или от около 2 до около 4, или от около 2 до около 3; или CAR, составляющий около 2, или около 3, или около 4, или около 5, или около 6, или около 7, или около 8.

Используемый в настоящем документе термин "иммуноконъюгат" представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный (например, связанный посредством ковалентной связи) со второй молекулой, такой как токсин, лекарственное средство, ион радиоактивного металла, хелатор, комплекс радиоактивного металла и т.д. В частности, "радиоактивный иммуноконъюгат" представляет собой иммуноконъюгат, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент помечен радиоактивным металлом или конъюгирован с комплексом радиоактивного металла.

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

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

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

В конкретных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент в иммуноконъюгате или радиоактивном иммуноконъюгате настоящей заявки могут специфически связываться с опухолевым антигеном. Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с раковым антигеном. Примеры раковых антигенов включают, без ограничений, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), BCMA, Her2, EGFR, KLK2, CD19, CD22, CD30, CD33, CD79b и нектин-4.

В одном варианте осуществления антитело специфически связывается с PSMA. Предпочтительно антитело представляет собой PSMB127. Антитело человеческого IgG4, которое связывается с простатическим специфическим мембранным антигеном человека (PSMA), упоминаемым в данном документе как "анти-PSMA мкАт" с обозначением "PSMB127", имеет последовательность CDR1 тяжелой цепи (HC) SEQ ID NO: 3, последовательность CDR2 HC SEQ ID NO: 4, последовательность HC CDR3 SEQ ID NO:

5, последовательность CDR1 легкой цепи (LC) SEQ ID NO: 6, последовательность CDR2 LC SEQ ID NO: 7, и последовательность CDR3 LC SEQ ID NO: 8, и имеет последовательность HC SEQ ID NO: 9 и последовательность LC SEQ ID NO: 10. Анти-PSMA мкАт экспрессировали и очищали с использованием стандартных методов хроматографии. Антитело PSMB127, его биологическая активность, применение или другая связанная с ним информация описаны, например, в публикации заявки на патент США № US 20200024360 A1, содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

В другом варианте осуществления антитело специфически связывается с человеческим калликреином-2 (KLK2). Антитело предпочтительно представляет собой H11B6. Антитело H11B6, биологическая активность, применение или другая связанная с ним информация описаны в патенте США № 10100125, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Как описано в настоящем документе, полипептид антитела H11B6 содержит переменную область тяжелой цепи (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. Антитело H11B6 может дополнительно иметь переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, или иметь константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или иметь тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Коммерческие антитела трастузумаб (герцептин), цетуксимаб (эрбитукс), пертузумаб (перджета) и панитумумаб (вектибикс) были приобретены у компаний Roche, Lilly, Roche и Amgen, соответственно. Трастузумаб и пертузумаб связываются с человеческим Her2. Цетуксимаб и панитумумаб связываются с человеческим EGFR.

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

В соответствии с вариантом осуществления радиоактивный иммуноконъюгат может быть получен путем ковалентного связывания комплекса радиоактивного металла изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, посредством клик-химической реакции (см., например, фиг. 2B и 2D, упоминаемое как "радиоактивное мечение с помощью клик-реакции"). В альтернативном варианте осуществления радиоактивный иммуноконъюгат может быть получен сначала путем получения иммуноконъюгата изобретения путем ковалентного связывания хелатора изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, например, посредством клик-химической реакции; иммуноконъюгат можно впоследствии метить ионом радиоактивного металла с получением радиоактивного иммуноконъюгата (см., например, фиг. 2A и 2C, упоминаемое как "одностадийное прямое радиоактивное мечение"). Как специфичный для остатка (например, фиг. 2A и 2B), так и сайт-специфический способ (например, фиг. 2C и 2D) конъюгации можно использовать для получения иммуноконъюгата и радиоактивных иммуноконъюгатов изобретения.

Специфичные для остатков способы конъюгации с белками хорошо известны и чаще всего включают в себя либо лизиновые боковые цепи с использованием активированного эфира, либо изотиоцианата, либо цистеиновые боковые цепи с малеимидом, галогенацетильным производным или активированным дисульфидом (Brinkley Bioconjugate Chem. 1992:2). Поскольку большинство белков имеют множество лизиновых и цистеиновых остатков, с помощью таких способов, как правило, получают гетерогенные смеси продуктов с различным числом конъюгированных молекул во множестве аминокислотных положений. Были установлены дополнительные способы, включая тирозинспецифическую конъюгацию (Van et al. Bioconjugate Chemistry 2013:520), методолин-специфические способы (Lin et al. Science 2017 (355) 597), дополнительные сфокусированные цистеином подходы (Toda et al. Angew Chemie 2013:12592) и другие.

В последнее время для моноклональных антител и других белков были установлены сайт-селективные и сайт-специфические способы конъюгации (Agarwal, P. and C.R. Bertozzi, Bioconjug Chem,

2015. 26(2): p. 176-92; Rabuka et al. *Curr Opin Chem Biol* 2010:790). К ним относятся включение ненатуральных аминокислот; слияние белка, представляющего интерес, с "самомаркировочной меткой", такой как SNAP или DHFR, или меткой, которая распознается и модифицируется специфически другим ферментом, таким как сортаза А, лигаза липоевой кислоты и формилглицин-образующего фермента; ферментативная модификация гликана для обеспечения конъюгации нагрузок, представляющих интерес (Hu et al. *Chem Soc Rev* 2016:1691); применение микробной трансглутаминазы для селективного распознавания определенных положений на антителе; и дополнительные способы с использованием молекулярного распознавания и/или химических подходов для воздействия на селективную конъюгацию (Yamada et al. 2019:5592; Park et al. *Bioconjugate Chem* 2018:3240; Pham et al. *Chembiochem* 2018:799).

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат или радиоактивный иммуноконъюгат изобретения получают с использованием специфичных для остатка способов конъюгации хелатора изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Такие специфичные для остатка способы, как правило, приводят к получению иммуноконъюгата или радиоактивного иммуноконъюгата, ковалентно связанного с хелатором или радиоактивным комплексом в различных положениях антитела. Можно использовать любой специфичный для остатка способ образования конъюгатов белка или антитела, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Примеры специфичных для остатка способов конъюгации, которые можно использовать, включают в себя, без ограничений, конъюгацию хелатора или комплекса радиоактивного металла с лизиновыми остатками антитела с использованием хелатора или комплекса радиоактивного металла, содержащего, например, активированный эфир или изотиоцианатную группу; конъюгацию с цистеиновыми остатками антитела с использованием хелатора или комплекса радиоактивного металла, содержащего, например, малеимид, галогенацетильное производное, ацилгалогенид, группу активированного дисульфида или метилсульфонил фенилоксадиазольную группу; конъюгацию с остальными остатками тирозина антитела с помощью хелатора или комплекса радиоактивного металла, содержащего, например, 4-фенил-3Н-1,2,4-триазаолин-3,5(4Н)-дионы (PTADs); и конъюгацию с метиониновыми остатками антитела с использованием хелатора или комплекса радиоактивного металла, содержащего, например, производное оксазиридина. Кроме того, перед конъюгацией с хелатором или комплексом радиоактивного металла изобретения можно метить антителом в конкретном остатке биортогональной реакционно-способной функциональной группы с использованием одного или более из описанных выше способов. Например, остатки тирозина могут быть сайт-специфически мечены биортогональной реакционно-способной функциональной группой с использованием производного оксазиридина, связанного с биортогональной реакционно-способной функциональной группой, например азидо, алкинилом или циклоалкинилом, а затем антитело, содержащее меченые остатки тирозина, может быть конъюгировано с хелатором или радиоактивным комплексом изобретения с использованием хелатора или комплекса радиоактивного металла, несущего совместимую реакционно-способную функциональную группу.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат или радиоактивный иммуноконъюгат изобретения получают с использованием сайт-специфичных или сайт-селективных способов конъюгации хелатора изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В отличие от специфичных для остатка способов "сайт-специфические" или "сайт-селективные" способы, как правило, приводят к получению иммуноконъюгата или радиоактивного иммуноконъюгата, ковалентно связанного с хелатором или комплексом радиоактивного металла в указанном положении антитела. Можно использовать любой сайт-специфический способ формирования конъюгатов белка или антитела, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания. Например, неприродная аминокислота (например, азидо- или алкинил-аминокислота) может быть сайт-специфически включена в антитело с использованием мутантной аминоксил-1-РНК-синтетазы, которая может селективно аминоксиллировать свою тРНК неприродной аминокислотой, представляющей интерес. Затем мутантную ацилированную тРНК вместе с амбер-супрессорной тРНК можно использовать для сайт-специфического включения ненатуральной аминокислоты в белок в ответ на янтарный бессмысленный кодон. Антитело, которое сайт-специфически мечено одним или более из описанных выше способов, может быть впоследствии конъюгировано с хелатором или радиоактивным комплексом по изобретению, несущим совместимую реакционно-способную функциональную группу.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения способ получения радиоактивного иммуноконъюгата включает в себя взаимодействие хелатора или радиоактивного комплекса изобретения, причем R₁₁ представляет собой нуклеофильный или электрофильный фрагмент, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим нуклеофильный или электрофильный фрагмент.

В одном варианте осуществления способ включает приведение хелатора изобретения в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим нуклеофильную или электрофильную функциональную группу, с образованием иммуноконъюгата, имеющего ковалентную связь между хелатором и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а взаимодействие иммуноконъюгата с ионом радиоактивного металла происходит

таким образом, чтобы ион радиоактивного металла связывался с хелатором иммуноконъюгата посредством координационного связывания, формируя таким образом радиоактивный иммуноконъюгат. Этот вариант осуществления может называться способом "одностадийного прямого радиоактивного мечения" (например, как схематически показано на фиг. 2C), поскольку существует только одна стадия химической реакции с участием радиоактивного металла.

В другом варианте осуществления способ включает приведение в контакт радиоактивного комплекса изобретения с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим нуклеофильную или электрофильную функциональную группу, с формированием таким образом радиоактивного иммуноконъюгата. Этот вариант осуществления может называться способом "радиоактивного мечения с помощью клик-реакции" (например, как схематически показано на фиг. 2D). Модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить любым способом, известным в данной области техники с учетом настоящего описания, например, путем мечения антитела по конкретному остатку биортогональной реакционноспособной функциональной группой с использованием одного или более из описанных выше способов, или путем сайт-специфического включения ненатуральной аминокислоты (например, азидо- или алкинил-аминокислоты) в антитело с использованием одного или более из описанных выше способов. Степень мечения (DOL), иногда называемая степенью замещения (DOS), является особенно полезным параметром для описания и оптимизации биоконъюгатов, таких как антитело, модифицированное ненатуральной аминокислотой. Она выражается в виде среднего количества ненатуральной аминокислоты, связанной с молекулой белка (например, антителом), или в виде молярного соотношения в форме метки/белка. DOL может быть определена из спектра поглощения меченого антитела любым способом, известных в данной области.

В определенных вариантах осуществления, как описано в настоящем документе, иммуноконъюгаты и радиоактивные иммуноконъюгаты настоящего изобретения получают с использованием клик-химической реакции. Например, радиоактивные иммуноконъюгаты изобретения могут быть получены с использованием клик-химической реакции, называемой "радиоактивное мечение с помощью клик-реакции" (см., например, фиг. 2B и 2D). При радиоактивном мечении с помощью клик-реакции используют партнеров по клик-реакции, предпочтительно азид и алкин (например, циклооктин или производное циклооктина) с образованием ковалентной триазольной связи между радиоактивным комплексом (ионом радиоактивного металла, связанным с хелатором) и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Способы радиоактивного мечения антител с помощью клик-реакции описаны, например, в международной заявке на патент № PCT/US18/65913, озаглавленной "Радиоактивное мечение полипептидов" (Radiolabeling of Polypeptides), описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В других вариантах осуществления, называемых "одностадийным прямым радиоактивным мечением", иммуноконъюгат получают с использованием клик-химической реакции между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и хелатором; Иммуноконъюгат затем приводят в контакт с ионом радиоактивного металла с образованием радиоактивного иммуноконъюгата (см., например, фиг. 2A и 2C).

В соответствии с вариантом осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата включает связывание иона радиоактивного металла с хелатором изобретения (например, посредством координационной связи).

Вариант осуществления способа "одностадийного прямого радиоактивного мечения" можно описать как способ получения радиоактивного иммуноконъюгата, включающий приведение иммуноконъюгата (т.е. комплекса полипептида с хелатором) в контакт с ионом радиоактивного металла с образованием таким образом радиоактивного иммуноконъюгата, причем иммуноконъюгат содержит хелатор настоящего изобретения. В соответствии с конкретными вариантами осуществления иммуноконъюгат был образован посредством клик-химической реакции между хелатором настоящего изобретения и полипептидом. В соответствии с конкретными вариантами осуществления радиоактивный иммуноконъюгат получали без условий отсутствия металлов (например, без какой-либо(их) стадии(стадий) удаления или активного исключения из реакционной смеси обычных примесей металлов). Это противоречит некоторым традиционным способам, в которых необходимо радиоактивно метить антитело в строгих условиях отсутствия металлов во избежание конкурентного (непродуктивного) хелатирования распространенных металлов, таких как железо, цинк и медь, что создает значительные трудности в процессе производства.

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

(i) обеспечение модифицированного полипептида, содержащего полипептид (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), ковалентно связанный с первым партнером по клик-реакции (например, азидной группой);

(ii) обеспечение хелатирующего комплекса, содержащего хелатор изобретения, ковалентно связанный со вторым партнером по клик-реакции (например, алкинильной или циклоалкинильной группой);

(iii) приведение модифицированного полипептида в контакт с хелатирующим комплексом в условиях, позволяющих первому партнеру по клик-реакции (например, азидной группе) реагировать со вторым партнером по клик-реакции (например, алкинильной или циклоалкинильной группой) с образовани-

ем таким образом полипептид-хелатного комплекса (т.е. иммуноконъюгата); и

(iv) приведение полипептид-хелатного комплекса в контакт с ионом радиоактивного металла с получением таким образом радиоактивного иммуноконъюгата (причем радиоактивный иммуноконъюгат содержит полипептид, меченный ионом радиоактивного металла, например, модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, меченые ионом альфа-излучающего радиоактивного металла, связанным с хелатором посредством координационного связывания).

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

В альтернативном варианте осуществления способ получения радиоактивного иммуноконъюгата включает способ "радиоактивного мечения с помощью клик-реакции" (например, как проиллюстрировано на фиг. 2D), включающий:

(i) обеспечение модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной группой;

(ii) обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион альфа-излучающего радиоактивного металла, связанного с хелатором посредством координационной связи, причем хелатор ковалентно связан с алкинильной или циклоалкинильной группой; и

(iii) приведение в контакт модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих азидной группе реагировать с алкинильной или циклоалкинильной группой с получением таким образом радиоактивного иммуноконъюгата.

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

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

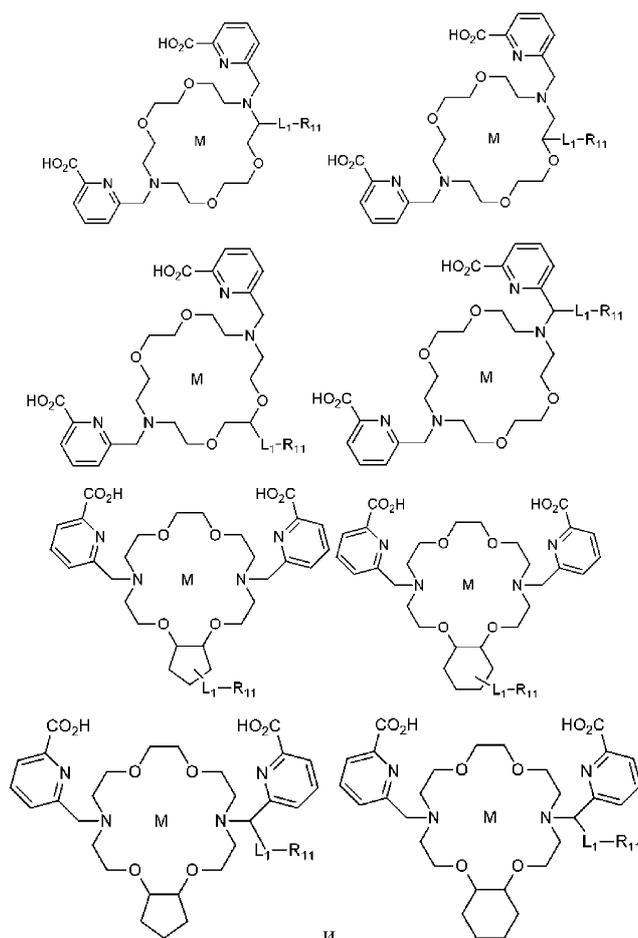
Хелаторы и комплексы радиоактивных металлов изобретения также можно использовать при получении сайт-специфических радиоактивно меченных полипептидов, например антител. Способы радиоактивного мечения, описанные в настоящем документе, облегчают сайт-специфическое получение радиоактивных иммуноконъюгатов,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

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

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

Для получения радиоактивного иммуноконъюгата изобретения можно использовать любой описанный в настоящем документе комплекс радиоактивного металла.

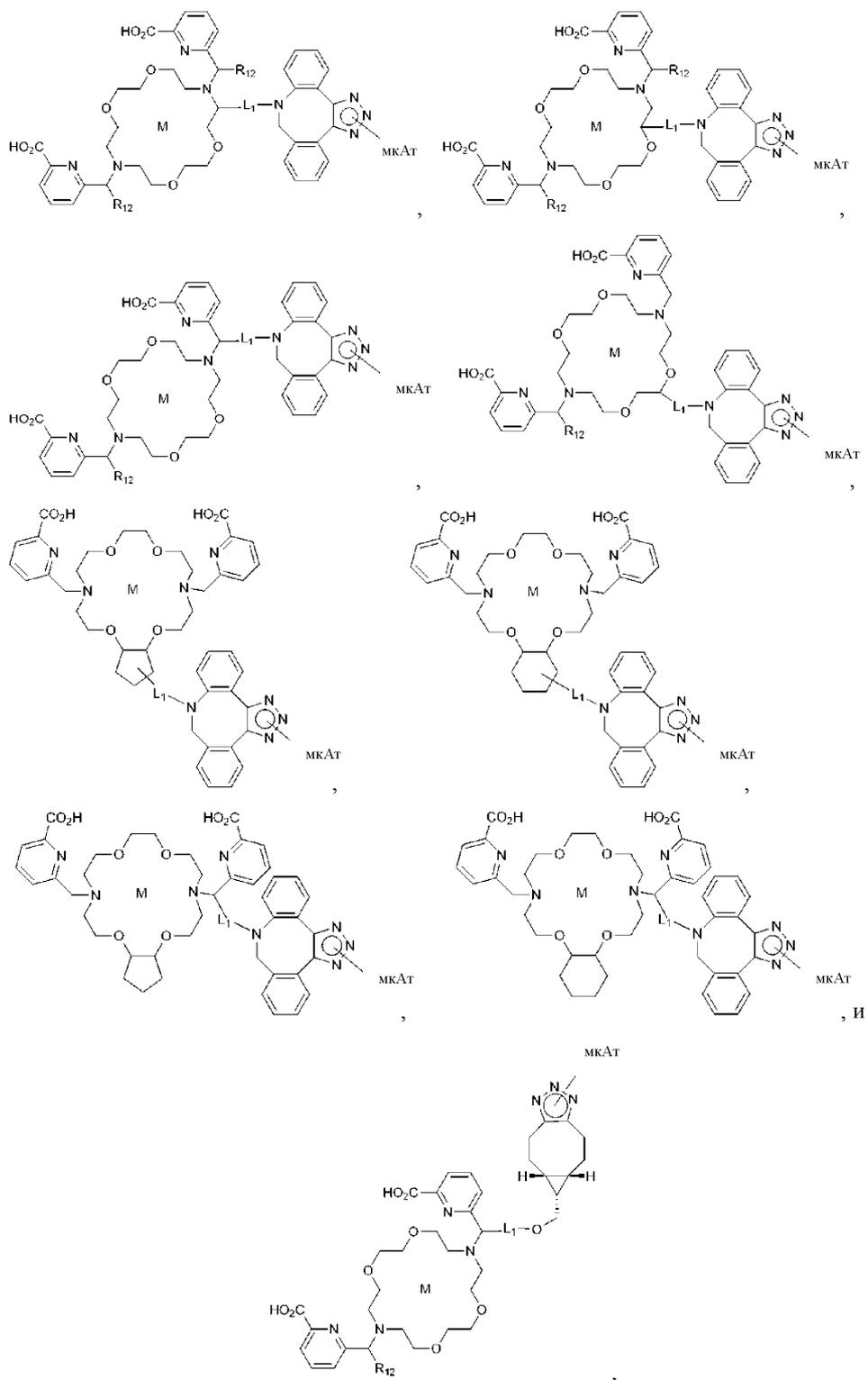
В предпочтительных вариантах осуществления комплекс радиоактивного металла имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из



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

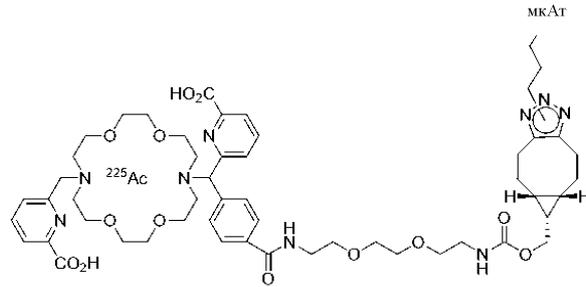
В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с азидной группой с помощью любого способа химической или ферментативной модификации антител и полипептидов, известного специалистам в данной области техники с учетом настоящего описания. Меченное азидом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

В конкретных вариантах осуществления радиоактивные иммуноконъюгаты заявки включают, без ограничений



где M представляет собой актиний-225 (^{225}Ac);

L_1 представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



мкАт предпочтительно выбирают из PSMB127, пертузумаба, цетуксимаба, панитумумаба, герцептина или H11B6.

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

Фармацевтические композиции и способы применения.

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

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

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

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

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в данном документе, составлены с обеспечением их приемлемости для предполагаемого способа введения пациенту. Например, композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы они подходили для парентерального введения, например, внутривенного, подкожного, внутримышечного или внутриопухолевого введения.

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

"Новообразование" представляет собой аномальную массу ткани, которая приводит к чрезмерному делению клеток или отсутствию их естественного отмирания. Новообразования могут быть доброкачественными (не являются раком) или злокачественными (являются раком). Новообразование также называют опухолью. Неопластическое заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, связанное с новообразованием, такое как рак. Примеры неопластического заболевания или расстройства включают, без ограничений, диссеминированные злокачественные новообразования и солидные злокачественные опухоли.

В соответствии с вариантом осуществления способ лечения рака предстательной железы (например, метастатического рака предстательной железы или метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы) у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту терапевтически

эффективного количества радиоактивного иммуноконъюгата, описанного в настоящем документе, причем радиоактивный иммуноконъюгат содержит комплекс радиоактивного металла, как описано в настоящем документе, конъюгированный с Н1В6.

Другие примеры заболеваний, подлежащих лечению или предназначенных для лучевой терапии методами, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, гипертрофию, ишемическую болезнь сердца или сосудистую окклюзию, заболевание или расстройство, связанное с инфицированной клеткой, микроорганизмом или вирусом, или заболевание или расстройство, связанное с воспалительной клеткой, такое как ревматоидный артрит (РА).

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

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

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

Радиоактивные иммуноконъюгаты переносят излучение непосредственно, например, в клетки и т.д., подлежащие воздействию нацеливающего лиганда. Предпочтительно радиоактивные иммуноконъюгаты несут ионы альфа-излучающих радиоактивных металлов, такие как ^{225}Ac . При нацеливании альфа-частицы ионов альфа-излучающих радиоактивных металлов, например Ac и его дочерних частей, доставляются к целевым клеткам и вызывают цитотоксический эффект; таким образом они селективно воздействуют на неопластические клетки для лучевой терапии и/или лечения неопластического заболевания или расстройства.

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

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

Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к некоторому количеству активного ингредиента или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели. Например, для определения диапазона оптимальной дозы могут необязательно быть использованы анализы *in vitro*.

Подбор конкретной эффективной дозы может выполнить (например, путем клинических исследований) специалист в данной области с учетом нескольких факторов, включая подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы, массу тела пациента, состояние иммунной системы пациента и другие факторы, известные специалисту в данной области. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также зависит от способа введения и степени тяжести заболевания и должна быть определена на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно рассчитывать на кривых дозовой зависимости, полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделях.

В контексте данного документа термины "лечить", "лечащий" и "лечение" предназначены для обозначения улучшения или изменения по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, при котором было бы полезно введение иона радиоактивного металла, таким как неопластическое заболевание или расстройство, которые не обязательно явно выражены у субъекта, но могут быть явно выраженными у субъекта. Термины "лечить", "лечащий" и "лечение" могут также обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к облегчению, предотвращению развития или проявления, или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, при котором бы-

ло бы полезно введение иона радиоактивного металла, таким как неопластическое заболевание или расстройство. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к профилактике рецидива неопластического заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к повышению выживаемости пациента, имеющего неопластическое заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к устранению неопластического заболевания, расстройства или состояния у пациента.

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

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

Также для применения в селективном нацеливании на неопластические клетки для лучевой терапии и/или лечения неопластического заболевания или расстройства, предложены радиоактивные иммуноконъюгаты и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе; и применение радиоактивного иммуноконъюгата или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, в производстве лекарственного средства для селективного нацеливания на неопластические клетки для лучевой терапии и/или лечения неопластического заболевания или расстройства.

Примеры

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

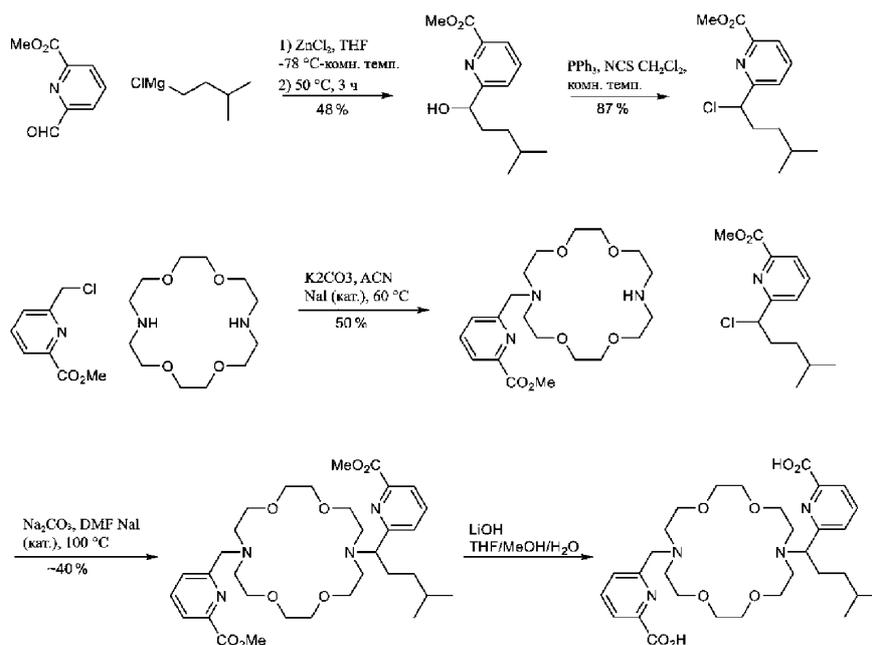
Пример 1. Эффективность синтеза и хелатирования макроциклических хелаторов, имеющих различные положения замещения линкеров.

Для изучения влияния положения линкера на эффективность хелатирования актиния-225 (^{225}Ac) синтезировали два хелатирующих агента на основе макроциклического хелатора N,N'-бис[(6-карбокси-2-пиридила) метил]-4,13-диазаа-18-краун-6 (H₂bp18c6). В частности, синтезировали H₂bp18c6-бензилизопентил и H₂bp18c6-бензилфенил



Синтез и характеристика H₂bp18c6-бензилизопентила H₂bp18c6-бензилизопентил синтезировали по схеме 1.

Схема 1. Синтез H₂bp18c6-бензилизопентила



К раствору $ZnCl_2$ (1,9M в 2-метилтетрагидрофуране, 3,50 мл, 6,65 ммоль) и THF (25 мл) при $-78^\circ C$ по каплям добавляли хлорид изопентилмагния (2M в Et_2O , 3,33 мл, 6,66 ммоль). Смесь молочного цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего охлаждали до $0^\circ C$. Добавляли раствор метил-6-формилпиколината (1,00 г, 6,1 ммоль) в THF (10 мл). Смесь нагревали при $50^\circ C$ в течение 3 ч. Охлажденную реакционную смесь вылили в насыщенный водный раствор NH_4Cl и трижды экстрагировали $EtOAc$. Комбинированные экстракты высушивали над Na_2SO_4 . С помощью фильтрации и концентрирования фильтрата получили неочищенный продукт в виде коричневого масла. В результате хроматографии на силикагеле (от гептана до 50% $EtOAc$ в гептане) получили 693 мг (выход 48%) продукта в виде желтого масла.

К раствору метил-6-(1-гидрокси-4-метилпентил)пиколината (91 мг, 0,38 ммоль) в CH_2Cl_2 (3 мл) при комнатной температуре добавили PPh_3 (120 мг, 0,46 ммоль) и NBS (56 мг, 0,42 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего концентрировали. В результате хроматографии на силикагеле (от гептана до 30% $EtOAc$ в гептане) получили 85 мг (выход 87%) продукта в виде бесцветного масла.

К перемешиваемой смеси 1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизаацциклооктадекана (315 мг, 1,2 ммоль) и K_2CO_3 (691 мг, 5 ммоль) в ACN (30 мл) при $60^\circ C$ медленно добавляли раствор метил-6-(хлорметил)пиколината в ACN (5 мл) за один час с помощью шприцевого насоса. После добавления реакционную смесь перемешивали при $60^\circ C$ в течение 6 ч, после чего фильтровали. Фильтрат сконцентрировали и остаток очистили с использованием хроматографии на силикагеле (от CH_2Cl_2 до 10% MeOH в CH_2Cl_2), получили 206 мг (выход 50%) продукта в виде желтоватой пены.

К смеси метил-6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизаацциклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (31 мг, 0,075 ммоль), Na_2CO_3 (40 мг, 0,38 ммоль) и NaI (1,5 мг) в DMF (0,5 мл) добавляли метил-6-(1-хлор-4-метилпентил)пиколинат (29 мг, 0,11 ммоль). Реакционную смесь нагревали до температуры $100^\circ C$ в течение 20 ч. В результате хроматографии на силикагеле (от $EtOAc$ до 10% MeOH в CH_2Cl_2) получили 18,9 мг (выход 40%) продукта в виде желтой пленки, прилипшей к стенке колбы.

Раствор метил-6-((16-(1-(6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)-4-метилпентил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизаацциклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (3 мг, 0,005 ммоль) в THF/MeOH/ H_2O (4:1:1 об./об./об., 0,6 мл) обрабатывали LiOH (1Н, 0,1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего концентрировали досуха. Остаток растворяли в 0,95 мл воды, не содержащей металла, и нейтрализовали 0,05 мл 2N HCl с получением раствора H2bp18с6-бензилизопентила в воде (~ 3 мг/мл ≈ 5 mM, pH ~ 6).

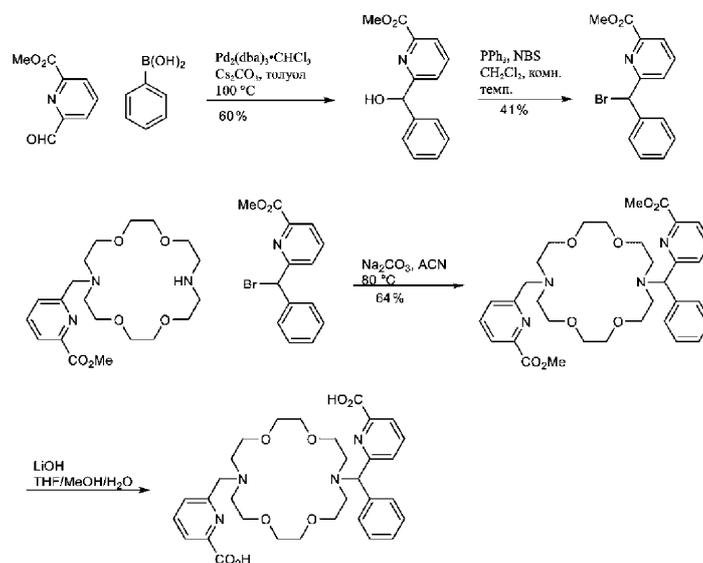
H2bp18с6-бензилизопентил (молекулярная масса=602 Да) характеризовали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС). Анализ методом ВЭЖХ показал основной пик при времени элюирования на 17,181 мин, соответствующий свободному хелатору. Анализ методом ЖХ-МС показал массовые пики ионов (ES, m/z) при 603 [$M+H^+$], 625 [$M+Na^+$] и 302 [$M+2H^+$], что подтверждает синтез H2bp18с6-бензилизопентила.

Метод ВЭЖХ: колонка XBridge C18 3,5 мкм 150×4,6 мм, 100 Å; подвижная фаза А: 0,1% TFA в H_2O , В: 0,1% TFA в ACN; градиент от 10% до 30% В за 0-20 мин, градиент от 30% до 100% В за 20-20,1 мин, изократический режим при 100% В за 20,1-25 мин, градиент от 100% до 10% В за 25-25,1 мин, изо-

кратический режим при 10% В за 25,1-30 мин; через 3 мин после воздействия; скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 30°C; объем инъекции 5 мкл.

Синтез и характеристика H2bp18с6-бензилфенила H2bp18с6-бензилфенил синтезировали по схеме 2.

Схема 2. Синтез H2bp18с6-бензилфенила



Смесь метил-6-формилпиколината (165 мг, 1,0 ммоль), фенилбороновой кислоты (244 мг, 2,0 ммоль), Cs_2CO_3 (326 мг, 1,0 ммоль), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (52 мг, 0,05 ммоль) и PPh_3 (26 мг, 0,1 ммоль) помещали в герметичный сосуд под N_2 . Добавляли толуол (3 мл) через шприц и нагревали смесь при 100°C в микроволновой печи в течение 4 ч. После фильтрации охлажденной реакционной смеси через целит фильтрат концентрировали. В результате хроматографии на силикагеле (от гептана до 50% EtOAc в гептане) получили 146 мг (выход 60%) продукта в виде желтого масла.

Раствор метил-6-(гидрокси(фенил)метил)пиколината (141 мг, 0,58 ммоль), PPh_3 (183 мг, 0,70 ммоль) и NBS (113 мг, 0,64 ммоль) в CH_2Cl_2 (8 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли дополнительное количество PPh_3 (133 мг, 0,70 ммоль) и NBS (113 мг, 0,64 ммоль) и раствор дополнительно перемешивали в течение одного часа при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (от гептана до 30% EtOAc в гептане), получали 73 мг (выход 41%) продукта в виде бесцветного масла.

Смесь метил-6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (33 мг, 0,080 ммоль), метил-6-(бром(фенил)метил)пиколината (37 мг, 0,12 ммоль) и Na_2CO_3 (42 мг, 0,40 ммоль) в ACN (1,0 мл) нагревали при 80°C в течение 3 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. В результате хроматографии на силикагеле (от EtOAc до 10% MeOH в CH_2Cl_2) получили 51 мг (выход 64%) продукта в виде белого твердого вещества.

Раствор метил-6-((16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)(фенил)метилпентил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (16 мг, 0,025 ммоль) в THF/MeOH/ H_2O (4:1:1 об./об./об., 1,2 мл) обрабатывали LiOH (1N, 0,2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего концентрировали досуха. Остаток растворяли в 5,2 мл воды, не содержащей металла, и нейтрализовали 0,10 мл 2N HCl с получением раствора H2bp18с6-бензилфенила в воде (~ 3 мг/мл ≈ 5 мМ, pH ~ 6).

H2bp18с6-бензилфенил (молекулярная масса=608 Да) характеризовали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС). Анализ методом ВЭЖХ проводили, как описано выше для изопентана-H2bp18с6. Анализ методом ВЭЖХ показал основной пик при времени элюирования на 14,137 мин, соответствующий свободному хелатору. Анализ методом ЖХ-МС показал массовые пики ионов (ES, m/z) при 609 [$\text{M}+\text{H}^+$], 631 [$\text{M}+\text{Na}^+$] и 305 [$\text{M}+2\text{H}^+$], что подтверждает синтез H2bp18с6-бензилфенила.

Испытание на хелатирование с лантаном (III).

Водный раствор H2bp18с6-бензилизопентила в воде (~ 3 мг/мл ≈ 5 мМ, 20 мкл, 0,1 мкмоль) обрабатывали $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ (10 мМ в воде, не содержащей металлов, 50 мкл, 0,5 мкмоль). Водный раствор H2bp18с6-бензилфенила в воде (~ 3 мг/мл ≈ 5 мМ (~ 3 мг/мл ≈ 5 мМ, 20 мкл, 0,1 мкмоль) обрабатывали $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ (10 мМ в воде, не содержащей металлов, 50 мкл, 0,5 мкмоль). После тщательного перемешивания каждый раствор анализировали методом ЖХМС и ВЭЖХ для определения того, образованы ли комплексы хелатора и La^{3+} .

Как изопентан-H2bp18с6, так и H2bp18с6-бензилфенильные хелаторы показали быстрое и стехиометрическое хелатирование La^{3+} при комнатной температуре, что было продемонстрировано существенным сдвигом времени удерживания пика ВЭЖХ, проанализированного в соответствии со способом, опи-

санным выше для синтеза H₂bp18c6 (фиг. 1А и 1В). Образование комплекса также подтверждено ЖХ-МС. Анализ методом ЖХ-МС изопентана-H₂bp18c6 после смешивания с La(NO₃)₃ показал массовый пик ионов (ES, m/z) при 739 (H₂bp18c6-бензилозопентил+La⁺³-2H⁺); и анализ методом ЖХ-МС H₂bp18c6-бензилфенила после смешивания с La(NO₃)₃ показал массовый пик ионов (ES, m/z) при 745 (H₂bp18c6-бензилфенил+La⁺³-2H⁺), что подтверждает образование комплекса с обоими хелаторами.

Хелатирование H₂bp18c6-бензилозопентила с помощью ²²⁵Ac(III).

(i) Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III) при низком соотношении ²²⁵Ac/хелатор.

В пластиковый флакон последовательно добавляли ацетат тетраметиламмония (1М в воде, 10 мкл), H₂bp18c6-бензилозопентил (1,66 мМ в воде, 2 мкл, ~ 3,32 нмоль) и ²²⁵Ac(NO₃)₃ (10 мКи/мл в 0,1Н. HCl, 3 мкл, 30 мКи). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1,5 ч.

Анализ iTLC-SG: 0,5 мкл реакционного раствора наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, связанный Ac-225 остается на базовой линии iTLC-SG, тогда как свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. Радиоактивность во фронте растворителя iTLC-SG не наблюдали, что указывает на успешное хелатирование ионов ²²⁵Ac хелатором.

Анализ ВЭЖХ: 5 мкл реакционной смеси разбавляли 95 мкл буфера PBS. Разбавленную смесь анализировали методом ВЭЖХ. После ВЭЖХ фракции собирали с интервалами в одну минуту. Собранные фракции оставляли на ночь при комнатной температуре, затем подсчитывали с помощью гамма-счетчика. Радиоактивную ВЭЖХ построили на основе активностей фракций.

Анализ ВЭЖХ подтвердил, что комплекс ²²⁵Ac был образован на основе сдвига времени удерживания, аналогичного показанному на хроматограммах ВЭЖХ на фиг. 1 А. Провокация ДТРА: 0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА и инкубировали смесь в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, стабильно хелатируемый Ac-225 остается на базовой линии iTLC-SG, тогда как свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. Радиоактивность во фронте растворителя iTLC-SG после стимуляции ДТРА не наблюдалась, что указывает на образование стабильного комплекса с ионом ²²⁵Ac.

(ii) Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III) при высоком соотношении ²²⁵Ac/хелатор В пластиковый флакон последовательно добавляли ацетат тетраметиламмония (1М в воде, 10 мкл), H₂bp18c6-бензилозопентил (0,33 мМ в воде, 2 мкл, ~ 0,66 нмоль) и ²²⁵Ac(NO₃)₃ (10 мКи/мл в 0,1Н. HCl, 5 мкл, 50 мКи). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Затем реакционную смесь анализировали с помощью iTLC-SG и добавления ДТРА, как описано выше. Свободный ²²⁵Ac не обнаруживали до или после стимуляции ДТРА, что указывает на образование стабильного комплекса с ионом ²²⁵Ac.

Хелатирование H₂bp18c6-бензилфенила с помощью ²²⁵Ac(III) (i) Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III) при низком соотношении ²²⁵Ac/хелатор В пластиковый флакон последовательно добавляли ацетат тетраметиламмония (1М раствор в воде, 10 мкл), H₂bp18c6-бензилфенил (1,64 мМ в воде, 2 мкл, ~ 3,28 нмоль) и ²²⁵Ac(NO₃)₃ (10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 3 мкл, 30 мКи). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2 ч. Свободный ион Ac не обнаружен, что указывает на успешное хелатирование ионов ²²⁵Ac хелатором.

Анализ iTLC-SG: 0,5 мкл реакционного раствора наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, связанный Ac-225 остается на базовой линии iTLC-SG, тогда как свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. Радиоактивность во фронте растворителя iTLC-SG не наблюдали, что указывает на успешное хелатирование Ac-225.

Анализ ВЭЖХ: 5 мкл реакционной смеси разбавляли 95 мкл буфера PBS. Разбавленную смесь анализировали методом ВЭЖХ. После ВЭЖХ фракции собирали с интервалами в одну минуту. Собранные фракции оставляли на ночь при комнатной температуре, затем подсчитывали с помощью гамма-счетчика. Радиоактивный след ВЭЖХ построили на основе активностей фракций. Анализ ВЭЖХ подтвердил, что комплекс ²²⁵Ac был образован на основе сдвига времени удерживания, аналогичного показанному на хроматограммах ВЭЖХ на фиг. 1В.

Провокация ДТРА: 0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА и инкубировали смесь в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, стабильно хелатируемый Ac-225 остается на базовой линии iTLC-SG, тогда как свободный

As-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. Свободный ^{225}As не обнаруживали после добавления ДТРА, что указывает на образование стабильного комплекса с ионом ^{225}As . Радиоактивность во фронте растворителя iTLC-SG до или после добавления ДТРА не наблюдалась, что указывает на образование стабильного комплекса с ионом ^{225}As .

(ii) Хелатирование с помощью $^{225}\text{As(III)}$ при высоком соотношении ^{225}As /хелатор.

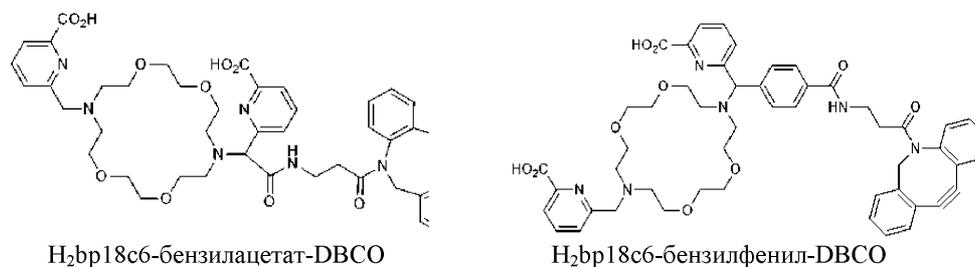
В пластиковый флакон последовательно добавляли ацетат тетраметиламмония (1М раствор в воде, 10 мкл), H2bp18с6-бензилфенил (0,16 мМ в воде, 2 мкл, ~ 0,33 нмоль) и $^{225}\text{As(NO}_3)_3$ (10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 5 мкл, 50 мКи). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь анализировали с помощью iTLC-SG и добавления ДТРА, как описано выше. Свободный ^{225}As не обнаруживали до или после стимуляции ДТРА, что указывает на образование стабильного комплекса с ионом ^{225}As .

Изложение сущности изобретения.

В совокупности вышеуказанные результаты показывают, что H2bp18с6, дериватизированный по углероду "бензила", эффективно хелатирует ^{225}As при комнатной температуре с высокой кинетикой хелатирования, образуя стабильный комплекс. Результаты также указывают на то, что высокая специфическая активность (т.е. меньшее отношение хелатора к ^{225}As) может быть достигнута путем связывания через положение "бензила".

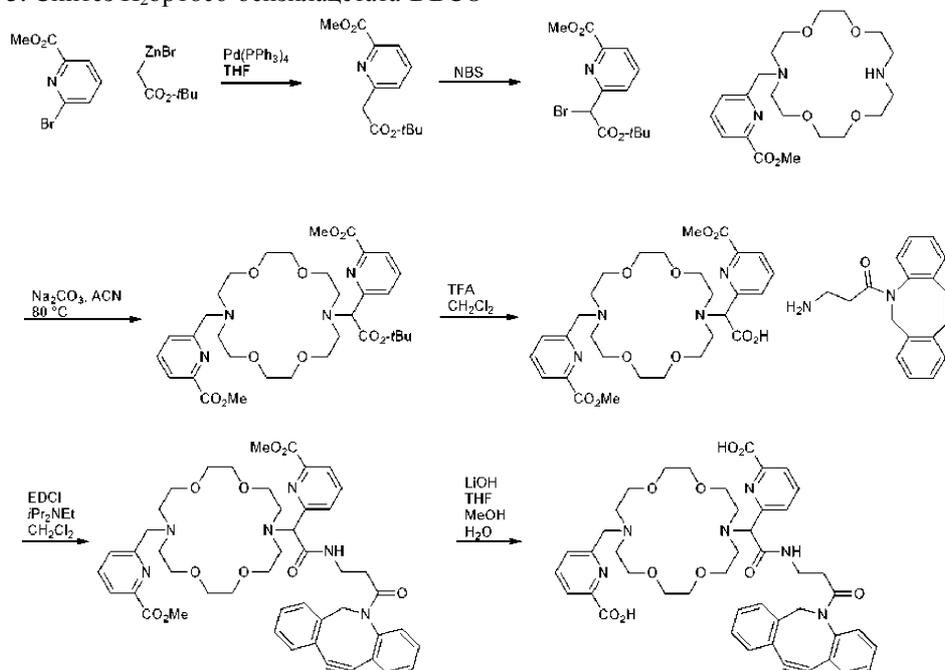
Пример 2. Эффективность синтеза и хелатирования производных H2bp18с6, несущих линкер клик-реакции DBCO.

Можно синтезировать следующие производные H2bp18с6, несущие линкер DBCO, для последующей конъюгации с нацеливающими лигандами посредством клик-реакций:



Например, H2bp18с6-ацетат-DBCO можно синтезировать по схеме 3.

Схема 3. Синтез H2bp18с6-бензилацетата-DBCO

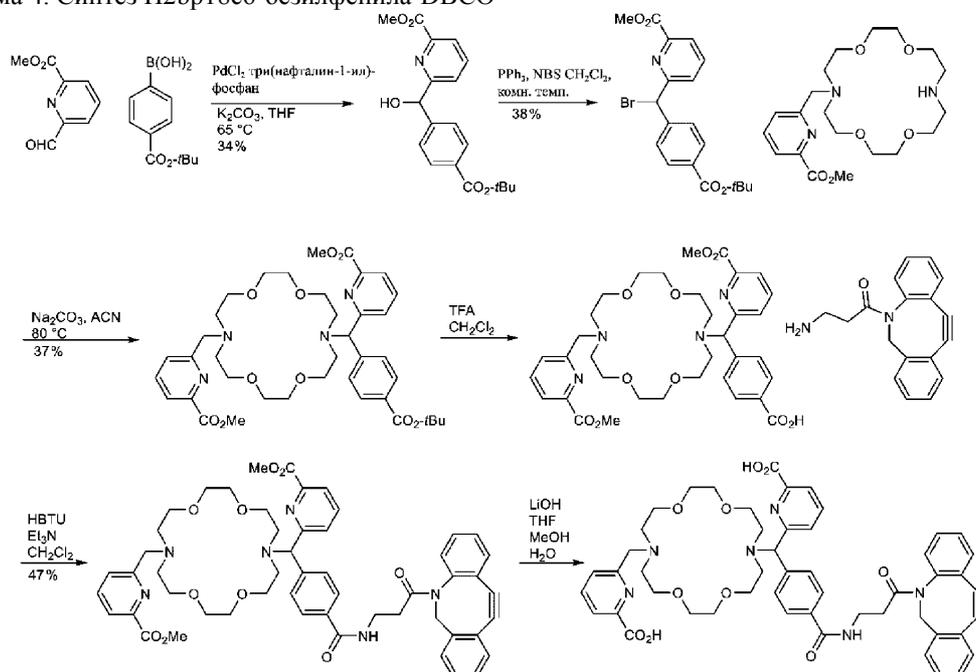


Метил-6-бромпиколинат можно вводить в реакцию с бромидом 2-трет-бутокси-2-оксоэтилпиколината в присутствии палладиевого катализатора с получением метил-6-(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)пиколината. Последующее бромирование с NBS и AIBN может приводить к получению метил-6-(1-бром-2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)пиколината. Реакция замещения метил-6-(1-бром-2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)пиколината на метил-6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)метил)пиколинат в основных условиях реакции позволяет получить метил-6-(2-(трет-бутокси)-1-(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-

ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)-2-оксоэтил)пиколинат. В присутствии TFA трет-бутиловый эфир может быть гидролизован до карбоновой кислоты. Образование амидной связи с дибензоциклооктинамими и последующий гидролиз сложных метиловых эфиров гидроксидом лития позволяет получить H2bp18с6-бензилацетат-DVCO.

H2bp18с6-бензилфенил-DVCO синтезируют по схеме 4.

Схема 4. Синтез H2bp18с6-бензилфенил-DVCO



THF (5 мл) добавляли к смеси метил-6-формилпиколината (165 мг, 1,0 ммоль), (4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)бороновой кислоты (444 мг, 2,0 ммоль), PdCl₂ (8,9 мг, 0,05 ммоль), три(нафталин-1-ил)фосфана (20,6 мг, 0,05 ммоль) и K₂CO₃ (415 мг, 3,0 ммоль) в атмосфере N₂ при -78°C. Смесь продували N₂ и перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 ч, затем нагревали при 65°C в течение 24 ч. Охлажденную реакционную смесь фильтровали через слой целита и фильтрат концентрировали. В результате хроматографии на силикагеле (от гептана до 50% EtOAc в гептане) получили 116 мг (выход 34%) продукта в виде желтого масла.

Раствор метил-6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)гидрокси)метилпиколината (138 мг, 0,40 ммоль), PPh₃ (126 мг, 0,48 ммоль) и NBS (79 мг, 0,44 ммоль) в CH₂Cl₂ (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли дополнительное количество PPh₃ (63 мг, 0,24 ммоль) и NBS (39 мг, 0,22 ммоль) и перемешивали еще в течение одного часа. Реакционный раствор загрузили в силикагелевую колонку. В результате хроматографии (от гептана до 30% EtOAc в гептане) получили 62 мг (выход 38%) продукта в виде желтоватой пленки, прилипшей к стенке колбы.

Смесь метил-6-((1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (56 мг, 0,14 ммоль), метил-6-(бром(4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)метил)пиколината (60 мг, 0,15 ммоль) и Na₂CO₃ (72 мг, 0,68 ммоль) в ACN (1 мл) нагревали при 80°C в течение 13 ч. Охлажденную реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. В результате хроматографии на силикагеле (от CH₂Cl₂ до 10% MeOH в CH₂Cl₂) получили 37 мг (выход 37%) продукта в виде белого твердого вещества.

К раствору метил-6-((4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (22 мг, 0,03 ммоль) в CH₂Cl₂ (1,5 мл) при комнатной температуре добавляли TFA (0,5 мл). Раствор перемешивали в течение 1 ч. Реакционный раствор концентрировали с получением неочищенного продукта в виде желтоватого остатка, который использовали на следующей стадии реакции без дополнительной очистки.

К раствору полученного выше продукта в CH₂Cl₂ (0,5 мл) при температуре 0°C добавили Et₃N (42 мкл, 0,3 ммоль), а затем HBTU (15 мг, 0,04 ммоль). После перемешивания раствора в течение 5 мин при 0°C добавляли дибензоциклооктинами в CH₂Cl₂ (0,5 мл). Холодную баню удаляли и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. В реакционную смесь добавляли воду и экстрагировали с помощью CH₂Cl₂ трижды. Объединенные экстракты промыли насыщенным водным раствором NaHCO₃, затем солевым раствором, высушили (Na₂SO₄) и профильтровали. Фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. В результате хроматографии на силикагеле (от CH₂Cl₂ до 10% MeOH в CH₂Cl₂) получили 13,2 мг (выход 47%) продукта в виде бесцветной пленки, прилипшей к стенке колбы.

К раствору диметилового эфира H2bp18с6-бензилфенил-DVCO (4,8 мг, 0,005 ммоль) в

THF/MeOH/H₂O (4 : 1:1 об./об./об., 0,6 мл) при комнатной температуре добавляли NaOH (1Н, 0,1 мл). После перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 1 ч ее нейтрализовали HCl (1Н) до pH=6,5. Реакционную смесь концентрировали на роторном испарителе при комнатной температуре для удаления летучих растворителей. Остаток растворяли в H₂O (4 мл) и ACN (1 мл). После лиофилизации получали неочищенный продукт в виде белого твердого вещества.

Хелатирование H₂bp18с6-бензилфенила-DBCO с помощью La(III).

Раствор H₂bp18с6-бензилфенил-DBCO (~ 1,55 мг/мл ≈ 1,7 мМ, 4 : 1 об./об. H₂O/ACN, pH~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой) получали из вышеуказанного неочищенного продукта.

Вышеуказанный раствор H₂bp18с6-бензилфенила (~ 1,55 мг/мл ≈ 1,7 мМ, 50 мкл, 0,085 мкмоль) обрабатывали La(NO₃)₃ (10 мМ в воде, не содержащей металлов, 50 мкл, 0,5 мкмоль). После тщательного перемешивания раствор анализировали методами ЖХ-МС и ВЭЖХ. MS (ES, m/z) 1047 (H₂bp18с6-бензилфенил-DBCO+La⁺³-2H⁺).

Метод ВЭЖХ: колонка XBridge C18 3,5 мкм 150 × 4,6 мм, 100 Å; подвижная фаза А: 0,1% TFA в H₂O, В: 0,1% TFA в ACN; градиент от 10% до 50% В за 0-20 мин, градиент от 50% до 100% В за 20-20,1 мин, изократический режим при 100% В за 20,1-25 мин, градиент от 100% до 10% В за 25-25,1 мин, изократический режим при 10% В за 25,1-30 мин; скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 30°C; объем вводимой пробы 5 мкл.

Хелатирование H₂bp18с6-бензилфенила-DBCO с помощью ²²⁵Ac(III).

(i) Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III) при низком соотношении Ac/хелатор.

В пластиковый флакон последовательно добавляли ацетат тетраметиламмония (1М раствор в воде, 10 мкл), H₂bp18с6-бензилфенил-DBCO (1,7 мМ в H₂O/ACN, 2 мкл, ~ 3,4 нмоль) и ²²⁵Ac(NO₃)₃ (10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 3 мкл, 30 мКи). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч.

Анализ iTLC-SG: 0,5 мкл реакционного раствора наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. Радиоактивность на фронте растворителя iTLC-SG не наблюдали, что указывает на отсутствие свободного Ac-225 в реакционном растворе через 1 ч.

Анализ ВЭЖХ: 5 мкл реакционной смеси разбавляли 95 мкл буфера PBS. Разбавленную смесь анализировали методом ВЭЖХ. После ВЭЖХ фракции собирали с интервалами в одну минуту. Собранные фракции оставляли на ночь при комнатной температуре, затем подсчитывали с помощью гамма-счетчика. Радиоактивный след ВЭЖХ построили на основе активностей фракций.

Провокация ДТРА: 0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА и инкубировали смесь в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. Радиоактивность на фронте растворителя iTLC-SG не наблюдали.

(ii) Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III) при высоком соотношении ²²⁵Ac/хелатор.

В пластиковый флакон последовательно добавляли ацетат тетраметиламмония (1М раствор в воде, 10 мкл), 2 bp18с6-бензилфенил-DBCO (0,17 мМ в воде, 2 мкл, ~ 0,34 нмоль) и ²²⁵Ac(NO₃)₃ (10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 5 мкл, 50 мКи). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь анализировали с помощью iTLC-SG и добавления ДТРА, как описано выше.

Пример 3. Получение H₂bp18с6-бензилфенила-DBCO-IgG4 и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Общий способ получения радиоактивных иммуноконъюгатов.

Радиоактивные иммуноконъюгаты, содержащие комплекс радиоактивного металла изобретения, ковалентно связанный с антителом, получают посредством радиоактивного мечения с помощью клик-реакции. На фиг. 2А-2D схематически представлен пример способа радиоактивного мечения с помощью клик-реакции с получением радиоактивного иммуноконъюгата настоящего изобретения.

Случайная конъюгация азид/скобы с антителом.

Исходный раствор антитела (1-10 мг/мл) в 10 ммоль ацетате натрия, pH 5,2, фосфатно-солевом буфере, pH 7 или другом совместимом буфере, смешивали с 20% (по объему) 1М натрий-карбонатного буфера, pH 9 до конечного pH ~9. NHS-ПЭГ4-азид (Thermo, каталожный № 26130) растворяли в ДМСО до конечной концентрации 100 мМ, и добавляли 0,2% (об./об.) исходного вещества для получения молярного избытка ~3-10 относительно антитела (АТ). Реакционную смесь инкубировали при 22°C в течение 10 мин, затем гасили добавлением 1М трис pH 7,5 до конечной концентрации 50 мМ трис.

Конъюгат азид-мкАт очищали и заменяли буфер на совместимый буфер (PBS; 20 мМ HEPES 150 мМ, NaCl pH 7,5; или 10 мМ ацетата натрия, pH 5,2), с использованием метода, такого как колонки для обессоливания Zeba с отсечением по молекулярной массе 7 кДа (Thermo); диализ; стандартная аффинная хроматография на основе связывания с белком А; или другой совместимый метод. После очистки конъю-

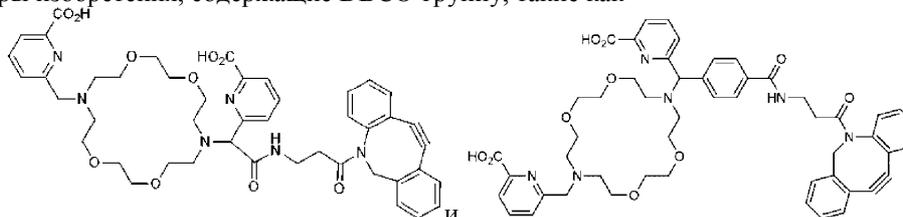
гатов концентрировали до 10-20 мг/мл с использованием концентраторов Amicon с отсечением по молекулярной массе 50 кДа (Millipore). Эффективность конъюгации определяли методом ЖХ-МС.

Сайт-специфическое включение азидосахаров в гликаны антител.

Гликаны антител подрезали при помощи GlycINATOR (Genovis), бактериальной эндогликозидазы, специфической для β -1,4-связи между остатками корового GlcNAc в сайте(ах) гликозилирования Fc, оставляя внутреннюю часть GlcNAc интактной на Fc, которая затем может быть использована для сайт-специфического включения азидосахаров. Более конкретно, иммобилизованный GlycINATOR на агарозных гранулах, помещенные в колонку (Genovis), уравнивали в трис-буферном солевом растворе pH 7,4 (TBS). К смоле добавляли 1 мл мкАт в концентрации 5-10 мг/мл и инкубировали на качалке в течение 1 ч при комнатной температуре. мкАт элюировали вращением при 100xg в течение 1 мин. Колонку элюировали еще 3 раза 0,5 мл TBS. Элюаты, содержащие подогнанное мкАт, объединяли и добавляли буферную добавку (Genovis) вместе с азидосахарным субстратом UDP-GalNaz и ферментом галактозилтрансферазой GalT. Смесь нагревали в течение ночи при 30°C. Конечное азид-мкАт очищали с использованием колонки mAb Select (GE) на приборе АКТА Avant. Модификацию азид подтверждали методом ЖХ-МС.

Конъюгация хелатора с азидо-Ab.

Хелаторы изобретения, содержащие DBCO-группу, такие как



координируются с ионом радиоактивного металла, таким как Ac, как описано в примере 1, с образованием радиоактивного комплекса. Случайное или сайт-специфическое модифицированное азидом антитело в PBS или другом совместимом буфере (10-20 мг/мл) добавляют к раствору радиоактивного комплекса. Реакционный раствор осторожно перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение 3 часов перед очисткой колонкой PD-10 (GE Healthcare), предварительно кондиционированной 15 мл натрий-ацетатного буфера, 10 мМ, pH 6-6,5 или другим совместимым буфером. Чистоту оценивают с помощью iTLC-SG. Раствор продукта анализируют с помощью ВЭЖХ на химическую и радиохимическую чистоту. Концентрацию антител в растворе продукта определяют по УФ-поглощению с использованием стандартной кривой. Активность раствора продукта, в свою очередь, количественно определяют с использованием дозкалибратора Capintec CRC-55TW.

Аналитическая характеристика меченных с помощью клик-реакции радиоактивных иммуноконъюгатов.

Радиохимическую конверсию (% RA конверсии) определяют с помощью мгновенной тонкослойной хроматографии (iTLC-SG). Радиохимическую чистоту (% RA чистоты) хелатов Ac-225 определяют с помощью эксклюзионной ВЭЖХ.

Прямое хелатирование $^{225}\text{Ac(III)}$ с $\text{H}_2\text{bp18c6-phenyl-IgG4}$.

Следующий способ получения радиоактивного иммуноконъюгата может называться способом "одностадийного прямого радиоактивного мечения" (например, как схематически проиллюстрировано на фиг. 2С). Радиоактивное мечение успешно выполнено в условиях, не содержащих металлов, а также в примерах были проиллюстрированы способности хелатора быть устойчивым к металлическим загрязнителям.

IgG4, используемый в данном примере, представляет собой изотипический контроль, который связывается с антигеном респираторно-синцитиального вируса (RSV). Аминокислотные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) IgG4 представлены ниже как SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно:

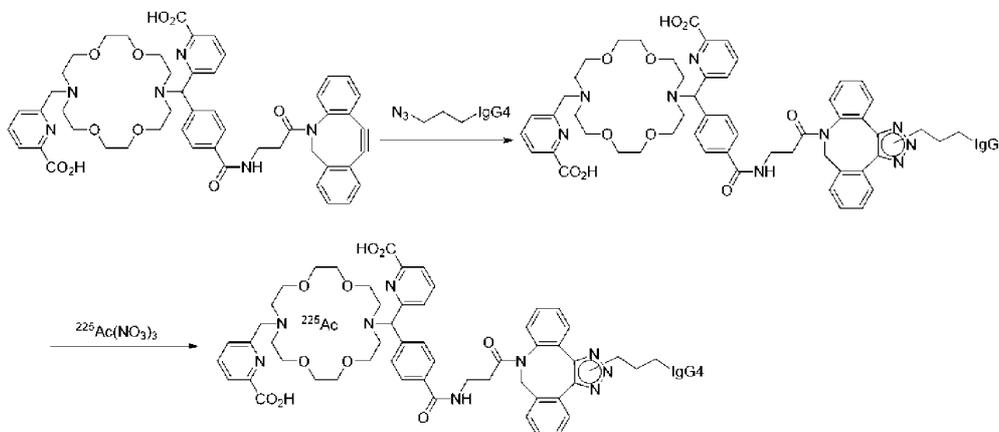
SEQ ID NO:1 мА HC

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
 DDDKRYNPSLK SRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARLYGFTYGFAYWGO
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAP
 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:2 мКАТ LC

DIVMTQSPDSLAVSLGERNATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPELLIY
 AASNPEGVPRDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Схема 5. Прямое хелатирование $^{225}\text{Ac(III)}$ с H2bp18с6-фенилом-IgG4 (образованным путем клик-реакции H2bp18с6-бензилфенила-DBCO с сайт-специфическим азидо-IgG4)



Модификация азидом мКАТ и клик-реакция: вышеуказанное мКАТ IgG4 было сайт-селективно модифицировано 100х молярным избытком 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мКАТ отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мКАТ элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия, pH 3,0, а затем заменяют на 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl, pH 7,5, с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток H2bp18с6-бензилфенил-DBCO 10х вводили в реакцию с сайт-специфическим азидо-IgG4 (DOL=2) в при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азиды отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl, pH 7,5, с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl, pH 7,5 с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 ×g. Это обеспечивало получение конечного сайт-специфического конъюгата H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-IgG4 с CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 20 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли $^{225}\text{Ac(NO}_3)_3$ (~ 5 мКи/мл в 0,1N HCl, 20 мкл, 0,098 мКи) и H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-IgG4 (сайт-специфический, CAR=2, 1,7 мг/мл в 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl pH 7,5, 36 мкл, 61,2 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что ука-

зывало на полное хелатирование всего Ас-225 в реакционном растворе через 2 ч.

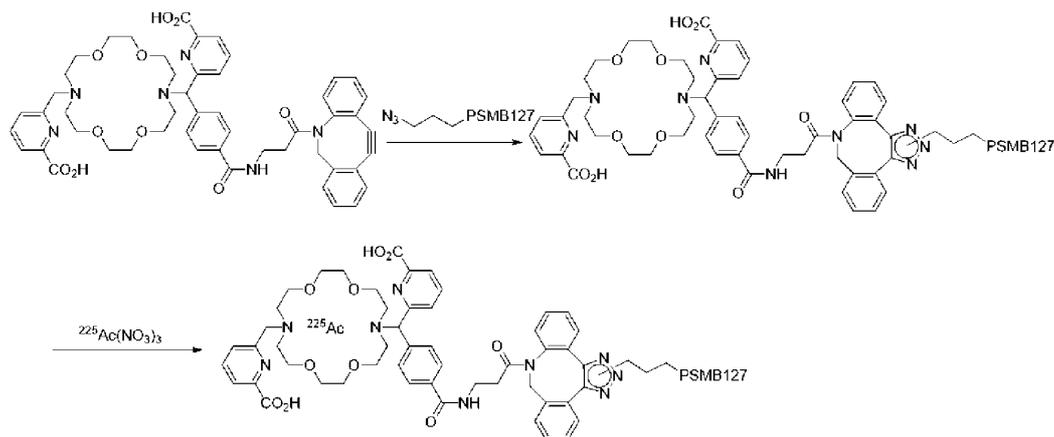
Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: смолу PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл × 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл × 3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и после промывки с помощью пипетки переносили в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ас-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ас-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl, 7,8 мм × 30 см, объемом 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; объем введенной пробы: 30 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-IgG4 на УФ-кривой при ВЭЖХ.

Пример 4. Получение H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-PSMB127 и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 6. Прямое хелатирование ²²⁵Ac(III) с H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-PSMB127 (образованным путем клик-реакции H2bp18c6-бензилфенил-DBCO с сайт-специфическим азид-PSMB127)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: PSMB127 сайт-селективно модифицировали с помощью 100х молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия, pH 3,0, а затем заменяют на 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl, pH 7,5, с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток 10х H2bp18c6-бензилфенил-DBCO вводили в реакцию с сайт-специфичным азидо-PSMB127 (DOL=2) при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азида отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl, pH 7,5, с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl, pH 7,5 с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 хг. Это обеспечивало получение конечного сайт-специфического конъюгата H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-PSMB127 с CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 20 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1N HCl, 20 мкл, 0,098 мКи) и H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-PSMB127 (сайт-

специфический, $CAR=2$, 2,8 мг/мл в 20 мМ ГЭПЭС, 100 мМ NaCl pH 7,5, 22 мкл, 61,6 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

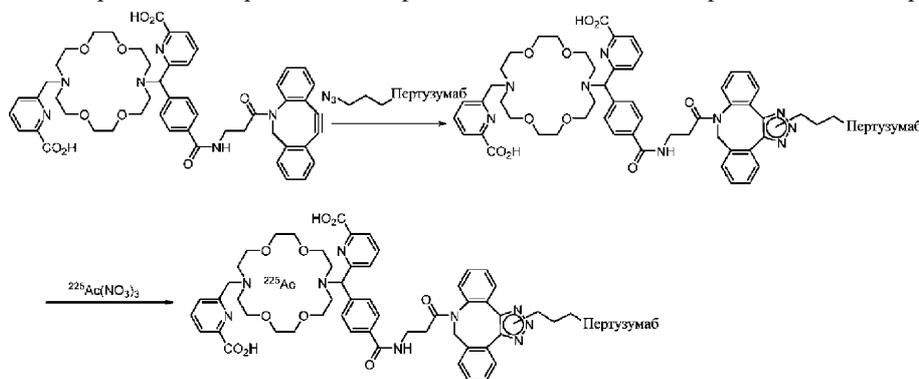
Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: Смола PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл \times 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл \times 3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl, 7,8 мм \times 30 см, объемом 5 мкм; Температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (\times 1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа -20 мин; объем введенной пробы: 30 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-PSMB127 на УФ-кривой при ВЭЖХ.

Пример 5. Получение H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-пертузумаба и мечение ^{225}Ac (III).

Схема 7. Прямое хелатирование ^{225}Ac (III) с H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-пертузумабом (образованным путем клик-реакции H2bp18c6-бензилфенил-DBCO с сайт-специфическим азид-пертузумабом)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: пертузумаб сайт-селективно модифицировали с помощью 100х молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1х dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток H2bp18c6-бензилфенил-DBCO 10х вводили в реакцию с сайт-специфичным азид-пертузумабом ($DOL=2$) в 1х dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азиды отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1х dPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 xg. Это обеспечивало получение конечного сайт-специфического конъюгата H2bp18c6-бензилфенил-пертузумаб с $CAR=2$. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм \times 30

см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS ($\times 1$, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1N. HCl, 10 мкл, 0,042 мКи) и H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-пертузумаб (сайт-специфический, SAR=2, 2,4 мг/мл в буферном растворе PBS, 12,5 мкл, 30 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

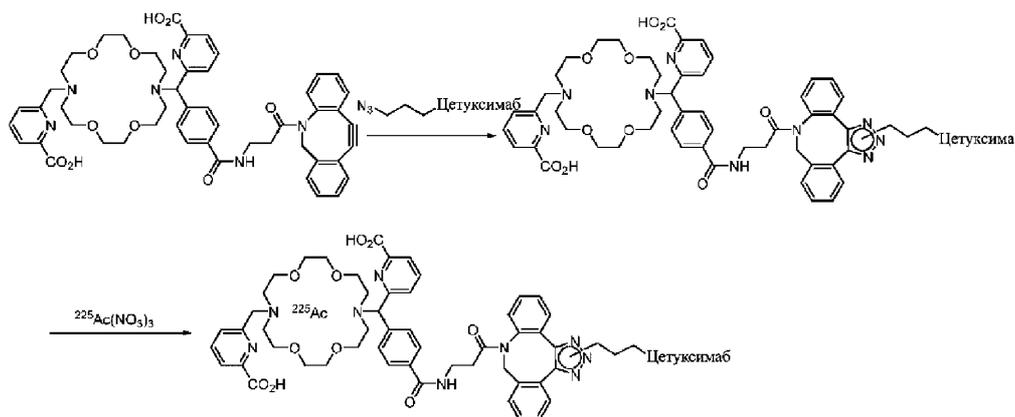
Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: Смола PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл \times 3 буфера NaOAc (10 mM, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл \times 3 буферным раствором NaOAc (10 mM, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 mM, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 mM раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 mM ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWx1, 7,8 мм \times 30 см, объемом 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS ($\times 1$, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа -20 мин; объем введенной пробы: 30 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-пертузумаб на УФ-кривой при ВЭЖХ.

Пример 6. Получение H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-цетуксимаба и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 8. Прямое хелатирование ²²⁵Ac(III) с H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-цетуксимабом (образованным путем клик-реакции H2bp18с6-бензилфенил-DBCO с сайт-специфическим азид-цетуксимабом)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: цетуксимаб сайт-селективно модифицировали 100x молярным избытком 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 mM цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1x dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток 10x H2bp18с6-бензилфенила-DBCO вводили в реакцию с сайт-специфичным азидо-цетуксимабом (DOL=2) в 1x dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции

DVCO-азида отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1x dPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15x в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 $\times g$. Это обеспечивало получение конечного сайт-специфического конъюгата H2bp18с6-бензилфенил-цетуксимаба CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм \times 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; Температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS ($\times 1$, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1N. HCl, 10 мкл, 0,044 мКи) и H2bp18с6-бензилфенил-DVCO-цетуксимаб (сайт-специфический, CAR=2, 1,8 мг/мл в буферном растворе PBS, 16,7 мкл, 30 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

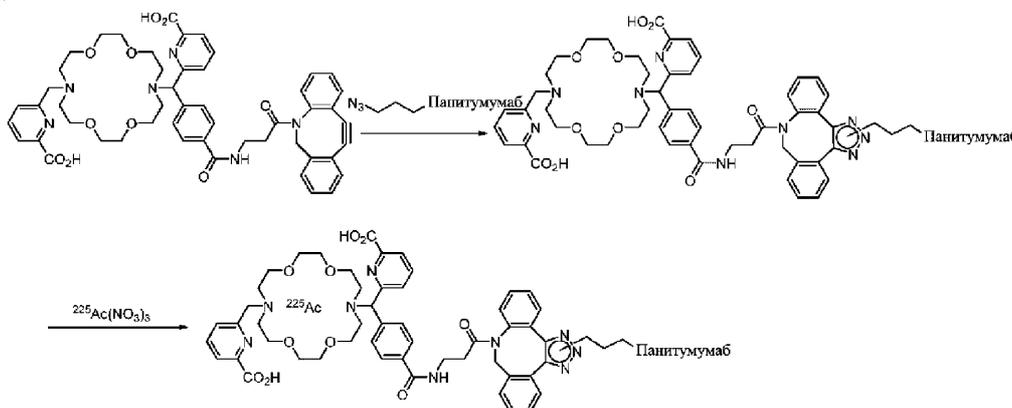
Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: Смола PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл \times 3 буфера NaOAc (10 mM, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл \times 3 буферным раствором NaOAc (10 mM, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 mM, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 mM раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 mM ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl, 7,8 мм \times 30 см, объемом 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS ($\times 1$, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа -20 мин; объем введенной пробы: 30 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18с6-бензилфенил-DVCO-цетуксимаб на УФ-кривой при ВЭЖХ.

Пример 7. Получение H2bp18с6-бензилфенил-DVCO-панитумумаба и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 9. Прямое хелатирование ²²⁵Ac(III) с H2bp18с6-бензилфенил-DVCO-панитумумабом (образованным путем клик-реакции H2bp18с6-бензилфенила-DVCO с сайт-специфическим азидо-панитумумабом)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: Панитумумаб сайт-селективно модифицировали с по-

мощью 100х молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансклутаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1х dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток H2bp18с6-бензилфенил-DBCO 10х вводили в реакцию с сайт-специфическим азидпанитумумабом (DOL=2) в 1х dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азиды отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1х dPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 × g. Это обеспечивало получение сайт-специфичного для конечного сайта конъюгата H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-панитумумаба с CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; Температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1Н. HCl, 10 мкл, 0,043 мКи) и H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-панитумумаб (сайт-специфический, CAR=2, 2,6 мг/мл в буферном растворе PBS, 11,5 мкл, 30 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

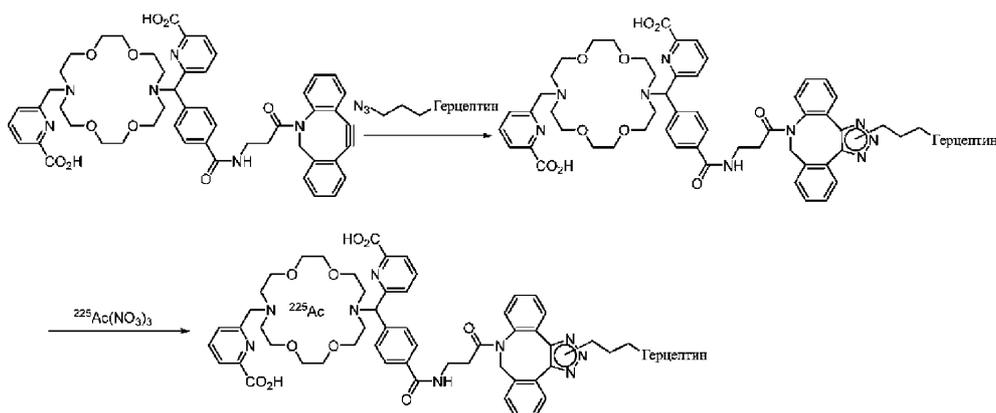
Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: смолу PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл × 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл ×3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; объем введенной пробы: 30 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 секунд или 1 минута. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-панитумумаба на УФ-кривой при ВЭЖХ.

Пример 8. Получение H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-герцептина и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 10. Прямое хелатирование ²²⁵Ac(III) с H2bp18с6-бензилфенил-DBCO-герцептином (образованным путем клик-реакции H2bp18с6-бензилфенила-DBCO с сайт-специфическим азидо-герцептином)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: Герцептин сайт-селективно модифицировали 100х молярным избытком 3-азидопропиламина и микробной транслугтаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1х dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток H2bp18c6-бензилфенил-DBCO 10х вводили в реакцию с сайт-специфическим азид-герцептином (DOL=2) в 1х dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азида отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1х dPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в PBS с использованием концентрата 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 × g. В результате получали специфичный для конечного сайта конъюгат H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-герцептина с CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1N. HCl, 10 мкл, 0,041 мКи) и H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-герцептин (сайт-специфический, CAR=2, 1,7 мг/мл в буферном растворе PBS, 17,6 мкл, 30 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: смолу PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл × 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Вся реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл × 3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

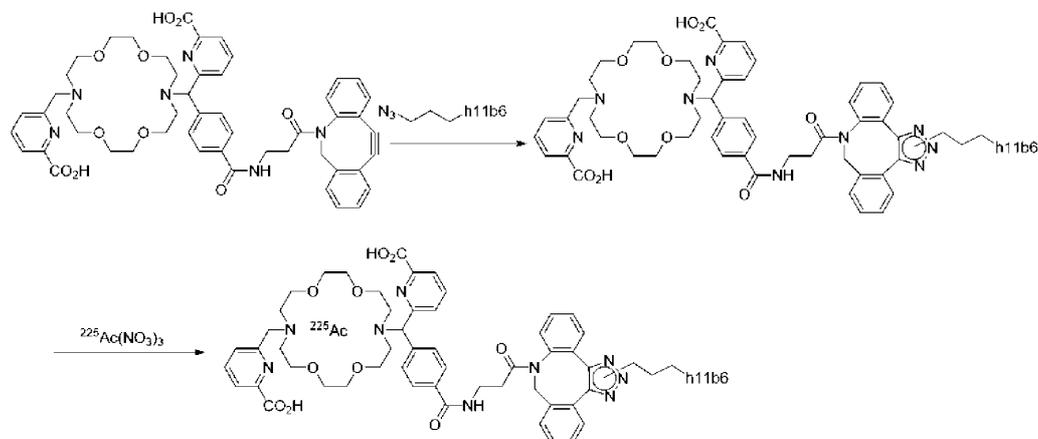
Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; объем введенной пробы: 30 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радио-

кривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-герцептина на УФ-кривой ВЭЖХ.

Пример 9. Получение H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-H11B6 и мечение ^{225}Ac (III).

Схема 11. Прямое хелатирование ^{225}Ac (III) с H2bp18c6-бензилфенилом-DBCO-H11B6 (образованным путем клик-реакции H2bp18c6-бензилфенила-DBCO с сайт-специфическим азид-H11B6)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: H11B6 сайт-селективно модифицировали с помощью 100x молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Aactiva TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1x dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток H2bp18c6-бензилфенил-DBCO 10x вводили в реакцию с сайт-специфическим азид-H11B6 (DOL=1,82) в 1x dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азид отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1xdPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15x в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при $3800 \times g$. В результате получали специфичный для конечного сайта конъюгат H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-H11B6 с CAR=1,82. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм \times 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS ($\times 1$, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ (~ 5 мКи/мл в 0,1N. HCl, 10 мкл, 0,043 мКи) и H2bp18c6-бензил-DBCO-H11B6 (сайт-специфический, CAR=1,82, 1,2 мг/мл в буферном растворе PBS, 25,0 мкл, 30 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~ 6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: смолу PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл \times 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл \times 3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

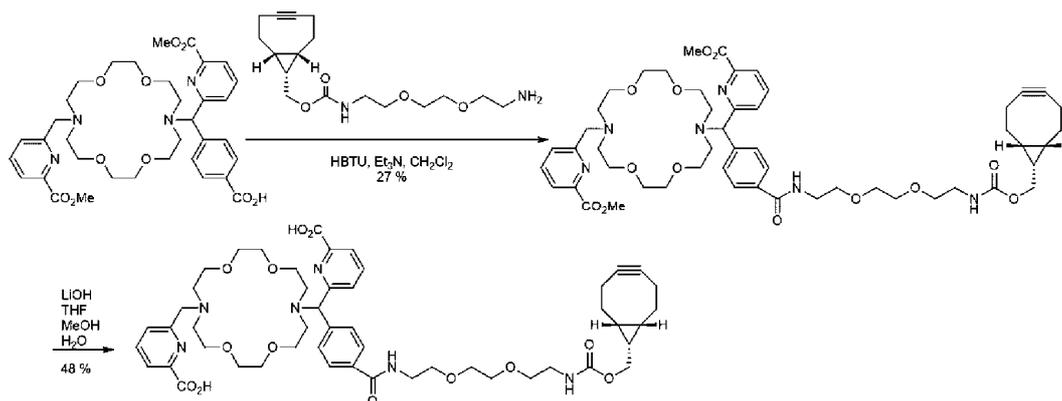
Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактив-

ности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; объем введенной пробы: 30 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18с6-бензилфенил-DVCO-H11B6 на УФ-кривой ВЭЖХ.

Пример 10. Синтез H2bp18с6-фенила-BCN.

Схема 12

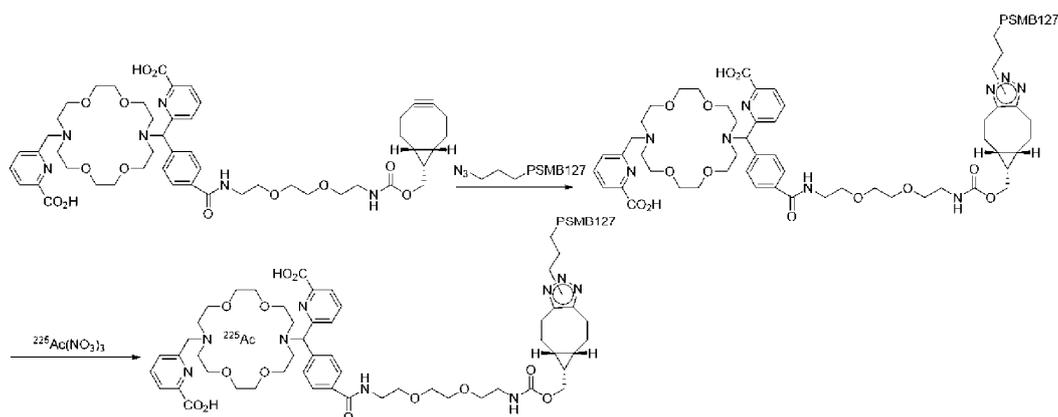


К раствору 4-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7-ил)метил)бензойной кислоты (50 мг, 0,073 ммоль) и Et3N (0,1 мл, 0,73 ммоль) в CH2Cl2 (2,5 мл) при 0°C добавляли HATU (37 мг, 0,10 ммоль). После перемешивания раствора в течение 5 мин при 0°C добавляли N-[(1R,8S,9S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметилоксикарбонил]-1,8-диамино-3,6-диоксаоктан в CH2Cl2 (1 мл). Холодную баню удаляли и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Смесь сконцентрировали и остаток очистили хроматографированием на функционализированном амином силикагеле (CH2Cl2-10% MeOH в CH2Cl2) с получением 19,8 мг (выход 27%) продукта в виде бесцветной пленки, прилипшей к стенке колбы. Анализ методом ЖХ-МС показал пики массы/ионов при 987,6 [M+H⁺].

К раствору метил-6-((4-((1-((1R,8S,9S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)-3-оксо-2,7,10-триокса-4-азадекан-12-ил)карбамоил)фенил)(16-((6-(метоксикарбонил)пиридин-2-ил)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дiazациклооктадекан-7-ил)метил)пиколината (14,5 мг, 0,015 ммоль) в THF/MeOH/H2O (4 : 1:1 об./об./об., 1,8 мл) при комнатной температуре добавляли LiOH (1Н, 0,3 мл). После перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 1 ч ее нейтрализовали HCl (1Н) до pH=6,5. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очистили хроматографированием на функционализированном амином силикагеле (от CH2Cl2 до 10% MeOH в CH2Cl2) с получением 9,5 мг (выход 48%) H2bp18с6-бензилфенил-BCN в виде бесцветной пленки, которую растворили в H2O (4 мл) и ACN (1 мл). После лиофилизации получали продукт в виде белого твердого вещества. Н ЯМР (CD3OD, 400 МГц) δ 7,91 (д, J=8 Гц, 2H), 7,84 (т, J=8 Гц, 2H), 7,81 (д, J=8 Гц, 2H), 7,60 (д, J=8 Гц, 2H), 7,53 (д, J=8 Гц, 1H), 7,46 (д, J=8 Гц, 1H), 5,24 (с, 1H), 4,10 (д, J=8 Гц, 2H), 3,91 (уш. с, 2H), 3,75-3,58 (м, 22H), 3,56 (т, J=4 Гц, 2H), 3,51 (т, J=4 Гц, 2H), 3,23 (т, J=4 Гц, 2H), 2,97 (дт, J=8, 4 Гц, 2H), 2,92-2,82 (м, 4H), 2,78 (дт, J=8, 4 Гц, 2H), 2,28-2,08 (м, 6H), 1,65-1,50 (м, 2H), 1,39-1,27 (м, 1H), 0,96-0,84 (м, 2H). MS (ESI) 981,4 [M+Na⁺].

Пример 11. Получение H2bp18с6-бензилфенил-BCN-PSMB127 и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 13. Прямое хелатирование ²²⁵Ac(III) с H2bp18с6-бензилфенил-BCN-PSMB 127 (образованным путем клик-реакции H2bp18с6-бензилфенила-BCN с сайт-специфическим азид-PSMB127)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: PSMB127 сайт-селективно модифицировали с помощью 100х молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1х dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток H2bp18c6-бензилфенил-BCN 10х вводили в реакцию с сайт-специфическим азид-PSMB127 (DOL=2) в 1х dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции BCN-азида отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1х dPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 × g. В результате получали специфичный для конечного сайта конъюгат H2bp18c6-бензилфенил-BCN-PSMB127 с CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1N HCl, 10 мкл, 0,046 мКи) и H2bp18c6-бензил-BCN-PSMB127 (сайт-специфический, CAR=2, 2,3 мг/мл в буферном растворе PBS, 13,0 мкл, 30 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Очистка: реакцию смесь очищали на колонке PD-10: Смола PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл × 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Вся реакцию смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл × 3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

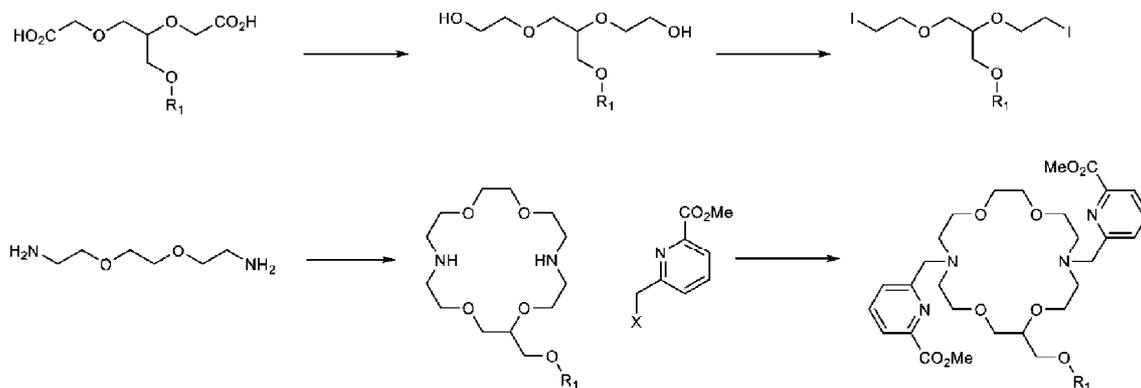
Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; объем введенной пробы: 40 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радио-

кривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18с6-бензилфенил-BCN-PSMB127 на УФ-кривой ВЭЖХ.

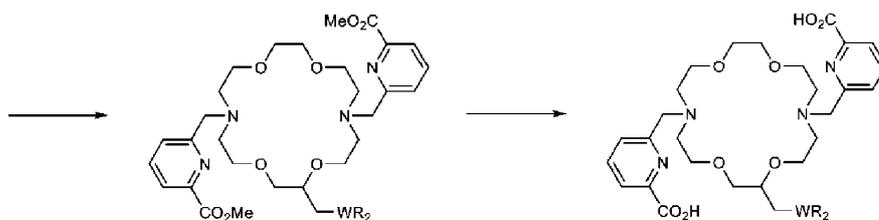
Пример 12. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO.

Производные H2bp18с6, замещенные по атому углерода макроциклического кольца линкерами для конъюгации с нацеливающим лигандом, синтезируют по существу по схеме 14а и схеме 14б, представленных ниже.

Схема 14а. Синтез производных кольца H₂bp18с6, замещенных на углеродном атоме макроциклического кольца, с помощью линкера для конъюгации



для R₁ = алкил или CH₂CH₂OH, см. *Org. Lett.* 2005, 7(6), 1105-1108



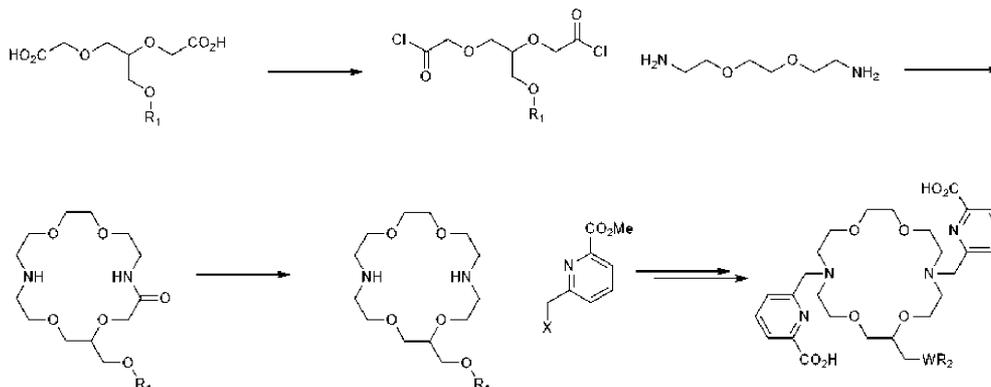
OR₁ может быть преобразован в другие функциональные группы для лигирования WR₂.

R₂ представляет собой NH₂, N₃, альдегид, карбоксилат, алкин и т. п.

W отсутствует или представляет собой линкер, такой как гетероатом, алкил, амил с гетероатомом(ами), замещенный арил и т. п.

Синтез диаза-18-краун-6, замещенного -CH₂OR₁, выполняют с использованием процедур, описанных в *Org. Lett.* 2005, 7(6), 1105-1108, который затем вступает в реакцию с производным 6-(галогенметил)пиколиновой кислоты, как описано выше в отношении схем 3 и 4. Функциональная группа OR₁ может быть преобразована в другую функциональную группу WR₂ для лигирования или конъюгации с линкером, нацеливающим лигандом и т.п., включая, без ограничений, NH₂, N₃, альдегид, карбоксилат, алкин и т.п., с линкером W или без него, который представляет собой гетероатом, алкил, алкил с гетероатомом(-ами), замещенный арил и т.п. На схеме 6а X представляет собой уходящую группу, например галоген, мезилат, тозилат и т.п.; R₁ представляет собой аллил, бензил, спирт и т.п.; W отсутствует или представляет собой линкер, например гетероатом, алкил, гетероалкил, замещенный арил и т.п.; R₂ представляет собой NH₂, N₃, альдегид, карбоксилат, алкинил и т.п.

Схема 14б. Синтез производных кольца H₂bp18с6, замещенных на углеродном атоме макроциклического кольца, с помощью линкера для конъюгации

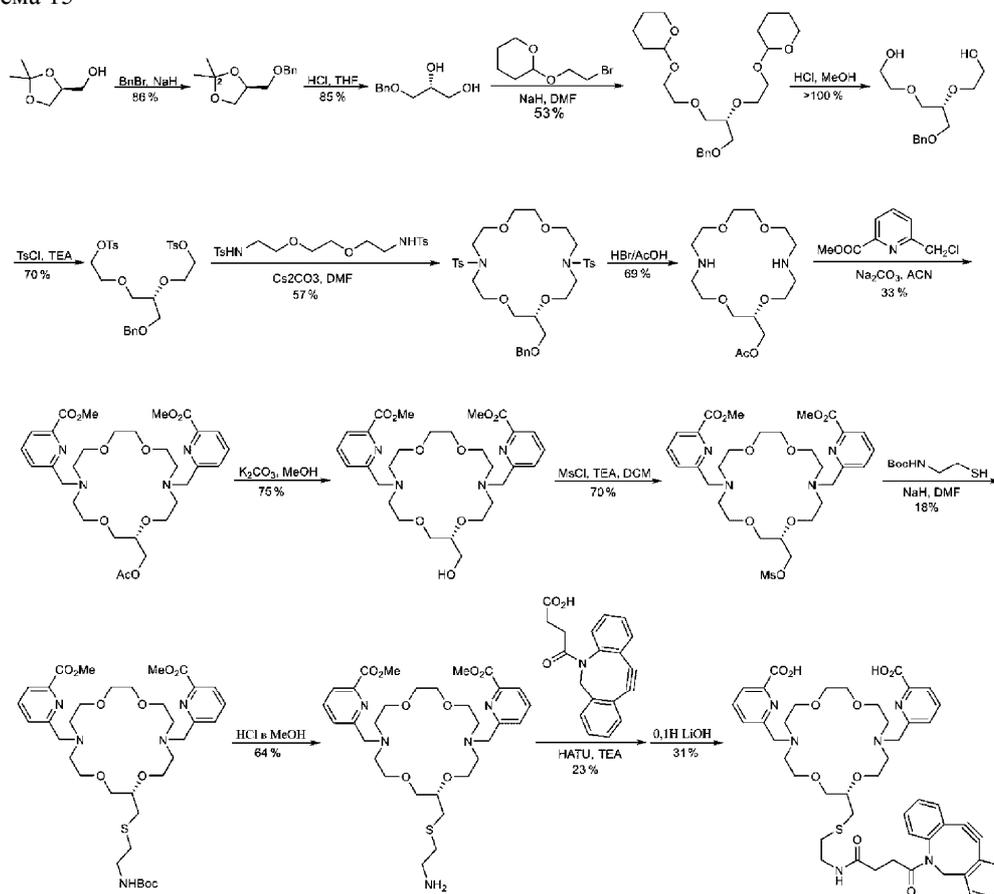


Диаза-18-краун-6, замещенный -CH₂OR₁, также может быть синтезирован с использованием процедур, описанных в *Journal of Organic Chemistry*, 1988, 53(14), 3190-5 и *Journal of Heterocyclic Chemistry*,

1986, 23(2), 609-13, который затем вступает в реакцию с производным 6-(галогенметил)пиколиновой кислоты, как описано выше в отношении схем 3 и 4. Функциональная группа OR_1 может быть преобразована в другую функциональную группу R_2 для лигирования или конъюгации с линкером, нацеливающим лигандом и т.п., включая, без ограничений, NH_2 , N_3 , альдегид, карбоксилат, алкин и т.п., с линкером W или без него, который представляет собой гетероатом, алкил, алкил с гетероатомом(-ами), замещенный арил и т.п.

Далее описан синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO.

Схема 15



Гидрид натрия (18,16 г, 60% в минеральном масле, 454 ммоль) добавляли к раствору (S)-(+)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанола (50 г, 378 ммоль) в безводном DMF (500 мл) при 0°C. После перемешивания при этой температуре в течение 10 мин к этой суспензии медленно добавляли бензилбромид (77,63 г, 454 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение дополнительных 8 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным раствором хлорида аммония и экстрагировали дихлорметаном (2 × 500 мл). Органический слой промывали соевым раствором и высушивали над сульфатом натрия. После удаления растворителя остаток очищали колоночной флеш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя петролейный эфир и этилацетат, с получением (S)-4-((бензоксидиметил)-2,2-диметил-1,3-диоксолана (72 г, 86%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (S)-4-((бензилоксидиметил)-2,2-диметил-1,3-диоксолана (72 г, 324 ммоль) в THF (100 мл) добавляли 1,5N. HCl (100 мл) с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (500 мл) и нейтрализовали 10% раствором бикарбоната натрия. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (2 × 500 мл), промывали соевым раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной флеш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя петролейный эфир и этилацетат, с получением (R)-3-(бензиокси)пропан-1,2-диола (51 г, 85%) в виде бесцветного масла.

К суспензии гидрида натрия (26,29 г, 60% в минеральном масле, 686 ммоль) в DMF (20 мл) по каплям добавляли (R)-3-(бензилокси)пропан-1,2-диол (25,0 г, 137 ммоль) в DMF (100 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли 2-(2-бромэтоксидитетрагидро-2H-пиран (85,89 г, 411 ммоль) в DMF (100 мл). Реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 300 мл). Комбинированный органический слой промывали водой, сушили сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное масло очищали флеш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), ис-

пользуя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением 2,2'-(((R)-3-(бензилокси)пропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(окси))бис(тетрагидро-2Н-пиран) (32 г, 53%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору 2,2'-(((R)-3-(бензилокси)пропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(окси))бис(тетрагидро-2Н-пирана) (32 г, 73,05 ммоль) в 500 мл метанола добавляли 5 мл HCl в диоксане. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждали и концентрировали. Неочищенный продукт (R)-2,2'-((3-(бензилокси)пропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ол) (20 г) использовали на следующей стадии без очистки.

К раствору (R)-2,2'-((3-(бензилокси)пропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) (20 г, 74,07 ммоль) в дихлорметане (250 мл) и триэтиламинe (53 мл, 370 ммоль) при 10°C порциями добавляли твердый р-толуолсульфонилхлорид (42,2 г, 222 ммоль). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. После завершения реакции суспензию разбавляли 1000 мл дихлорметана, промывали холодной 1М HCl (3 × 100 мл), а затем 2 × 500 мл ледяной воды, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали с получением твердой смолы. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (R)-((3-(бензилокси)пропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (30 г, 70%) в виде бесцветной жидкости.

Смесь (R)-((3-(бензилокси)пропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (30 г, 51,9 ммоль) и карбоната цезия (50,76 г, 155,7 ммоль) в 200 мл безводного DMF перемешивали в течение 1,5 ч при температуре окружающей среды. К суспензии добавляли N,N'-((этан-1,2-диилбис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(4-метилбензолсульфонамид) (23,56 г, 51,9 ммоль) в 200 мл DMF по каплям в течение 2 ч. Смесь перемешивали в течение дополнительных 20 ч при температуре окружающей среды. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением твердой пасты.

Смесь суспендировали в 1000 мл дихлорметана и перемешивали в течение 30 мин. Выпавшее в осадок твердое вещество отфильтровали, фильтрат выпарили при высоком вакууме. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (R)-2-((бензилокси)метил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекана (24 г, 67%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (R)-2-((бензилокси)метил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекана (24 г, 34,78 ммоль) в бромистоводородной кислоте в уксусной кислоте (50%, 100 мл) при комнатной температуре добавляли фенол (16,35 г, 174 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. После завершения реакции ее охлаждали до комнатной температуры и удаляли уксусную кислоту в высоком вакууме. Неочищенный продукт очищали на обращенно-фазовой колонке, используя 0-100% ацетонитрила в воде (0,1% TFA), с получением (S)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-2-ил)метилацетата (8,0 г, 69%) в виде бесцветной жидкости.

Суспензию ацетата (S)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-2-ил)метила (8,0 г, 23,95 ммоль), метил-6-(хлорметил)пиколината (11,07 г, 59,88 ммоль) и карбоната натрия (12,69 г, 119,75 ммоль) в сухом ацетонитриле (100 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (5,0 г, 33%) в виде коричневой жидкости.

К раствору диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (5,0 г, 7,91 ммоль) в метаноле (50 мл) добавляли карбонат калия (0,11 г, 0,79 ммоль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 10 мин. После завершения реакции ее концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), элюируя градиентом 0-10% метанола в дихлорметане с получением диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(R)-дипиколината (3,5 г, 75%) в виде коричневой жидкости.

К раствору диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(R)-дипиколината (1,0 г, 1,7 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли триэтиламин (0,51 г, 0,70 мл, 5,1 ммоль). К этому раствору по каплям добавляли мезилхлорид (0,39 г, 0,26 мл, 3,4 ммоль) при температуре 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь концентрировали и неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (оксид алюминия - нейтральный), используя метанол в дихлорметане (1-2%) в качестве элюента, с получением диметил 6,6'-((2-(((метилсульфонил)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (0,7 г, 62%) в виде коричневой жидкости.

К раствору трет-бутил (2-меркаптоэтил)карбамата (53 мг, 0,3 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли гидрид натрия (12 мг, 60% в минеральном масле, 0,3 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при

комнатной температуре в течение 10 мин. К реакционной смеси добавляли диметил 6,6'-((2-(((метилсульфонил)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (100 мг, 0,15 ммоль) в DMF (1 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции реакционную смесь гасили насыщенным раствором хлорида аммония и экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Объединенный органический слой промывали водой, соевым раствором, сушили безводным сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ, используя ацетонитрил в воде (0,1% TFA), с получением диметил 6,6'-((2-(((2-аминоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (20 мг, 18%) в виде коричневой жидкости.

К диметил 6,6'-((2-(((2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинату (100 мг, 0,15 ммоль) добавляли холодный раствор HCl в метаноле (2 мл, 4Н) и раствор перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением диметил 6,6'-((2-(((2-аминоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината в виде желтой жидкости (55 мг, 64%).

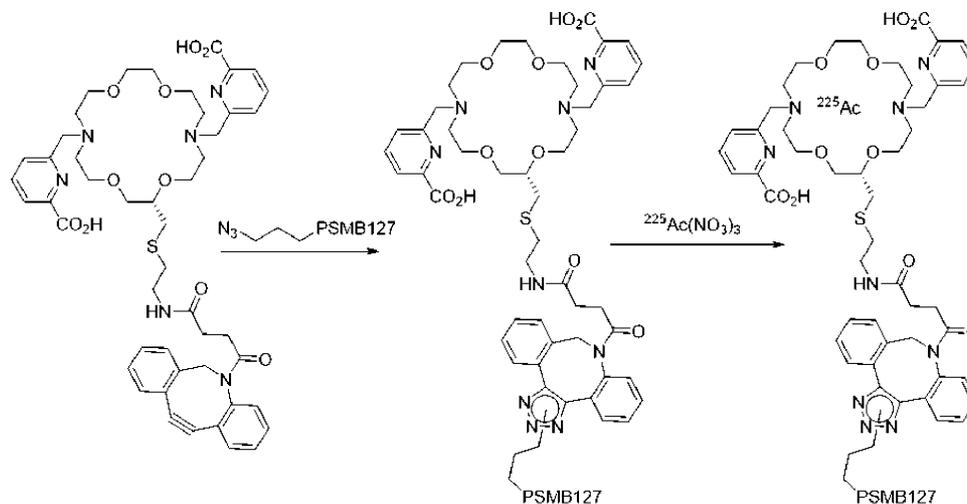
К раствору диметил 6,6'-((2-(((2-аминоэтил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (60 мг, 0,09 ммоль) в дихлорметане (0,5 мл) при 0°C добавляли триэтиламин (0,04 мл, 0,27 ммоль), а затем HATU (51 мг, 0,13 ммоль). После перемешивания раствора в течение 5 мин при 0°C добавляли DBCO-кислоту (27 мг, 0,09 ммоль) в дихлорметане (0,5 мл). Холодную баню удаляли и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. к реакционной смеси добавляли воду и экстрагировали с использованием дихлорметана (2 мл × 3). Объединенные экстракты промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃, соевым раствором, высушивали над сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Хроматография на силикагеле с использованием дихлорметана и метанола привела к получению диметилового эфира H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO (20 мг, 23%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору сложного диметилового эфира H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO (20 мг, 0,02 ммоль) в метаноле (0,5 мл) при комнатной температуре добавляли LiOH в H₂O (0,64 мл, 0,1Н, 0,06 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 16 ч ее нейтрализовали уксусной кислотой до pH=6,5.

Реакционную смесь концентрировали на роторном испарителе при комнатной температуре для удаления летучих растворителей. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO (6 мг, 31%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. ЖХ-МС АРСІ: Рассчитано для C₄₈H₅₆N₆O₁₀S 909,07; Наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 909,4. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 92,92%: 1,86. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 91,56%: 3,87. 1Н-ЯМР (400 МГц, D₂O): δ 7,83 -7,76 (м, 4Н), 7,54-7,17 (м, 10Н), 4,97-4,90 (м, 1Н), 4,80 (с, 4Н), 4,23 (с, 4Н), 3,78-3,42 (м, 18Н), 3,04-3,00 (м, 2Н), 2,51-2,39 (м, 3Н), 2,31-2,29 (м, 2Н), 2,10-2,04 (м, 3Н)

Пример 13. Получение H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO-PSMB127 и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 16. Прямое хелатирование ²²⁵Ac(III) с H2bp18c6-удаленным макроциклом-метилсульфидом-DBCO-PSMB127 (образованным путем клик-реакции H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO с сайт-специфическим азидом PSMB127)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: PSMB127 сайт-селективно модифицировали с помощью 100х молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI)

при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия, pH 3,0, а затем заменяют на 1х dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. 10х молярный избыток H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO вводили в реакцию с сайт-специфическим азид-PSMB127 (DOL=2) в 1х dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азида отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1х dPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 × g. В результате получали специфичный для конечного сайта конъюгат H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO-PSMB127 с CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа -18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

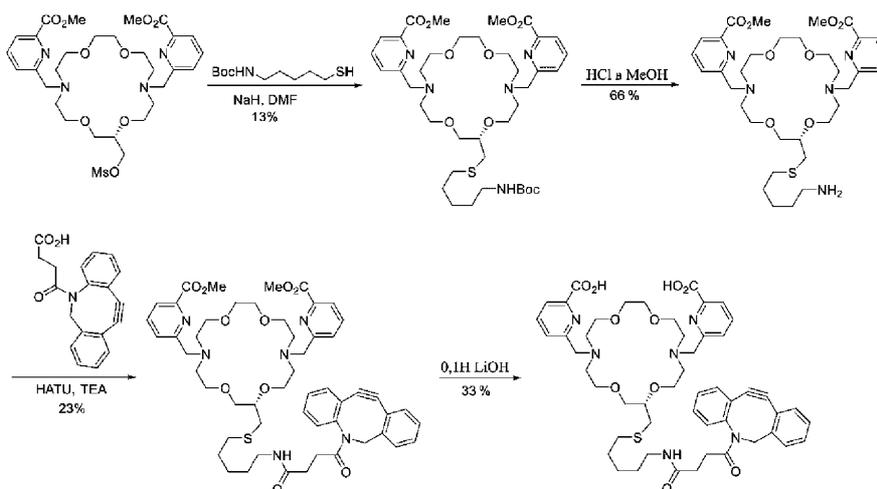
Мечение: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1N HCl, 10 мкл, 0,048 мКи) и H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO-PSMB127 (сайт-специфический, CAR=2, 2,4 мг/мл в буферном растворе PBS, 10 мкл, 24 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: смолу PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл × 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл ×3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; объем введенной пробы: 40 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-DBCO-PSMB127 на УФ-кривой при ВЭЖХ.

Пример 14. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO.
Схема 17



К раствору трет-бутил (5-меркаптопентил)карбамата (65 мг, 0,3 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли гидрид натрия (12 мг, 60% в минеральном масле, 0,3 ммоль) при 0°C. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. К реакционной смеси добавляли диметил 6,6'-((2-(((метилсульфонил)окси)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинат (100 мг, 0,15 ммоль) в DMF (1 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ с использованием ацетонитрила и 0,1% TFA в воде с получением диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-бутоксикарбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (15 мг, 13%) в виде коричневой жидкости.

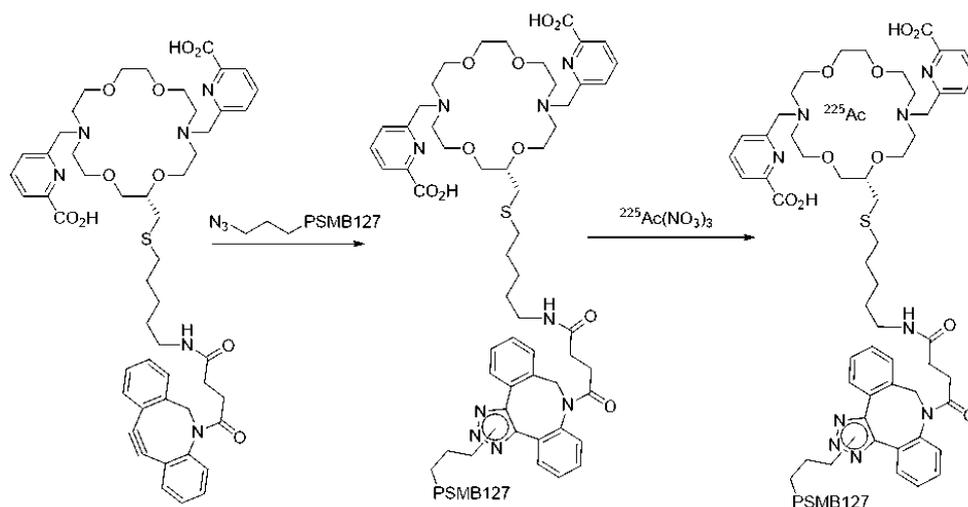
К диметил 6,6'-((2-(((5-((трет-бутоксикарбонил)амино)пентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколинату (120 мг, 0,15 ммоль) добавляли холодный раствор HCl в метаноле (2 мл, 4N) и перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (70 мг, 66%) в виде желтой жидкости.

К раствору диметил 6,6'-((2-(((5-аминопентил)тио)метил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))(S)-дипиколината (50 мг, 0,07 ммоль) в дихлорметане (0,5 мл) при 0°C добавляли триэтиламин (0,03 мл, 0,21 ммоль), а затем HATU (38 мг, 0,10 ммоль). После перемешивания раствора в течение 5 мин при 0°C добавляли DBCO-кислоту (21 мг, 0,07 ммоль) в дихлорметане (0,5 мл). Холодную баню удаляли и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч к реакционной смеси добавляли воду и экстрагировали с использованием дихлорметана (2 мл × 3). Объединенные экстракты промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃, соевым раствором, высушивали над сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Хроматография на силикагеле с использованием дихлорметана и метанола привела к получению диметилового эфира H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO (16 мг, 23%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору сложного диметилового эфира H2bp18с6-удаленного макроцикла пентилсульфида-DBCO (16 мг, 0,01 ммоль) в метаноле (0,5 мл) при комнатной температуре добавляли LiOH в H₂O (0,49 мл, 0,1N, 0,05 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 16 ч ее нейтрализовали уксусной кислотой до pH=6,5. Реакционную смесь концентрировали на роторном испарителе при комнатной температуре для удаления летучих растворителей. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO (5 мг, 33%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. ЖХ-МС АРСИ: рассчитано для C₅₁H₆₂N₆O₁₀S; 951,15; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 951,4. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 94,51%; 1,98. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 98,41%; 4,13. ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O): δ 7,81-7,75 (м, 4H); 7,52-7,17 (м, 10H); 4,97-4,90 (м, 1H); 4,80 (с, 4H); 4,14 (с, 3H); 3,77-3,46 (м, 16H); 3,10 (с, 7H); 2,83-2,80 (м, 2H); 2,55-2,53 (м, 2H); 2,42-2,38 (м, 3H); 2,11-2,08 (м, 3H); 1,39-1,35 (м, 2H); 1,20-1,10 (м, 4H).

Пример 15. Получение H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфид-DBCO-PSMB127 и мечение с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 18. Прямое хелатирование ²²⁵Ac(III) с H2bp18с6-удаленным макроциклопентилсульфидом-DBCO-PSMB127 (образованным путем клик-реакции H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO с сайт-специфическим азидом PSMB127)



Модификация азидом мкАт и клик-реакция: PSMB127 сайт-селективно модифицировали с помощью 100x молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминазой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1x dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. 10x молярный избыток H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO вводили в реакцию с сайт-специфическим азид-PSMB127 (DOL=2) в 1x dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азида отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1xdPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15x в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 × g. В результате получали специфичный для конечного сайта конъюгат H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO-PSMB127 с CAR=2. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 5 мКи/мл в 0,1N HCl, 10 мкл, 0,047 мКи) и H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO-PSMB127 (сайт-специфический, CAR=2, 2,8 мг/мл в буферном растворе PBS, 8 мкл, 22 мкг). После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Очистка: реакционную смесь очищали на колонке PD-10: смолу PD-10 кондиционировали в буферном растворе NaOAc, пропуская через 5 мл × 3 буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) и отбрасывая промывки. Всю реакционную смесь вносили в резервуар колонки, а элюат собирали в предварительно пронумерованные пластиковые пробирки. Реакционную пробирку промывали 0,2 мл × 3 буферным раствором NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5), переносили жидкость после промывки с помощью пипетки в резервуар колонки PD-10 и собирали элюат. В каждой пробирке содержалось ~ 1 мл элюата. Продолжали добавление буфера NaOAc (10 мМ, pH 6-6,5) в резервуар колонки PD-10 до достижения общего объема элюирования 10 мл.

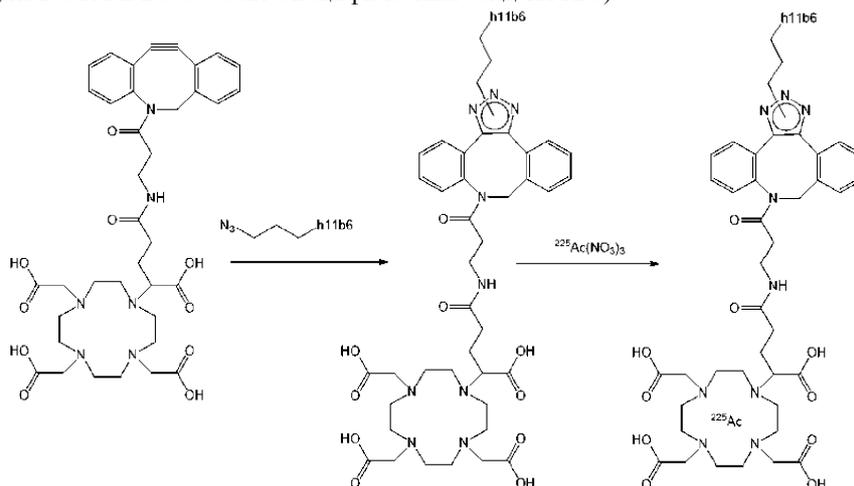
Провокация ДТРА: 10 мкл фракции № 3, собранной из колонки PD-10, смешивали с 15 мкл 10 мМ раствора ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG, проявляли 10 мМ ЭДТА и сушили в течение ночи. Полоски сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях, описанных в настоящем документе, свободный Ac-225 мигрирует с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на отсутствие свободного Ac-225 во фракции № 3.

Анализ ВЭЖХ: фракцию № 3, собранную после колонки PD-10, анализировали методом ВЭЖХ.

Метод ВЭЖХ: колонка Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, 5 мкм; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 20 мин; объем введенной пробы: 40 мкл. После ВЭЖХ фракции собирали через временные интервалы 30 с или 1 мин. Собранные фракции ВЭЖХ оставляли на ночь при комнатной температуре. Радиоактивность в каждой из собранных фракций подсчитывали в гамма-счетчике. Радиокривую ВЭЖХ строили на основе радиоактивности в каждой фракции ВЭЖХ. Радиокривая ВЭЖХ показала радиоактивный пик, соответствующий пику H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-DBCO-PSMB127 на УФ-кривой при ВЭЖХ.

Пример 16. Получение DOTA-DBCO-H11B6 (сайт-специфического) и мечение с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$.

Схема 19. Прямое хелатирование $^{225}\text{Ac(III)}$ с DOTA-H11B6 (сайт-специфический, образованный путем клик-реакции DOTA-DBCO с сайт-специфическим азид-H11B6)

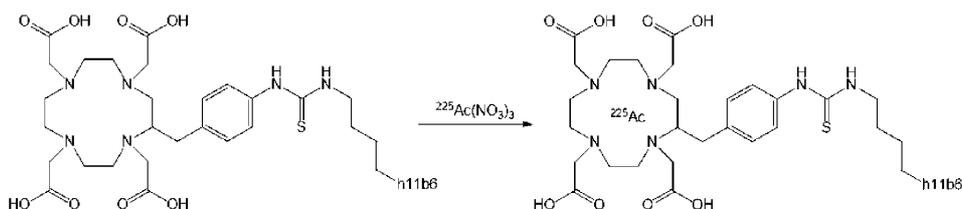


Модификация азидом мкАт и клик-реакция: H11B6 сайт-селективно модифицировали с помощью 200х молярного избытка 3-азидопропиламина и микробной трансглутаминой (MTG; Activa TI) при 37°C. Добавление двух азидов к тяжелым цепям мкАт отслеживали с помощью ESI-TOF ЖХ-МС интактного вещества на приборе Agilent G224. Избыток 3-азидопропиламина и MTG очищали на колонке GE Healthcare MabSelect объемом 1 мл. Азидо-мкАт элюируют из смолы с использованием 100 мМ цитрата натрия pH 3,0, а затем заменяют на 1х dPBS с использованием колонок для обессоливания 7K Zeba. Молярный избыток DOTA-DBCO 10х вводили в реакцию с сайт-специфическим азидом-H11B6 (DOL=1,94) в 1х dPBS при 37°C в течение 1 ч без встряхивания. Завершение клик-реакции DBCO-азид отслеживали с помощью масс-спектрометрии интактного вещества. Избыток свободного хелатора удаляли путем обессоливания конъюгата на колонке для обессоливания Zeba 7K в 1х dPBS с последующими тремя последовательными стадиями разведения и концентрирования 15х в PBS с использованием концентратора 30K MWCO Amicon путем центрифугирования при 3800 × g. В результате получали специфичный для конечного сайта конъюгат DOTA-DBCO-H11B6 с CAR=1,94. При помощи аналитической эксклюзионной хроматографии на колонке Tosoh TSKgel G3000SWxl 7,8 мм × 30 см, размер пор 5 мкм, было подтверждено, что конечный конъюгат является мономерным; температура колонки: комнатная температура; колонку элюировали буфером DPBS (×1, без кальция и магния); скорость потока: 0,7 мл/мин; время анализа - 18 мин; объем введенной пробы: 18 мкл.

Мечение при соотношении H11B6: Ac-225, составляющем 50 : 1: к раствору NaOAc (3M в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли $^{225}\text{Ac(NO}_3)_3$ (~ 10 мКи/мл в 0,1N HCl, 5 мкл) и DOTA-H11B6 (сайт-специфический, CAR=1,94, 2,4 мг/мл в буферном растворе PBS, 12,5 мкл, 30 мкг). Отношение H11B6: Ac-225 составляет 50 : 1. После перемешивания значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°C в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG наблюдался сигнал радиоактивности ~21%, что указывало на хелатирование ~ 79% Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Пример 17. Мечение DOTA-DBCO-H11B6 (случайная конъюгация) с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$ с нацеливанием на различные SA.

Схема 20. Прямое хелатирование $^{225}\text{Ac(III)}$ с DOTA-H11B6 (случайный сайт)



Мечение при соотношении Н11В6: Ас-225, составляющем 880 : 7: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 20 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 5 мкл мКи), DOTA-Н11В6 (случайная конъюгация, CAR~ 2,5, 10 мг/мл в ацетатном буферном растворе 25 мМ, рН 5,5, 50 мкл, 500 мкг) и раствор NaOH (0,1М, 2 мкл). Отношение Н11В6: Ас-225 составляет 880 : 1. После перемешивания значение рН составляло ~6,5 по данным измерения рН-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°С в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ас-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Мечение при соотношении Н11В6: Ас-225, составляющем 440 : 1: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 20 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 5 мкл мКи), DOTA-Н11В6 (случайная конъюгация, CAR ~ 2,5, 10 мг/мл в ацетатном буферном растворе 25 мМ, рН 5,5, 25 мкл, 250 мкг) и раствор NaOH (0,1М, 1 мкл). Отношение Н11В6: Ас-225 составляет 440 : 1. После перемешивания значение рН составляло ~6,5 по данным измерения рН-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°С в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG сигнал радиоактивности не наблюдался, что указывало на полное хелатирование всего Ас-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Мечение при соотношении Н11В6: Ас-225, составляющем 220 : 1: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 20 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 5 мкл мКи), DOTA-Н11В6 (случайная конъюгация, CAR ~ 2,5, 10 мг/мл в ацетатном буферном растворе 25 мМ, рН 5,5, 12,5 мкл, 125 мкг) и раствор NaOH (0,1М, 1 мкл). Отношение Н11В6: Ас-225 составляет 220 : 1. После перемешивания значение рН составляло ~ 6,5 по данным измерения рН-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°С в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG наблюдалось 5% радиоактивного сигнала, что указывало на хелатирование 95% Ас-225 в реакционном растворе через 2 ч.

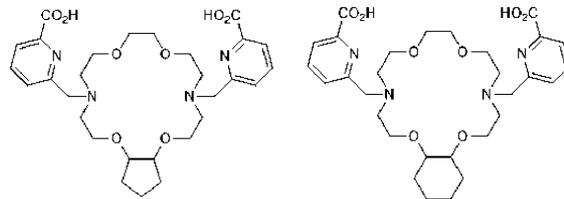
Мечение при соотношении Н11В6: Ас-225, составляющем 110 : 1: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 5 мкл мКи), DOTA-Н11В6 (случайная конъюгация, CAR ~ 2,5, 10 мг/мл в ацетатном буферном растворе 25 мМ, рН 5,5, 6,25 мкл, 62,5 мкг) и раствор NaOH (0,1М, 1 мкл). Отношение Н11В6: Ас-225 составляет 110 : 1. После перемешивания значение рН составляло ~ 6,5 по данным измерения рН-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°С в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG наблюдался 71% радиоактивного сигнала, что указывало на хелатирование 29% Ас-225 в реакционном растворе через 2 ч.

Мечение при соотношении Н11В6: Ас-225, составляющем 55 : 1: к раствору NaOAc (3М в H₂O, 10 мкл) в пластиковом флаконе последовательно добавляли ²²⁵Ac(NO₃)₃ (~ 10 мКи/мл в 0,1Н HCl, 5 мкл мКи), DOTA-Н11В6 (случайный конъюгат, CAR~ 2,5, 10 мг/мл в 25 мМ ацетатном буферном растворе, рН 5,5, 3,13 мкл, 31,3 мкг) и раствор NaOH (0,1М, 1 мкл). Отношение Н11В6: Ас-225 составляет 55 : 1. После перемешивания значение рН составляло ~ 6,5 по данным измерения рН-бумагой. Реакционный раствор оставляли стоять при 37°С в течение 2 ч. Затем 0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. В фронте растворителя iTLC-SG наблюдался сигнал радиоактивности

64%, что указывало на хелатирование 36% Ac-225 в реакционном растворе через 2 ч.

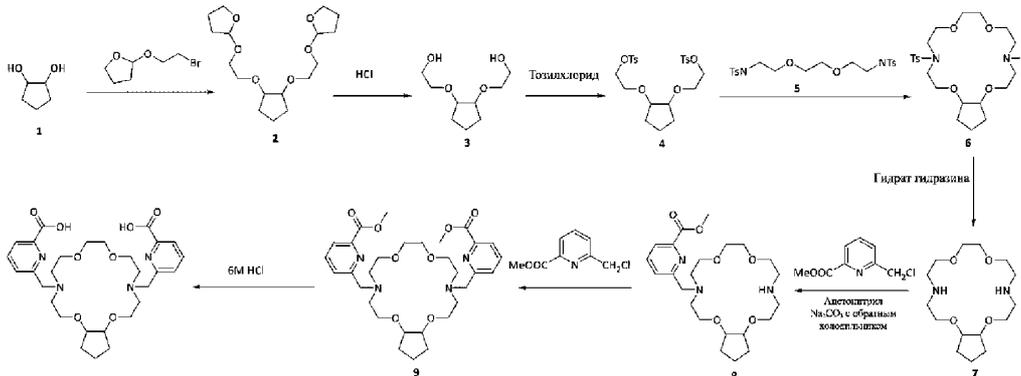
Вывод. Примеры 9, 16 и 17 показали, что хелаторы, содержащие DOTA, обладают более низкой эффективностью хелатирования актиния по сравнению с хелаторами, содержащими H2bp18c6.

Пример 18. Синтез H2bp18c6-цис-циклопентил-конденсированного макроцикла и хелатирование с помощью $^{225}\text{Ac}(\text{III})$



Вышеуказанные производные H2bp18c6 со слиянием кольца на макроциклическом кольце синтезируются по существу в соответствии со схемой 21 ниже:

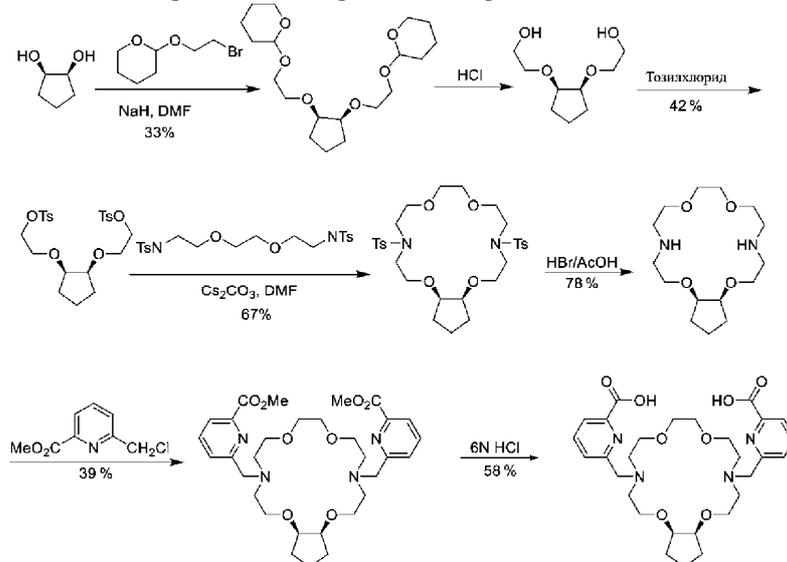
Схема 21. Синтез производных конденсированного кольца H2bp18c6



Линкер для конъюгации с нацеливающим лигандом может быть введен, например, в положение "бензила" путем реакции промежуточного соединения 7 с метил-6-(бром(4-(трет-бутоксикарбонил)фенил)метил)пиридатом, как описано выше в отношении схем 3 и 4. Циклопентан 1,2-диол (соединение 1) можно заменить циклогексаном 1,2-диолом с получением производного H2bp18c6, имеющего слияние циклогексильных колец.

Далее описан синтез конденсированного макроцикла H2bp18c6-цис-циклопентила.

Схема 22. Синтез конденсированного макроцикла H2bp18c6-цис-циклопентила



К суспензии гидроксида натрия (5,63 г, 60% в минеральном масле, 147,05 ммоль) в DMF (30 мл) по каплям добавляли (1R,2S)-циклопентан-1,2-диол (3,0 г, 29,41 ммоль) в DMF (30 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли 2-(2-бромэтокси)тетрагидро-2H-пиран (18,44 г, 88,23 ммоль) в DMF (30 мл). Реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 500 мл). Комбинированный органический слой промывали водой, сушили сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное масло очищали флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), ис-

пользуя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (7R2S)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)этокси)циклопентана (3,5 г, 33%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (1R,2S)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)этокси)циклопентана (3,5 г, 9,77 ммоль) в 100 мл метанола добавляли 1 мл HCl в диоксане, перемешивали при нагревании с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждали и выпаривали с получением 2,2'-(((1R,2S)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) (2,0 г), который использовали на следующей стадии без очистки.

К раствору 2,2'-(((1R,2S)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) 2 (2,0 г, 10,52 ммоль) в дихлорметане (50 мл) и триэтиламине (7,60 мл, 52,63 ммоль) при 10°C порциями добавляли п-толуолсульфонилхлорид (6,0 г, 31,56 ммоль). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. После завершения реакции суспензию разбавляли 200 мл дихлорметана, промывали холодной 1М HCl (3×100 мл), а затем ледяной водой (2 × 100 мл), высушивали над сульфатом натрия и выпаривали с получением твердой смолы. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (((1R,2S)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (2,2 г, 42%) в виде бесцветной жидкости.

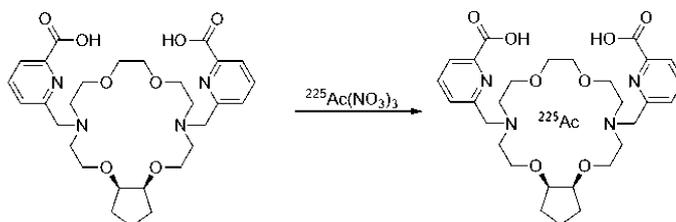
Смесь (((1R,2S)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (2,2 г, 4,42 ммоль) и карбоната цезия (4,32 г, 13,25 ммоль) в 50 мл безводного DMF перемешивали в течение 1,5 ч при температуре окружающей среды. К суспензии по каплям добавляли 1,2-бис(2-(тозил-λ²-азанеил)этокси)этан (2,06 г, 4,42 ммоль) в 50 мл DMF в течение 2 ч. Смесь перемешивали в течение дополнительных 20 ч при температуре окружающей среды. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением твердой пасты. Смесь суспендировали в 200 мл дихлорметана и перемешивали в течение 30 мин. Выпавшее в осадок твердое вещество отфильтровали, фильтрат выпарили при высоком вакууме. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (16aR,19aS)-4,13-дитозилтетрадекагидро-2Н,11Н,17Н-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазаэтилоктадецина (1,8 г, 67%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (16aR,19aS)-4,13-дитозилтетрадекагидро-2Н,11Н,17Н-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазаэтилоктадецина (1,8 г, 2,95 ммоль) в бромоводородной кислоте в уксусной кислоте (50%, 10 мл) при комнатной температуре добавляли фенол (1,38 г, 14,75 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. После завершения реакции ее охлаждали до комнатной температуры, а уксусную кислоту удаляли в высоком вакууме. Остаток очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией, используя 0-100% ацетонитрил в воде (0,1% TFA), с получением (16aR,19aS)-тетрадекагидро-2Н, 11Н, 17Н-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазаэтилоктадецина (0,7 г, 78%) в виде бесцветной жидкости.

Суспензию (16aR,19aS)-тетрадекагидро-2Н, 11Н,17Н-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазаэтилоктадецина (0,7 г, 2,32 ммоль), метил 6-(хлорметил)пиколината (1,73 г, 5,80 ммоль) и карбоната натрия (0,74 г, 6,96 ммоль) в сухом ацетонитриле (10 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-(((16aR,19aS)-тетрадекагидро-4Н,13Н,17Н-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазаэтилоктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,55 г, 39%) в виде коричневой жидкости.

Раствор диметил 6,6'-(((16aR,19aS)-тетрадекагидро-4Н,13Н,17Н-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16] диазаэтилоктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,55 г, 0,92 ммоль) в 6Н хлористоводородной кислоте (5 мл) нагревали при 80°C в течение 5 ч. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением конденсированного макроцикла H2bp18с6-цис-циклопентила (0,3 г, 58%) в виде бесцветного клейкого твердого вещества. ЖХ-МС АРСІ: Рассчитано для C₂₉H₄₀N₄O₈ 572,66; Наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 572,9. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 99,27%: 1,17. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 99,05%: 2,12. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,86-7,84 (м, 4Н), 7,59-7,56 (м, 2Н), 3,80 (с, 4Н), 3,60-3,49 (м, 10Н), 3,44-3,41 (м, 4Н), 2,75-2,68 (м, 8Н), 1,57-1,47 (м, 6Н).

Схема 23. Хелатирование конденсированного макроцикла H2bp18с6-цис-циклопентила с помощью ²²⁵Ac(III)



Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III): в пластиковый флакон последовательно добавляли тетрамети-

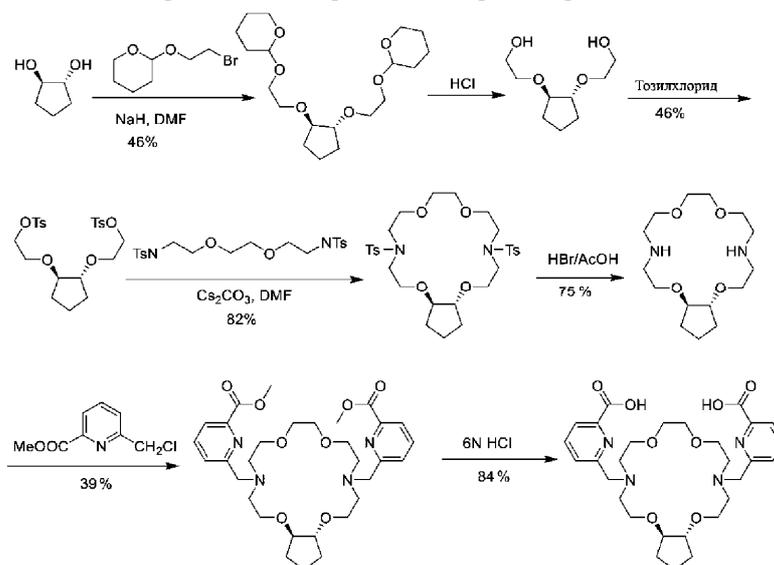
ламмонийацетат (1М, 10 мкл), конденсированный макроцикл H2bp18с6-цис-циклопентила (2 мг/мл в воде, 3 мкл), $^{225}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ в 0,1Н HCl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

Пример 19. Синтез конденсированного макроцикла H2bp18с6-транс-циклопентила и хелатирование $^{225}\text{Ac}(\text{III})$.

Схема 24. Синтез конденсированного макроцикла H2bp18с6-транс-циклопентила



К суспензии гидрида натрия (5,63 г, 60% в минеральном масле, 147,05 ммоль) в DMF (30 мл) по каплям добавляли (1R,2R)-циклопентан-1,2-диол (3,0 г, 29,41 ммоль) в DMF (30 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли 2-(2-бромэтокситетрагидро-2H-пиран (18,44 г, 88,23 ммоль) в DMF (30 мл). Реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 500 мл). Комбинированный органический слой промывали водой, сушили сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное масло очищали флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%) с получением (1R,2R)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)циклопентана (4,8 г, 46%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (1R,2R)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)циклопентана (4,8 г, 13,40 ммоль) в 100 мл метанола добавляли 1 мл HCl в диоксане, перемешивали при нагревании с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждали и выпаривали с получением 2'-(((1R,2R)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) (2,9 г), которое использовали на следующей стадии без очистки.

К 2'-(((1R,2R)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-олу) (2,9 г, 10,52 ммоль) в дихлорметане (50 мл) и триэтилаmine (11,03 мл, 76,31 ммоль) при 10°C порциями добавляли п-толуолсульфонилхлорид (8,70 г, 45,78 ммоль). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. После завершения реакции суспензию разбавляли 200 мл дихлорметана, промывали холодной 1М HCl (3 × 100 мл), а затем ледяной водой (2 × 100), высушивали над сульфатом натрия и выпаривали с получением твердой смолы. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (((1R,2R)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (3,5 г, 46%) в виде бесцветной жидкости.

Смесь (((1R,2R)-циклопентан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (3,5 г, 7,03 ммоль) и карбоната цезия (6,87 г, 21,08 ммоль) в 50 мл безводного DMF перемешивали в течение 1,5 ч при температуре окружающей среды. К суспензии по каплям добавляли 1,2-бис(2-(тозил-λ2-азанеил)этокси)этан ((3,19 г, 7,03 ммоль) в 50 мл DMF в течение 2 ч. Смесь перемешивали в течение до-

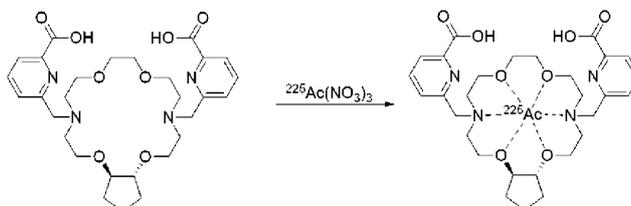
полнительных 20 ч при температуре окружающей среды. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением твердой пасты. Смесь суспендировали в 200 мл дихлорметана и перемешивали в течение 30 мин. Выпавшее в осадок твердое вещество отфильтровали, фильтрат выпарили при высоком вакууме. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (16aR,19aS)-4,13-дитозилтетрадекагидро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (3,5 г, 82%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (16aR,19aS)-4,13-дитозилтетрадекагидро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (3,5 г, 5,73 ммоль) в бромоводородной кислоте в уксусной кислоте (50%, 15 мл) при комнатной температуре добавляли фенол (2,70 г, 28,68 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. После завершения реакции ее охлаждали до комнатной температуры, а уксусную кислоту удаляли в высоком вакууме. Неочищенный материал очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией, используя 0-100% ацетонитрил в воде (0,1% TFA), с получением (16aR,19aS)-тетрадекагидро-2H, 11H, 17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (1,3 г, 75%) в виде бесцветной жидкости.

Суспензию (16aR,19aS)-тетрадекагидро-2H,11H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (1,3 г, 4,30 ммоль), метил-6-(хлорметил)пиколината (1,99 г, 10,76 ммоль) и карбоната натрия (1,37 г, 12,90 ммоль) в сухом ацетонитриле (20 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-(((16aR,19aR)-тетрадекагидро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (1,0 г, 39%) в виде коричневой жидкости.

Раствор диметил 6,6'-(((16aR,19aS)-тетрадекагидро-4H,13H,17H-циклопента[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (1,0 г, 1,66 ммоль) в 6N хлороводородной кислоте (10 мл) нагревали при 80°C в течение 5 ч. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением конденсированного макроцикла H2bp18c6-цис-циклопентила (0,8 г, 84%) в виде бесцветного клейкого твердого вещества. ЖХ-МС APCI: Рассчитано для C₂₉H₄₀N₄O₈ 572,66; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 573,0. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 96,10%: 1,18. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 97,77%: 2,29 1H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 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. Хелатирование конденсированного макроцикла H2bp18c6-транс-циклопентила с помощью ²²⁵Ac(III)



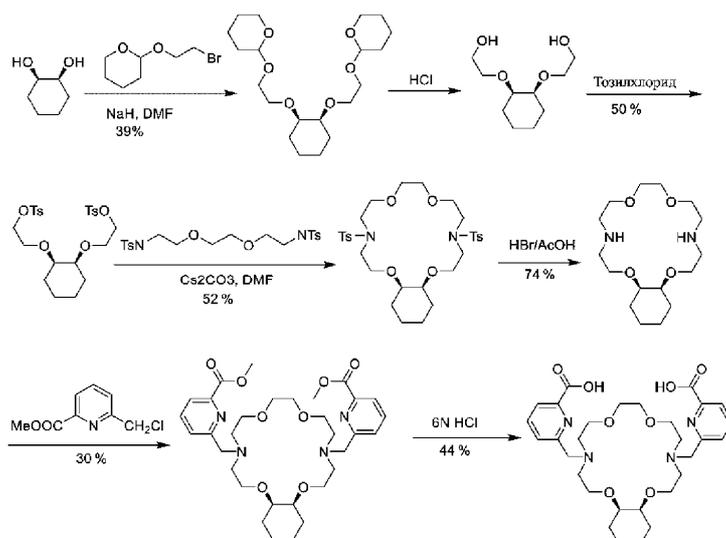
Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III): в пластиковый флакон последовательно добавляли тетраметиламмонийацетат (1M, 10 мкл), сконденсированный макроцикл H2bp18c6-транс-циклопентила (2 мг/мл в воде, 3 мкл), ²²⁵Ac(NO₃)₃ в 0,1N HCl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 mM ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

Пример 20. Синтез конденсированного макроцикла H2bp18c6-цис-циклогексила и хелатирование ²²⁵Ac(III).

Схема 26. Синтез конденсированного макроцикла H2bp18c6-цис-циклогексила



К суспензии гидроксида натрия (3,3 г, 60% в минеральном масле, 86,20 ммоль) в DMF (20 мл) по каплям добавляли (1R,2S)-циклогексан-1,2-диол (2,0 г, 17,24 ммоль) в DMF (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли 2-(2-бромэтокси)тетрагидро-2H-пиран (10,81 г, 51,72 ммоль) в DMF (20 мл). Реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 500 мл). Комбинированный органический слой промывали водой, высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное масло очищали флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (1R,2S)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)циклогексана (2,5 г, 39%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (1R,2S)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)циклогексана (2,5 г, 6,7 ммоль) в 100 мл метанола добавляли 1 мл HCl в диоксане, перемешивали при нагревании с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждали и выпаривали. Неочищенный 2,2'-(((1R,2S)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ол) (1,5 г) использовали на следующей стадии без очистки.

К раствору 2,2'-(((1R,2S)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) (1,5 г, 7,35 ммоль) в дихлорметане (25 мл) и триэтилаmine (5,31 мл, 36,76 ммоль) при 10°C порциями добавляли п-толуолсульфонилхлорид (4,20 г, 22,05 ммоль). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. После завершения реакции суспензию разбавляли 200 мл дихлорметана, промывали холодной 1M HCl (3 × 100 мл), а затем ледяной водой (2 × 100), высушивали над сульфатом натрия и выпаривали с получением твердой смолы. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (((1R,2S)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (1,9 г, 50%) в виде бесцветной жидкости.

Смесь (((1R,2S)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (1,9 г, 3,71 ммоль) и карбоната цезия (3,63 г, 11,13 ммоль) в 50 мл безводного DMF перемешивали в течение 1,5 ч при температуре окружающей среды. К суспензии по каплям добавляли 1,2-бис(2-(тозил-λ²-азанеил)этокси)этан (1,68 г, 3,71 ммоль) в 50 мл DMF в течение периода 2 ч. Смесь перемешивали в течение дополнительных 20 ч при температуре окружающей среды. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением твердой пасты. Смесь суспендировали в 200 мл дихлорметана и перемешивали в течение 30 мин. Выпавшее в осадок твердое вещество отфильтровали, фильтрат выпарили при высоком вакууме. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (16aR,20aS)-4,13-дитозилгексадекагидро-2H, 11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (1,2 г, 52%) в виде бесцветной жидкости.

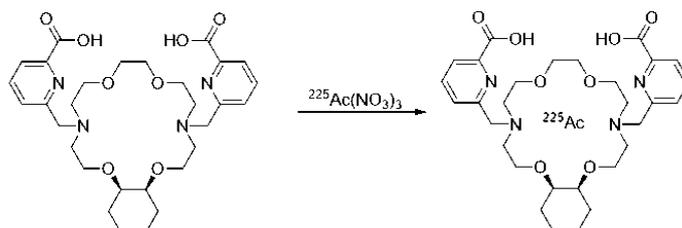
К раствору (16aR,20aS)-4,13-дитозилгексадекагидро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (1,2 г, 1,92 ммоль) в бромистоводородной кислоте в уксусной кислоте (50%, 5 мл) добавляли фенол (0,9 г, 9,61 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. После завершения реакции ее охлаждали до комнатной температуры, а уксусную кислоту удаляли в высоком вакууме. Остаток очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией, используя 0-100% ацетонитрил в воде (0,1% TFA), с получением (16aR,20aS)-гексадекагидро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (0,45 г, 74%) в виде бесцветной жидкости.

Суспензию (16aR,20aS)-гексадекагидро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазациклооктадецина (0,45 г, 1,42 ммоль), метил-6-(хлорметил)пиколината (0,65 г, 3,56 ммоль) и карбоната натрия (0,45

г, 4,26 ммоль) в сухом ацетонитриле (10 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-(((16aR,20aS)-гексадекагидро-4H,13H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диаза-циклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,26 г, 30%) в виде коричневой жидкости.

Раствор диметил 6,6'-(((16aR,20aS)-гексадекагидро-4H,13H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диаза-циклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,26 г, 0,42 ммоль) в 6N. хлористоводородной кислоте (5 мл) нагревали при 80°C в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ с получением продукта H2bp18c6-цис-циклогексил-конденсированного макроцикла (0,11 г, 44%) в виде не совсем белого твердого вещества. ЖХ-МС APCI: Рассчитано для C₃₀H₄₂N₄O₈ 586,69; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 587,0. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 98,15%: 1,31. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 97,78%: 2,32. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 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. Хелатирование конденсированного макроцикла H2bp18c6-цис-циклогексила с помощью ²²⁵Ac(III)



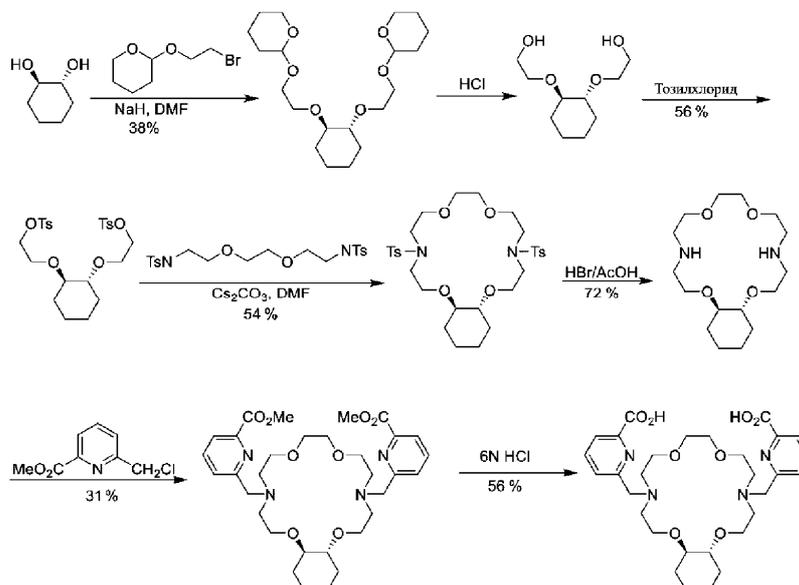
Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III): В пластиковый флакон последовательно добавляли тетраметиламмонийацетат (1M, 10 мкл), конденсированный макроцикл H2bp18c6-цис-циклогексила (2 мг/мл в воде, 3 мкл), ²²⁵Ac(NO₃)₃ в 0,1N HCl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 mM ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

Пример 21. Синтез конденсированного макроцикла H2bp18c6-транс-циклогексила и хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III).

Схема 28. Синтез конденсированного макроцикла H2bp18c6-транс-циклогексила



К суспензии гидроксида натрия (3,3 г, 60% в минеральном масле, 86,20 ммоль) в DMF (20 мл) по каплям добавляли (1R,2R)-циклогексан-1,2-диол (2,0 г, 17,24 ммоль) в DMF (20 мл) при 0°C. Реакционную

смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли 2-(2-бромэтокси)тетрагидро-2H-пиран (10,81 г, 51,72 ммоль) в DMF (20 мл). Реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 500 мл). Комбинированный органический слой промывали водой, высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное масло очищали флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (1R,2R)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)циклогексана (2,45 г, 38%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (1R,2R)-1,2-бис(2-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)циклогексана (2,45 г, 6,5 ммоль) в 100 мл метанола добавляли 1 мл HCl в диоксане, перемешивали при нагревании с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждали и выпаривали. Неочищенный 2,2'-(((1R,2R)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ол) (1,5 г) использовали на следующей стадии без очистки.

К раствору 2,2'-(((1R,2R)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) (1,5 г, 7,35 ммоль) в дихлорметане (25 мл) и триэтиламине (5,31 мл, 36,76 ммоль) при 10°C по частям добавляли п-толуолсульфонилхлорид (4,20 г, 22,05 ммоль). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. Суспензию разбавляли дополнительно 200 мл дихлорметана, промывали холодной 1M HCl (3 × 100 мл), ледяной водой (2 × 100 мл), высушивали над сульфатом натрия и выпаривали с получением твердой смолы. Неочищенный материал очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (((1R,2R)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (2,1 г, 56%) в виде бесцветной жидкости.

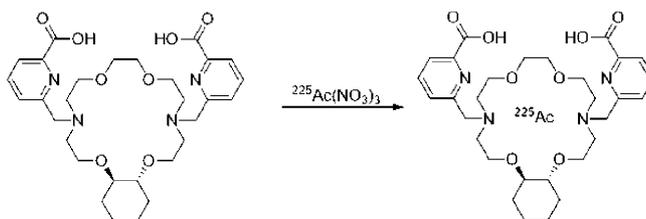
Смесь (((1R,2R)-циклогексан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (2,1 г, 4,1 ммоль) и карбоната цезия (4,01 г, 12,30 ммоль) в 30 мл безводного DMF перемешивали в течение 1,5 ч при температуре окружающей среды. К суспензии по каплям добавляли 1,2-бис(2-(тозил-λ²-азанеил)этокси)этан (1,86 г, 4,1 ммоль) в 30 мл DMF в течение 2 ч. Смесь перемешивали в течение дополнительных 20 ч при температуре окружающей среды. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением твердой пасты. Смесь суспендировали в 200 мл дихлорметана и перемешивали в течение 30 мин. Выпавшее в осадок твердое вещество отфильтровали, фильтрат выпарили при высоком вакууме. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением (16aR,20aR)-4,13-дитозилгексадекагидро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацклооктадецина (1,35 г, 54%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору (16aR,20aR)-4,13-дитозилгексадекагидро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацклооктадецина (1,35 г, 2,16 ммоль) в бромистоводородной кислоте в уксусной кислоте (50%, 5 мл) добавляли фенол (1,01 г, 1,81 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и удаляли уксусную кислоту в высоком вакууме. Остаток очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией, используя 0-100% ацетонитрил в воде (0,1% TFA), с получением (16aR,20aR)-гексадекагидро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацклооктадецина (0,5 г, 72%) в виде бесцветной жидкости.

Суспензию (16aR,20aR)-гексадекагидро-2H,11H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацклооктадецина (0,5 г, 1,58 ммоль), метил-6-(хлорметил)пиколината (0,73 г, 3,95 ммоль) и карбоната натрия (0,5 г, 4,74 ммоль) в сухом ацетонитриле (10 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-(((16aR,20aR)-гексадекагидро-4H,13H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,3 г, 31%) в виде коричневой жидкости.

Раствор диметил 6,6'-(((16aR,20aR)-гексадекагидро-4H,13H-бензо[b][1,4,10,13]тетраокса[7,16]диазацклооктадецин-4,13-диил)бис(метилен))дипиколината (0,3 г, 0,49 ммоль) в 6H хлористоводородной кислоте (5 мл) нагревали при 80 °C в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18с6-транс-циклогексил-конденсированного макроцикла (0,16 г, 56%) в виде беловатого твердого вещества. ЖХ-МС АРСІ: Рассчитано для C₃₀H₄₂N₄O₈ 586,69; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 587,0. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 98,97%: 1,31. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 97,08%: 2,27. 1H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 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. Хелатирование H2bp18с6-транс-циклогексил-конденсированного макроцикла с помощью ²²⁵Ac(III)



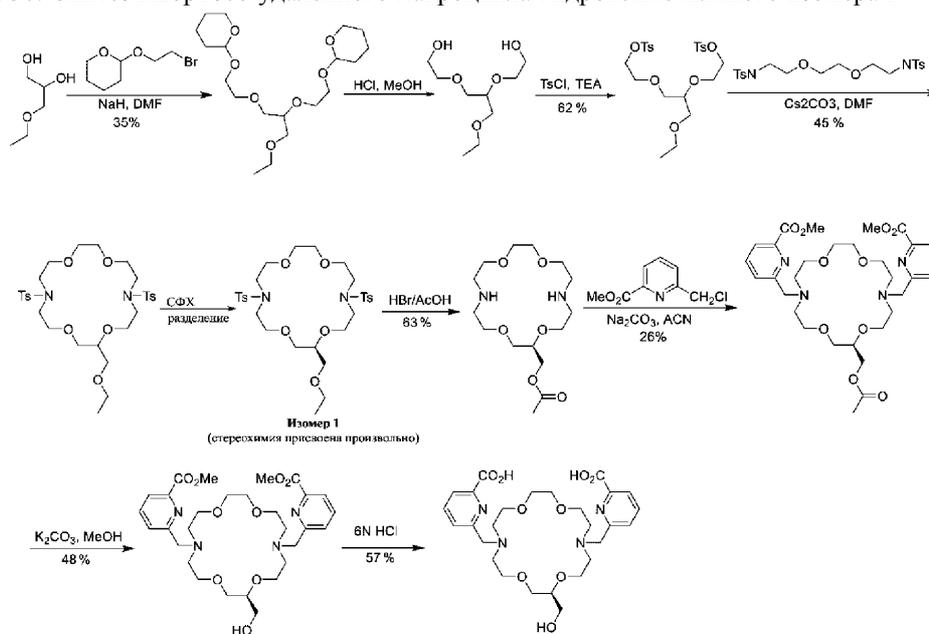
Хелатирование с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$: в пластиковый флакон последовательно добавляли тетраметиламмонийацетат (1М, 10 мкл), H2bp18с6-транс-циклогексил-конденсированный макроцикл (2 мг/мл в воде, 3 мкл), $^{225}\text{Ac(NO}_3)_3$ в 0,1Н НСl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение рН составляло ~6,5 по данным измерения рН-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ас-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ ДТРА (рН 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ас-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ас-225.

Пример 22. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера I и хелатирование $^{225}\text{Ac(III)}$.

Схема 30. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера I



К суспензии гидрида натрия (3,33 г, 60% в минеральном масле, 83,33 ммоль) в DMF (20 мл) по каплям добавляли 3-этоксипропан-1,2-диол (2,0 г, 16,66 ммоль) в DMF (20 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли 2-(2-бромэтокситетрагидро-2Н-пиран) (10,44 г, 49,98 ммоль) в DMF (20 мл). Реакционную смесь позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 500 мл). Комбинированный органический слой промывали водой, высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток масла очищали на силикагеле (230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%) с получением 2,2'-(((3-этоксипропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(окси))бис(тетрагидро-2Н-пирана) (2,2 г, 35%) в виде бесцветной жидкости.

К раствору 2,2'-(((3-этоксипропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(окси))бис(тетрагидро-2Н-пирана) (2,2 г, 5,85 ммоль) в 50 мл метанола добавляли 1 мл НСl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждали и выпаривали. Неочищенный 2,2'-(((3-этоксипропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ол) (1,3 г) использовали на следующей стадии без очистки.

К раствору 2,2'-(((3-этоксипропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-1-ола) (1,3 г, 6,25 ммоль) в дихлорметане (30 мл) и триэтиламине (4,51 мл, 31,25 ммоль) при 10°C порциями добавляли п-толуолсуль-

фонилхлорид (3,56 г, 18,75 ммоль). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. Суспензию разбавляли 200 мл дихлорметана, промывали холодной 1М HCl (3 × 100 мл), ледяной водой (1 × 100 мл), высушивали над сульфатом натрия и выпаривали с получением твердой смолы. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%) для получения ((3-этоксипропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (2,0 г, 62%) в виде бесцветной жидкости.

Смесь ((3-этоксипропан-1,2-диил)бис(окси))бис(этан-2,1-диил) бис(4-метилбензолсульфоната) (2,0 г, 3,87 ммоль) и карбоната цезия (3,79 г, 11,62 ммоль) в 25 мл безводного DMF перемешивали в течение 1,5 ч при температуре окружающей среды. К суспензии по каплям добавляли 1,2-бис(2-(тозил-λ²-азанеил)этокси)этан (1,75 г, 3,87 ммоль) в 25 мл DMF в течение 2 ч. Смесь перемешивали в течение дополнительных 20 ч при температуре окружающей среды. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением твердой пасты. Смесь суспендировали в 200 мл дихлорметана и перемешивали в течение 30 мин. Выпавшее в осадок твердое вещество отфильтровали, фильтрат выпарили при высоком вакууме. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%), с получением 2-(этоксиметил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекана (1,1 г, 45%) в виде бесцветной жидкости. Продукт дополнительно очищали посредством СФХ для разделения двух энантиомеров: изомер-I (0,3 г, 12%) и изомер-II (0,26 г, 11%). Стереохимия изомеров I и II была присвоена произвольно.

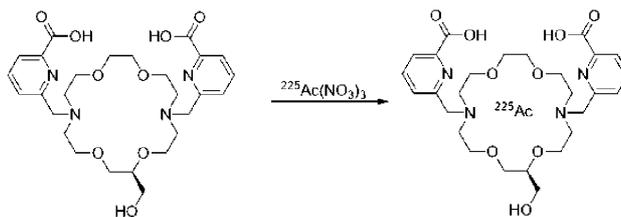
К раствору (S)-2-(этоксиметил)-7,16-дитозил-1,4,10,13 -тетраокса-7,16-диазациклооктадекана (изомер I, 0,3 г, 0,48 ммоль) в бромистоводородной кислоте в уксусной кислоте (50%, 1 мл) при комнатной температуре добавляли фенол (0,22 г, 2,39 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и удаляли уксусную кислоту в высоком вакууме. Остаток очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией, используя 0-100% ацетонитрил в воде (0,1% TFA), с получением (S)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-2-ил)метилацетата (стереохимия, присвоенная произвольно) (0,1 г, 63%) в виде бесцветной жидкости.

Суспензию ацетата (R)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-2-ил)метила (стереохимия, присвоенная произвольно) (100 мг, 0,30 ммоль), метил-6-(хлорметил)пиколината (138 мг, 0,75 ммоль) и карбоната натрия (159 мг, 1,5 ммоль) в сухом ацетонитриле (3 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13 -тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен)-(R)-дипиколината (стереохимия присвоена произвольно) (50 мг, 26%) в виде коричневой жидкости.

К раствору диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен)-(R)-дипиколината (стереохимия, присвоенная произвольно) (50 мг, 0,08 ммоль) в метаноле (1 мл) добавляли карбонат калия (1 мг, 0,008 ммоль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 10 мин. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен)-(S)-дипиколината (стереохимия, присвоенная произвольно) (22 мг, 48%) в виде коричневой жидкости.

Раствор диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен)-(S)-дипиколината (стереохимия, присвоенная произвольно) (22 мг, 0,04 ммоль) в 6Н. хлористоводородной кислоте (0,5 мл) нагревали при 80°C в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18с6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера I (12 мг, 57%) в виде клейкого твердого вещества. ЖХ-МС APCi: Рассчитано для C27H38N4O9 562,62; Наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 562,8. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 96,89%; 1,61. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 96,47%; 1,57. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 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. Хелатирование H2bp18с6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера I с помощью ²²⁵Ac(III)



Хелатирование с помощью ²²⁵Ac(III): в пластиковый флакон последовательно добавляли тетраметилламмонийацетат (1М, 10 мкл), H2bp18с6-удаленный макроцикл-гидроксиметильный изомер I (2 мг/мл в воде, 3 мкл), ²²⁵Ac(NO₃)₃ в 0, 1N HCl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение pH составляло ~6,5 по дан-

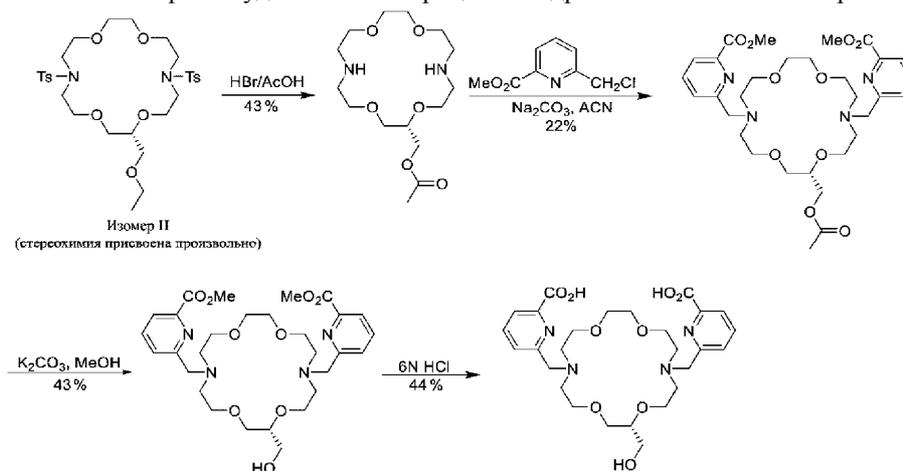
ным измерением pH-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 mM ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 mM ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

Пример 23. Синтез H2bp18c6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера II и хелатирование $^{225}\text{Ac(III)}$.

Схема 32. Синтез H2bp18c6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера II



К раствору (R)-2-(этоксиметил)-7,16-дитозил-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекана (стереохимия, присвоенная произвольно) (изомер II, 0,26 г, 0,42 ммоль) в бромоводородной кислоте в уксусной кислоте (50%, 1 мл) при комнатной температуре добавляли фенол (197 мг, 2,07 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и удаляли уксусную кислоту в высоком вакууме. Остаток очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией, используя 0-100% ацетонитрил в воде (0,1% TFA), с получением (S)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-2-ил)метилацетата (стереохимия, присвоенная произвольно) (0,06 г, 43%) в виде бесцветной жидкости.

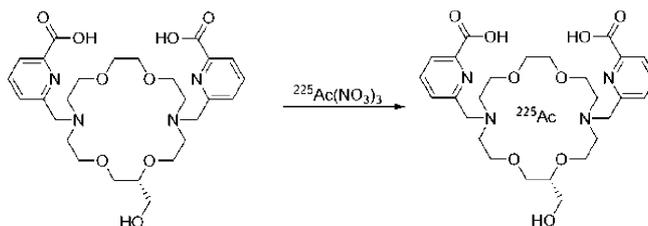
Суспензию ацетата (S)-(1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-2-ил)метила (стереохимия, присвоенная произвольно) (0,06 г, 0,18 ммоль), метил-6-(хлорметил)пиколината (0,083 г, 0,45 ммоль) и карбонат натрия (0,095 г, 0,9 ммоль) в сухом ацетонитриле (3 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%), с получением диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))-(S)-дипиколината (стереохимия, присвоенная произвольно) (0,025 г, 22%) в виде коричневой жидкости.

К раствору диметил 6,6'-((2-(ацетоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))-(S)-дипиколината (стереохимия, присвоенная произвольно) (0,025 г, 0,04 ммоль) в метаноле (0,5 мл) добавляли карбонат калия (0,5 мг, 0,004 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение 10 мин, после чего концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), элюируя градиентом 0-10% метанола в дихлорметане с получением диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))-(R)-дипиколината (0,01 г, 43%) в виде коричневой жидкости.

Раствор диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-диазациклооктадекан-7,16-диил)бис(метилен))дипиколината (0,01 г, 0,02 ммоль) в 6N. хлористоводородной кислоте (0,5 мл) нагревали при 80°C в течение 3 ч. Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18c6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера II (4 мг, 44%) в виде клейкой жидкости. ЖХ-МС APCI: Рассчитано для $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_9$ 562,62; Наблюдаемое m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 562,8. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 96,89%; 6,31. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 93,97%; 6,67. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-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. Хелатирование H2bp18c6-удаленного макроцикла-гидроксиметильного изомера II с по-

мощью $^{225}\text{Ac(III)}$



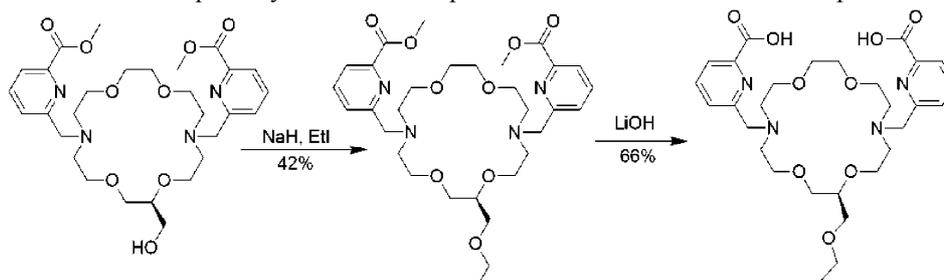
Хелатирование с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$: В пластиковый флакон последовательно добавляли тетраметиламмонийацетат (1М, 10 мкл), H2bp18с6-удаленный макроцикл-гидроксиметильный изомер II (2 мг/мл в воде, 3 мкл), $^{225}\text{Ac(NO}_3)_3$ в 0,1 N HCl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

Пример 24. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера I и хелатирование $^{225}\text{Ac(III)}$.

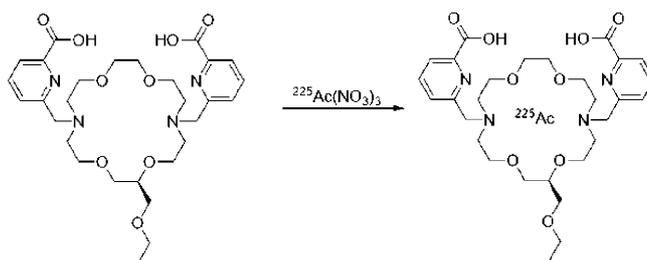
Схема 34. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера I



К перемешанному раствору диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7,16-диил)бис(метиле))((S)-дипиколината (100 мг, 0,17 ммоль) (стереохимия произвольно назначенная) в DMF (2 мл) при 0°C в атмосфере азота медленно добавляли гидрид натрия (10 мг, 60% дисперсия в минеральном масле, 0,25 ммоль). Реакционную смесь оставляли для достижения комнатной температуры и впоследствии перемешивали в течение 10 мин. Реакционную смесь снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли раствор этилийодида (39 мг, 0,25 ммоль, 20 мкл) в DMF (1 мл). Реакционной смеси позволяли достичь комнатной температуры, а затем перемешивали при этой температуре в течение 2 ч. После завершения реакции (отслеживали посредством ЖХМС) реакционную смесь гасили насыщенным раствором NH₄Cl и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические экстракты сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя 5% метанол в дихлорметане в качестве элюента, с получением продукта диметил 6,6'-((2-(этоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7,16-диил)бис(метиле))((S)-дипиколината (стереохимия, произвольно назначенная) (45 мг, 42%) в виде жидкости коричневого цвета.

К перемешанному раствору диметил 6,6'-((2-(этоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7,16-диил)бис(метиле))((S)-дипиколината (45 мг, 0,07 ммоль) (стереохимия, произвольно назначенная) в THF (0,25 мл), воде (0,5 мл) и метаноле (0,25 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (9 мг, 0,21 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. После завершения реакции (отслеживали посредством СВЭЖХ-МС) pH реакционной смеси доводили до 3-4 с использованием 1,5М водного раствора HCl и концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера I (28 мг, 66%) в виде клейкой жидкости. ЖХ-МС АРСІ: Рассчитано для C₂₉H₄₂N₄O₉ 590,30; Наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 591,2. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 99,59%: 1,19. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 96,12%: 2,01. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) 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 Hz, 3H).

Схема 35. Хелатирование H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера I с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$



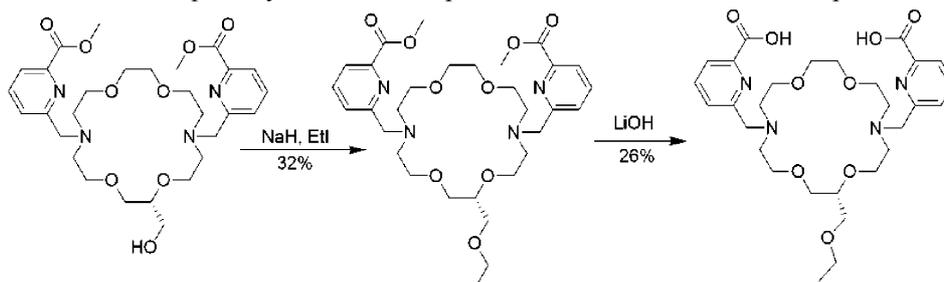
Хелатирование с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$: в пластиковый флакон последовательно добавляли тетраметиламмонийацетат (1М, 10 мкл), H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера I (1 мг/мл в воде, 1 мкл), $^{225}\text{Ac(NO}_3)_3$ в 0,1N HCl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

Пример 25. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера II с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$.

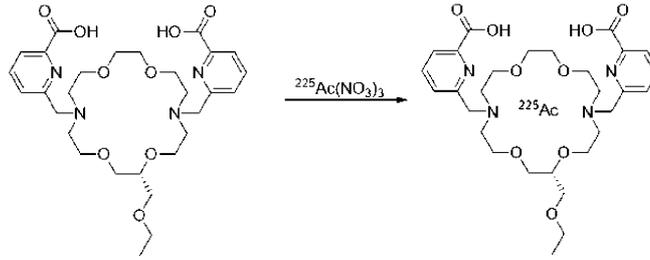
Схема 36. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера II



К перемешанному раствору диметил 6,6'-((2-(гидроксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7,16-диил)бис(метиле))((R)-дипиколината (стереохимия произвольно назначенная) (60 мг, 0,1 ммоль) в DMF (1,5 мл) при 0°C в атмосфере азота медленно добавляли гидрид натрия (6 мг, 60% дисперсия в минеральном масле, 0,15 ммоль). Реакционную смесь оставляли для достижения комнатной температуры и впоследствии перемешивали в течение 10 мин. Реакционную смесь снова охлаждали до 0°C и по каплям добавляли раствор этилйодида (23 мг, 0,15 ммоль, 12 мкл) в DMF (0,5 мл). Реакционной смеси позволяли достичь комнатной температуры, а затем перемешивали при этой температуре в течение 2 ч. После завершения реакции (отслеживали посредством ЖХМС) реакционную смесь гасили насыщенным раствором NH₄Cl и экстрагировали этилацетатом. Затем комбинированные органические экстракты сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя 5% метанол в дихлорметане в качестве элюента, с получением диметил 6,6'-((2-(этоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7,16-диил)бис(метиле))((R)-дипиколината (стереохимия, произвольно назначенная) (20 мг, 32%) в виде жидкости коричневого цвета.

К перемешиваемому раствору диметил 6,6'-((2-(этоксиметил)-1,4,10,13-тетраокса-7,16-дизациклооктадекан-7,16-диил)бис(метиле))((R)-дипиколината (стереохимия, произвольно назначенная) (20 мг, 0,03 ммоль) в THF (0,1 мл), воде (0,25 мл) и метаноле (0,1 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (4 мг, 0,09 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. После завершения реакции (отслеживали посредством СВЭЖХ-МС) pH реакционной смеси довели до 3-4 с использованием 1,5М водного раствора HCl и концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера II (5 мг, 26%) в виде клейкой жидкости. ЖХ-МС APCI: Рассчитано для C₂₉H₄₂N₄O₉ 590,30; Наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 591,3. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 99,28%; 1,199. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 97,60%; 2,01. 1H ЯМР, 1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 13,40 (с, 1H), 9,72 (с, 1H), 8,16-8,00 (м, 4H), 7,80-7,77 (м, 2H), 4,69 (с, 4H), 4,34-3,38 (м, 28H), 1,06 (т, J=6,80 Гц, 3H).

Схема 37. Хелатирование H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера II с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$



Хелатирование с помощью $^{225}\text{Ac(III)}$: в пластиковый флакон последовательно добавляли тетраметилламмонийацетат (1М, 10 мкл), H2bp18с6-удаленного макроцикла-этоксиметильного изомера 11 (1 мг/мл в воде, 1 мкл), $^{225}\text{Ac(NO}_3)_3$ в 0,1N HCl (10 мКи/мл, 3 мкл, 30 мКи). Значение pH составляло ~6,5 по данным измерения pH-бумагой. Флакон нагревали при 37°C в течение 2 ч.

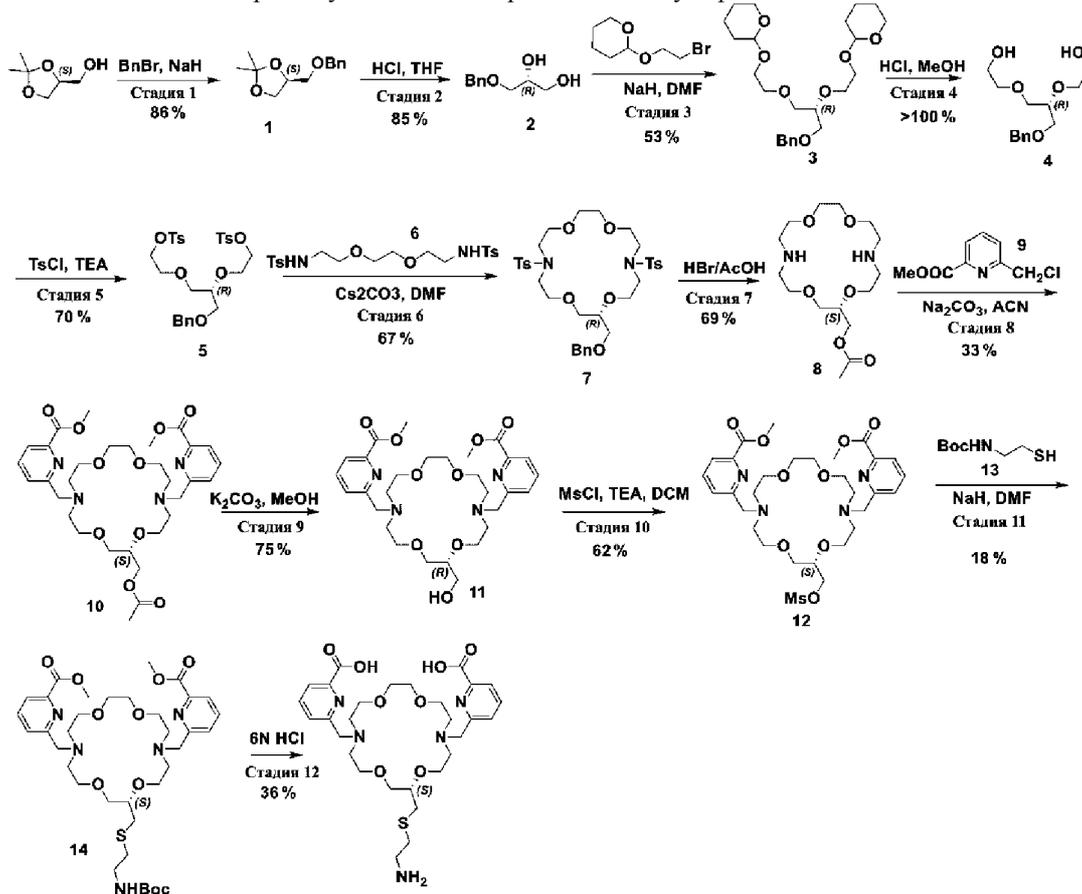
0,5 мкл реакционной смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА.

Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

0,5 мкл реакционной смеси смешивали с 15 мкл 10 мМ ДТРА (pH 6,5) и инкубировали в течение 30 мин. 10 мкл смеси наносили на iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенную полоску iTLC сканировали через 20 ч на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. iTLC показала 99% хелатирование Ac-225.

Пример 26. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-NCS.

Схема 38. Синтез H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфидамина



Стадия 1: гидрид натрия (18,16 г, 60% в минеральном масле, 454 ммоль) добавляли к раствору (S)-(+)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанола (50 г, 378 ммоль) в безводном DMF (500 мл) при 0°C. После перемешивания при этой температуре в течение 10 мин к этой суспензии медленно добавляли бензилбромид (77,63 г, 454 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение дополнительных 8 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным раствором хлорида аммония и экстрагировали дихлорметаном (2 × 500 мл). Комбинированный органический слой промывали солевым раствором и высушивали над сульфатом натрия. После удаления растворителя остаток

очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя петролейный эфир и этилацетат, с получением соединения 1 (72 г, 86%) в виде бесцветной жидкости.

Стадия 2: соединение 1 (72 г, 324 ммоль) растворяли в THF (100 мл), добавляли воду. HCl (1,5 N, 100 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (500 мл) и нейтрализовали 10% раствором бикарбоната натрия. Раствор экстрагировали этилацетатом (2 × 500 мл), а комбинированные органические слои промывали водой, соевым раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя петролейный эфир и этилацетат, с получением соединения 2 (51 г, 85%) в виде бесцветной жидкости.

Стадия 3: к суспензии гидрида натрия (26,29 г, 60% в минеральном масле, 686 ммоль) в DMF (20 мл) по каплям добавляли соединение 2 (25,0 г, 137 ммоль) в DMF (100 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 2 ч при комнатной температуре. Смесь снова охлаждали до 0°C, добавляли по каплям 2-(2-бромэтокситетрагидро-2Н-пиран ((85,89 г, 411 ммоль) в DMF (100 мл). Реакционной смеси позволяли прогреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакцию гасили с использованием насыщенного раствора хлорида аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 300 мл). Комбинированный органический слой промывали водой, высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенное масло очищали флэш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%). Получали продукт 3 (32 г, 53%) в виде бесцветной жидкости.

Стадия 4. К раствору соединения 3 (32 г, 73,05 ммоль) в 500 мл метанола добавили 5 мл HCl в диоксане, перемешивали при нагревании с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждали и выпаривали. Неочищенный материал 4 (20 г) использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия 5: соединение 4 (20 г, 74,07 ммоль) растворили в дихлорметане (250 мл) и триэтиламине (53 мл, 370 ммоль). Раствор охлаждали до 10°C и частями добавляли твердый р-толуолсульфонилхлорид (42,20 г, 222 ммоль). Смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. После завершения реакции суспензию дополнительно разбавляли 1000 мл дихлорметана, промывали холодной водой. HCl (1M, 3 × 200 мл), ледяную воду (2 × 200 мл) сушили сульфатом натрия и выпаривали с получением твердой камеди. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%). Получали продукт 5 (30 г, 70%) в виде бесцветной жидкости.

Стадия 6: смесь соединения 5 (30 г, 51,9 ммоль) и карбоната цезия (50,76 г, 155,7 ммоль) в 200 мл сухого DMF перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1,5 ч. К суспензии по каплям добавили соединение 6 (23,56 г, 51,9 ммоль) в 200 мл DMF в течение 2 ч. Смесь перемешивали в течение дополнительных 20 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением твердой пасты. Смесь суспендировали в 1000 мл дихлорметана и перемешивали в течение 30 мин. Выпавшее в осадок твердое вещество отфильтровали, фильтрат выпарили при высоком вакууме. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя этилацетат в петролейном эфире (0-40%). Получали продукт 7 (24 г, 67%) в виде бесцветной жидкости.

Стадия 7: к раствору соединения 7 (24 г, 34,78 ммоль) в бромистоводородной кислоте (50% в уксусной кислоте, 100 мл) при комнатной температуре добавляли фенол (16,35 г, 174 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, уксусную кислоту удаляли в высоком вакууме. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой колоночной очисткой с использованием ацетонитрила и 0,1% TFA в воде с получением соединения 8 (8,0 г, 69%) в виде бесцветной жидкости.

Стадия 8: суспензию соединения 8 (8,0 г, 23,95 ммоль), соединения 9 (11,07 г, 59,88 ммоль) и карбоната натрия (12,69 г, 119,75 ммоль) в сухом ацетонитриле (100 мл) выдержали при температуре 90°C в течение 16 ч. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через слой целита и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали флэш-хроматографией (силикагель, 230-400 меш), используя метанол в дихлорметане (0-10%). Получали продукт 10 (5,0 г, 33%) в виде коричневой жидкости.

Стадия 9: к раствору соединения 10 (5,0 г, 7,91 ммоль) в метаноле (50 мл) добавили карбонат калия (0,11 г, 0,79 ммоль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 10 мин. После завершения реакции ее концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (230-400 меш) с элюированием градиентом 0-10% метанола в дихлорметане. Получали продукт 11 (3,5 г, 75%) в виде коричневой жидкости.

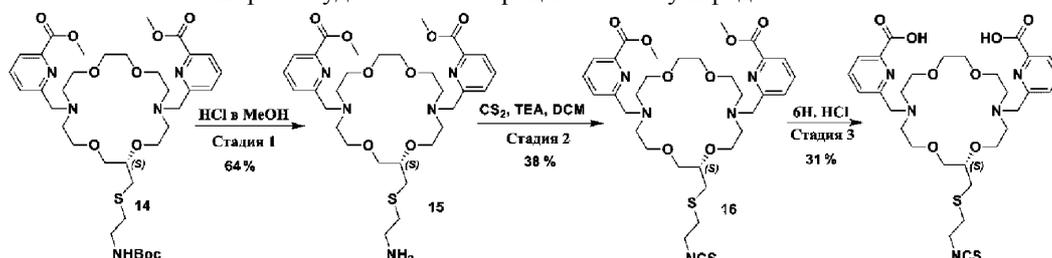
Стадия 10: к раствору соединения 11 (1,0 г; 1,7 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли триэтиламин (0,51 г; 0,70 мл; 5,1 ммоль). К этому раствору по каплям добавляли мезилхлорид (0,39 г, 0,26 мл, 3,4 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь концентрировали и неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (оксид алюминия - нейтральный), используя метанол в дихлорметане (1-2%) в качестве элюента, с получением соединения 12 (0,7 г, 62%) в виде

коричневой жидкости.

Стадия 11: к раствору соединения 13 (53 мг, 0,3 ммоль) в DMF (2 мл) добавили гидрид натрия (12 мг, 60% в минеральном масле, 0,3 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. К реакционной смеси добавили соединение 12 (100 мг, 0,15 ммоль) в DMF (1 мл) при температуре 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции реакционную смесь гасили насыщенным раствором хлорида аммония и экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл). Объединенный органический слой промывали водой, соевым раствором, сушили безводным сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с использованием ацетонитрила и 0,1% TFA в воде с получением соединения 14 (20 мг, 18%) в виде коричневой жидкости.

Стадия 12: раствор соединения 14 (20 мг, 0,02 ммоль) в 6N хлористоводородной кислоте (0,5 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением продукта H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфидного амина (6 мг, 36%) в виде клейкого твердого вещества. ЖХ-МС АРСІ: Рассчитано для C₂₉H₄₃N₅O₈S 621,75; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 622,2. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 97,94%: 1,38. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 94,11%: 2,94. ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 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-удаленного макроцикла-этилсульфида-NCS

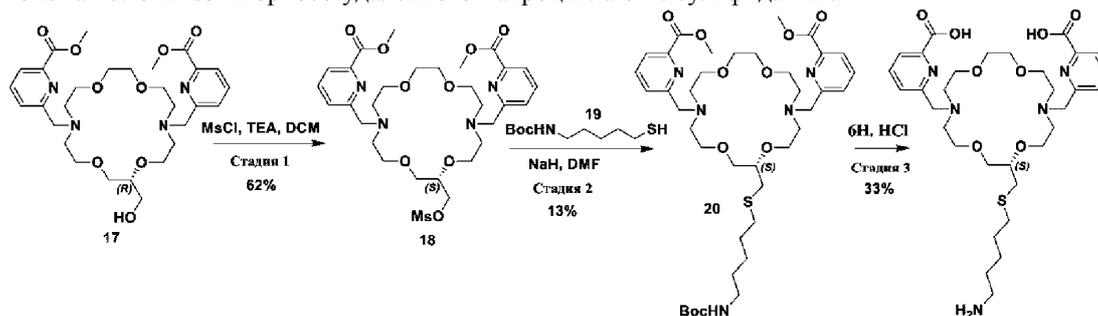


Стадия 1: к соединению 14 (100 мг, 0,15 ммоль) добавили холодный раствор HCl в метаноле (2 мл, 4Н.) и перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь сконцентрировали при пониженном давлении с получением соединения 2 в виде желтой жидкости (55 мг, 64%).

Стадия 2: к раствору соединения 15 (50 мг, 0,08 ммоль) и триэтиламина (24 мг, 0,24 ммоль) в сухом дихлорметане (2 мл) в сосуде под давлением добавили дисульфид углерода (12 мг, 0,16 ммоль). Флакон подвергали воздействию микроволнового излучения (мощность 150 В) при 90°C в течение 30 мин. После этого реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (10 мл), промывали последовательно водой (5 мл), 1M HCl (5 мл), водой (5 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. После концентрирования сырой продукт очистили флеш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя в качестве элюента 0-10% метанол в дихлорметане, и получили соединение 16 (20 мг, 38%) в виде твердого вещества желтого цвета.

Стадия 3: раствор соединения 16 (20 мг, 0,03 ммоль) в хлористоводородной кислоте (6N 0,5 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфида-NCS (6 мг, 31%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС АРСІ: рассчитано для C₃₀H₄₁N₅O₈S₂: 663,81; наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 664,2. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 99,94%: 1,41. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 98,77%: 2,76. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 9,78 (с, 1H); 8,10 (с, 4H); 7,78 (д, J=6,00 Гц, 2H); 4,69 (с, 4H); 3,96-3,52 (м, 23H); 2,85 (т, J=6,40 Гц, 2H); 2,70 (т, J=8,00 Гц, 2H).

Схема 40. Синтез H2bp18c6-удаленного макроцикла-этилсульфидамина



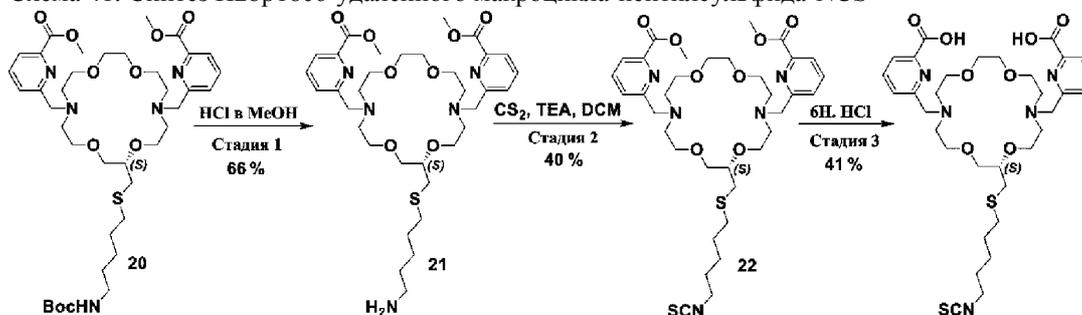
Стадия 1: к раствору соединения 17 (1,0 г; 1,7 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли триэтиламин (0,51 г; 0,70 мл; 5,1 ммоль). К этому раствору по каплям добавляли мезилхлорид (0,39 г, 0,26 мл, 3,4

ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь концентрировали и остаток очищали колоночной хроматографией (оксид алюминия - нейтральный), используя метанол в дихлорметане (1-2%) в качестве элюента, с получением соединения 18 (0,7 г, 62%) в виде коричневой жидкости.

Стадия 2: к раствору соединения 19 (65 мг, 0,3 ммоль) в DMF (2 мл) добавили гидрид натрия (12 мг, 60% в минеральном масле, 0,3 ммоль) при 0°C. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. К реакционной смеси добавили соединение 18 (100 мг, 0,15 ммоль) в DMF (1 мл) при температуре 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ с использованием ацетонитрила и 0,1% TFA в воде с получением соединения 20 (15 мг, 13%) в виде коричневой жидкости.

Стадия 3: раствор соединения 20 (15 мг, 0,02 ммоль) в хлористоводородной кислоте (6Н., 0,5 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ с получением продукта H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфидамина (4 мг, 33%) в виде клейкой жидкости. ЖХ-МС АРСІ: Рассчитано для C₃₂H₄₉N₅O₈S 663,83; Наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 664,2. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 90,31%; 1,43. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 90,69%; 3,11. ¹Н ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 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 H2bp18с6-удаленного макроцикла-пентилсульфида-NCS



Стадия 1: к соединению 20 (120 мг, 0,15 ммоль) добавили холодный раствор HCl в метаноле (2 мл, 4N) и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь сконцентрировали при пониженном давлении с получением соединения 21 в виде желтой жидкости (70 мг, 66%).

Стадия 2: к раствору соединения 21 (70 мг, 0,1 ммоль) и триэтиламина (20 мг, 0,2 ммоль) в сухом дихлорметане (2 мл) в сосуде под давлением добавили дисульфид углерода (15 мг, 0,2 ммоль). Флакон подвергали воздействию микроволнового излучения (мощность 150 В) при 90°C в течение 30 мин. После этого реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (10 мл), промывали последовательно водой (5 мл), 1M HCl (5 мл), водой (5 мл) и высушивали над безводным сульфатом натрия. После концентрирования сырой продукт очистили флеш-хроматографией на силикагеле (230-400 меш), используя в качестве элюента 0-10% метанол в дихлорметане, и получили соединение 22 (30 мг, 40%) в виде твердого вещества желтого цвета.

Стадия 3: раствор соединения 22 (30 мг, 0,04 ммоль) в хлористоводородной кислоте (6Н, 0,5 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ с получением H2bp18с6-удаленного макроцикла-этилсульфида-NCS (12 мг, 41%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС АРСІ: Рассчитано для C₃₃H₄₇N₅O₈S₂: 705,89; Наблюдаемое m/z [M+H]⁺ 706,2. Чистота по ЖХ-МС: ВУ 99,33%; 1,58. Чистота по ВЭЖХ: ВУ 98,92%; 2,76. ¹Н ЯМР 1Н-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 13,40 (с, 1Н); 9,90 (с, 1Н); 8,17-8,09 (м, 4Н); 7,78 (д, J=6,80 Гц, 2Н); 4,70 (с, 4Н); 3,93-3,17 (м, 27Н); 2,68-2,67 (м, 2Н); 1,64-1,60 (м, 2Н); 1,53-1,49 (м, 2Н); 1,40-1,38 (м, 2Н).

Пример 26. Свойства радиоактивного иммуноконъюгата.

В табл. 1 обобщена эффективность хелатирования радиоактивных иммуноконъюгатов, полученных в примерах.

Таблица 1. Сводные данные по эффективности хелатирования

Название	Эффективность хелатирования перед добавлением ДТРА	Эффективность хелатирования после добавления ДТРА	Хелатор: Соотношение Ас-225
H2bp18с6-бензилфенил-DBCO IgG4	99%	-	100 : 1
H2bp18с6-бензилфенил-DBCO PSMB127	99%	-	100 : 1
H2bp18с6-бензилфенил-DBCO пертузумаб	99%	96%	100 : 1
H2bp18с6-бензилфенил-DBCO цетуксимаб	99%	> 95%	100 : 1
H2bp18с6-бензилфенил-DBCO герцептин	99%	> 93%	100 : 1
H2bp18с6-бензилфенил-DBCO панитумума	99%	> 85%	100 : 1
H2bp18с6-бензилфенил-DBCO H11B6	99%	97%	91 : 1
H2bp18с6-бензилфенил-BCN PSMB127	99%	97%	100 : 1
H2bp18с6-удаленный макроцикл-этилсульфид-DBCO PSMB127	99%	94%	80 : 1
H2bp18с6-удаленный макроцикл-пентилсульфид-DBCO PSMB127	99%	97%	76 : 1
DOTA-H11B6 (сайт-специфичный)	79%		100 : 1
DOTA-H11B6 (неупорядоченный сайт)	36%		130 : 1

Стабильность четырех конъюгатов ²²⁵Ас-хелатор-мкАт в сыворотке человека измеряют в соответст-

вии со следующим способом:

- ²²⁵Ac-H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-PSMB127
- ²²⁵Ac-H2bp18c6-удаленный макроцикл-этилсульфид-DBCO-PSMB127
- ²²⁵Ac-H2bp18c6-удаленный макроцикл-пентилсульфид-DBCO-PSMB127
- ²²⁵Ac-H2bp18c6-бензилфенил-BCN-PSMB127.

К каждому раствору объединенной человеческой сыворотки (BioIVT) объемом 900 мкл добавляли 100 мкл ~300 мкКи/мг одного из четырех конъюгатов. Отдельный раствор конъюгата перемешивают и затем собирают 10 мкл в несколько точек времени в течение семи дней. Каждую пробу объемом 10 мкл переносят в отдельный пластиковый флакон, содержащий 30 мкл 50 мМ DTPA, и оставляют стоять еще 5 минут при комнатной температуре. Собирали 10 мкл смеси, а затем помещали в iTLC-SG и проявляли 10 мМ ЭДТА. Высушенные полоски iTLC-SG оставляли на ночь при комнатной температуре, после чего сканировали на сканере для тонкослойной радиохроматографии Bioscan AR-2000. В условиях элюирования, описанных в настоящем документе, любой свободный Ac-225 будет мигрировать с растворителем во фронт растворителя. Данные стабильности приведены в табл. 2.

Таблица 2

²²⁵ Ac Конъюгат	Структура	Сутки исследования	Стабильность
²²⁵ Ac H2bp18c6-бензилфенил-DBCO-PSMB127		14	Стабильная
²²⁵ Ac H2bp18c6-удаленный макроцикл-этилсульфид-DBCO-PSMB127		7	Стабильная
²²⁵ Ac H2bp18c6-удаленный макроцикл-пентилсульфид-DBCO-PSMB127		7	Стабильная
²²⁵ Ac H2bp18c6-бензилфенил-BCN-PSMB127		7	Стабильная

Пример 27. Анализы связывания с радиоактивным иммуноконъюгатом.

Клеточное связывание модифицированных азидом антител и модифицированных азидом антител, конъюгированных с хелатором или комплексом радиоактивного металла изобретения, сравнивают с исходным антителом. Клетки, экспрессирующие антиген-мишень антитела, инкубируют с исходным антителом, модифицированным азидом антителом или конъюгированным антителом, разведенным в буфере, а затем анализируют на связывание с клетками посредством проточной цитометрии.

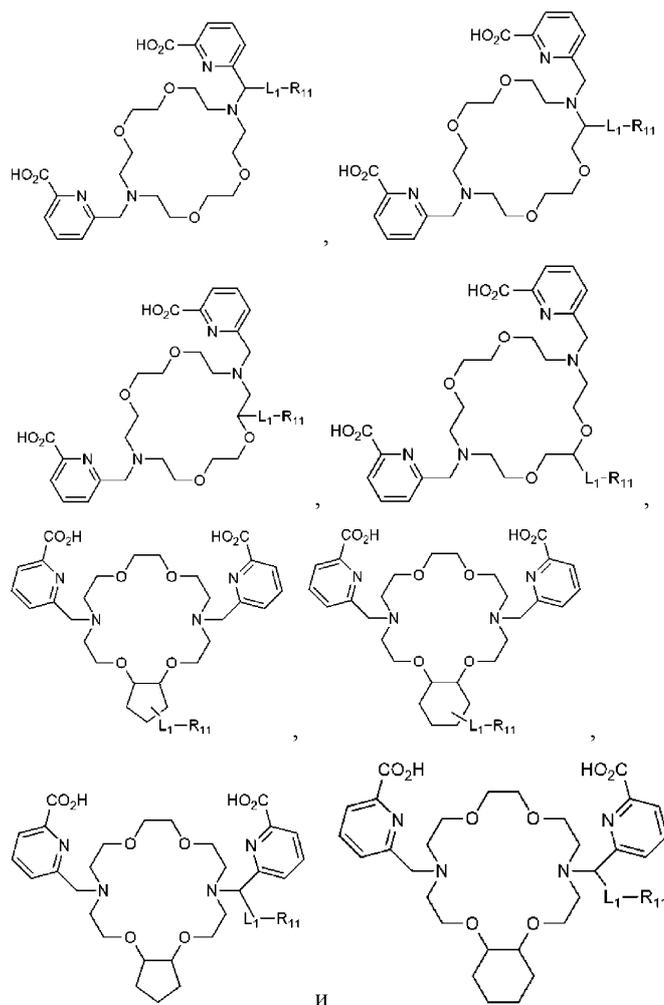
Следует понимать, что описанные в настоящем документе примеры и варианты осуществления приведены исключительно для целей иллюстрации и что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отступления от широкой концепции изобретения. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сущности и объема изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения.

Ссылки

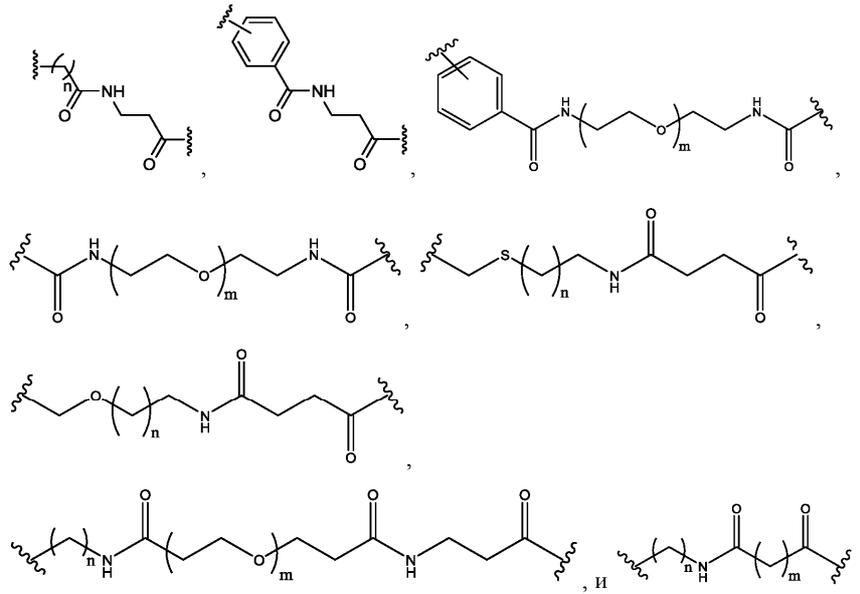
1. WO 2018/183906
2. Thiele et al. «An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy» *Angew. Chem. Int. Ed.* (2017) 56, 14712-14717.
3. Roca-Sabio et al. «Macrocyclic Receptor Exhibiting Unprecedented Selectivity for Light Lanthanides» *J. Am. Chem. Soc.* (2009) 131, 3331-3341.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Хелатор, выбранный из группы, состоящей из



где L₁ отсутствует или представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6;

R_{11} представляет собой $-NH_2$, $-NCS$, $-NCO$, $-N_3$, алкинил, циклоалкинил, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, или R_{11} содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

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

где алкил представляет собой метил, этил, пропил, бутил или пентил;

циклоалкинил представляет собой циклоалкильную группу, содержащую от 8 до 10 атомов углерода и содержащую по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода;

алкинил определяется как алкильная группа, имеющая от 2 до 10 атомов углерода и содержащая по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода; и

ацилгалогенид относится к фрагменту $-C(O)X$, где X представляет собой галоген.

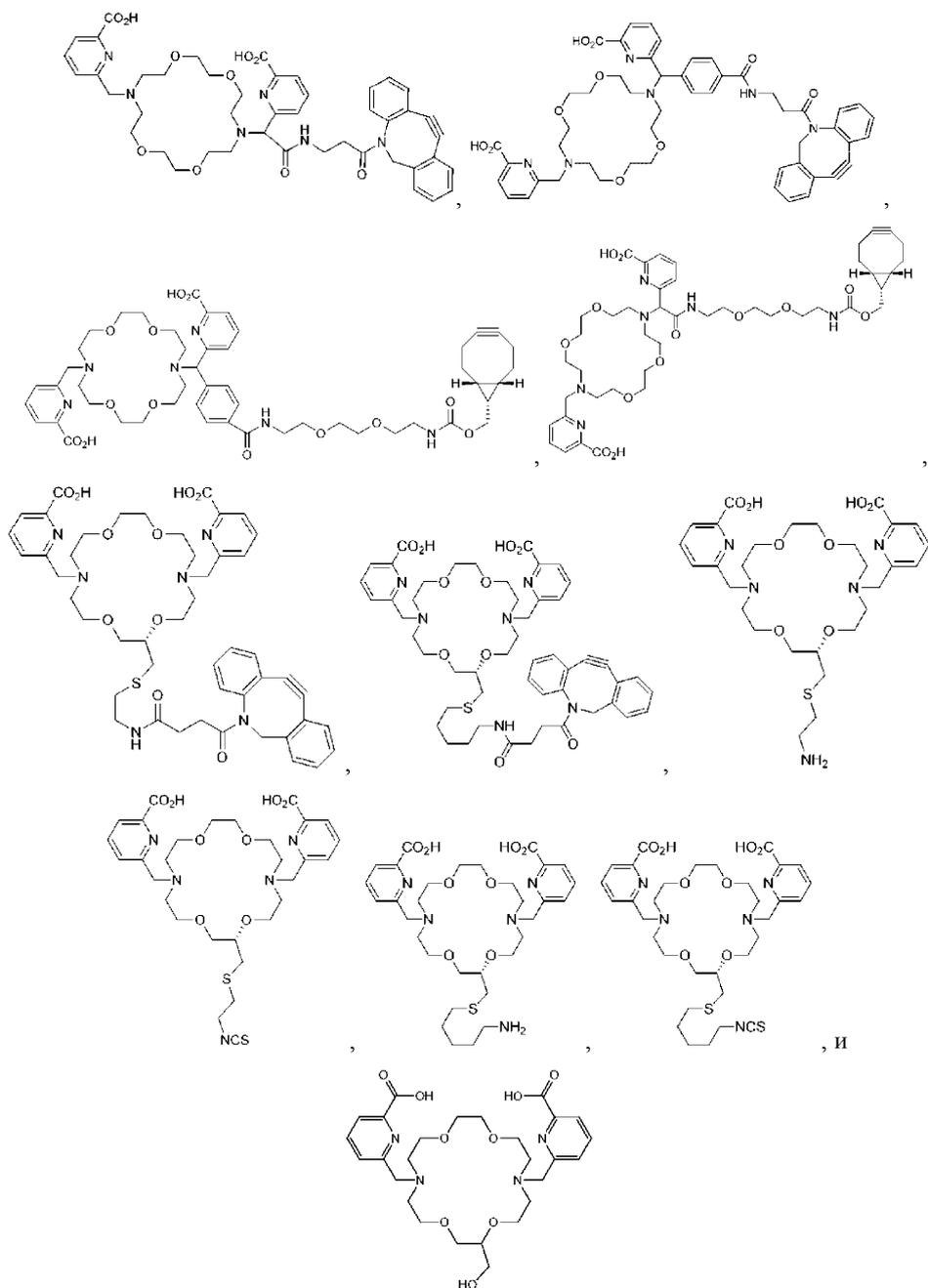
2. Хелатор по п.1, в котором R_{11} представляет собой $-NH_2$, $-NCS$, $-NCO$, $-N_3$, алкинил, циклоалкинил, $-C(O)R_{13}$, $-COOR_{13}$, $-CON(R_{13})_2$, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен.

3. Хелатор по п.2, в котором R_{11} выбран из группы, состоящей из бициклононила (BCN), дифтористого циклоктинила (DIFO), дибензоциклоктинила (DIBO), кето-DIBO, биарилазациклоктинонила (BARAC), дибензоазациклоктинила (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклоктинила (DIMAC), дифторбензоциклоктинила (DIFBO), монобензоциклоктинила (MOBO) и тетраметоксибензоциклоктинила (TMDIBO).

4. Хелатор по п.3, в котором R_{11} представляет собой DBCO или BCN.

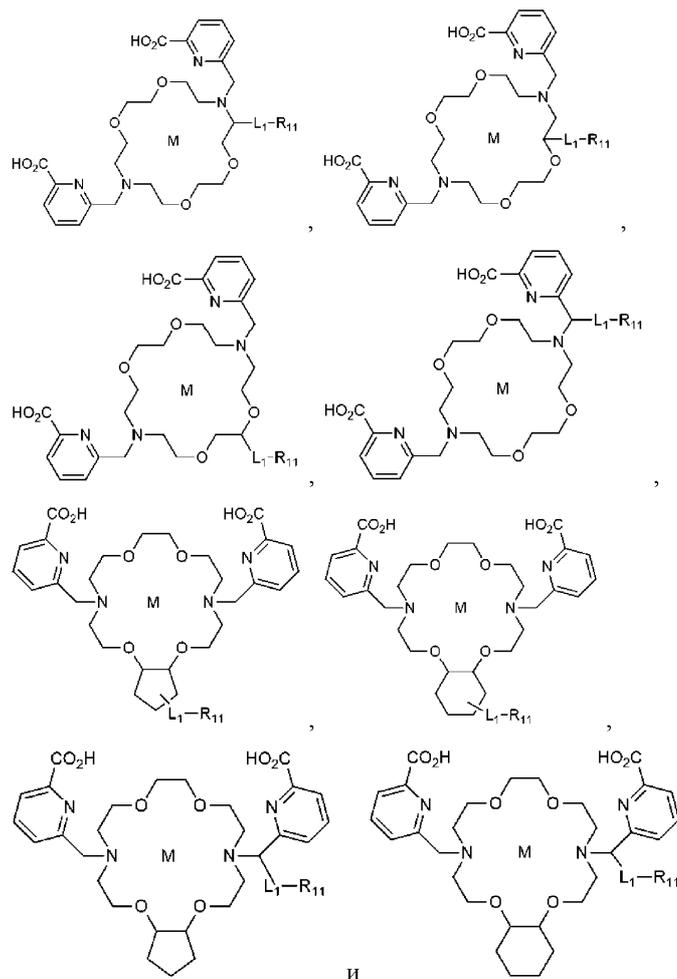
5. Хелатор по п.1, в котором R_{11} содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

6. Хелатор, выбранный из группы, включающей



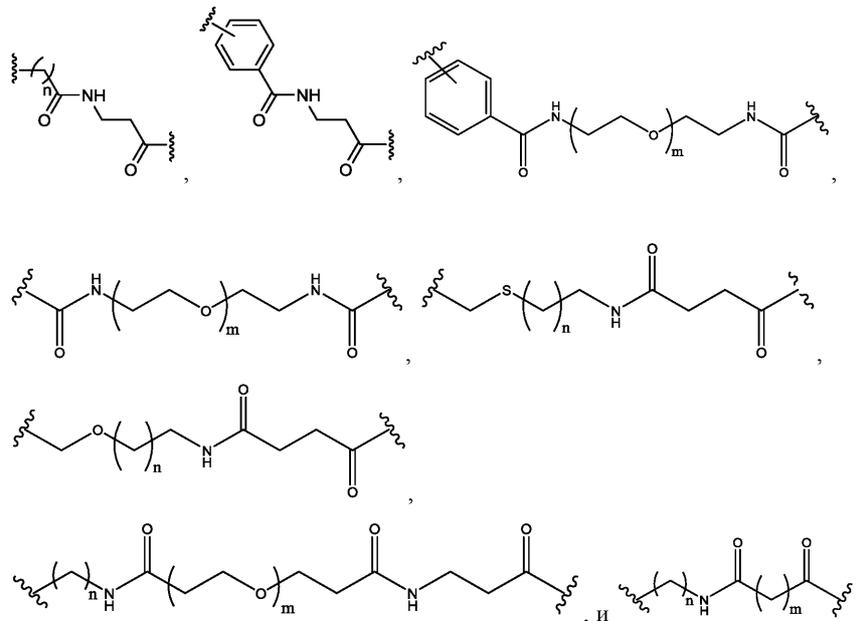
7. Хелатор по любому из пп.1-6, где хелатор дополнительно содержит бета-излучающий или альфа-излучающий ион радиоактивного металла, связанный с хелатором посредством координационной связи, тем самым образуя комплекс радиоактивного металла.

8. Комплекс радиоактивного металла, выбранный из группы, состоящей из



где M представляет собой актиний-225 (^{225}Ac);

L_1 отсутствует или представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6;

R_{11} представляет собой $-\text{NH}_2$, $-\text{NCS}$, $-\text{NCO}$, $-\text{N}_3$, алкинил, циклоалкинил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}_{13}$, $-\text{COOR}_{13}$, $-\text{CON}(\text{R}_{13})_2$, малеимид, ацилгалогенид, тетразин или транс-циклооктен, или R_{11} содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

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

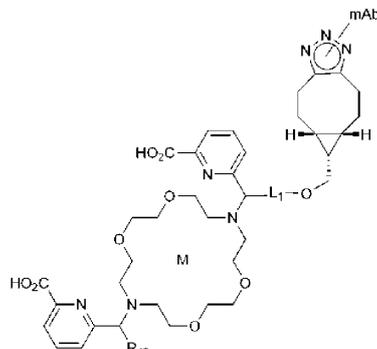
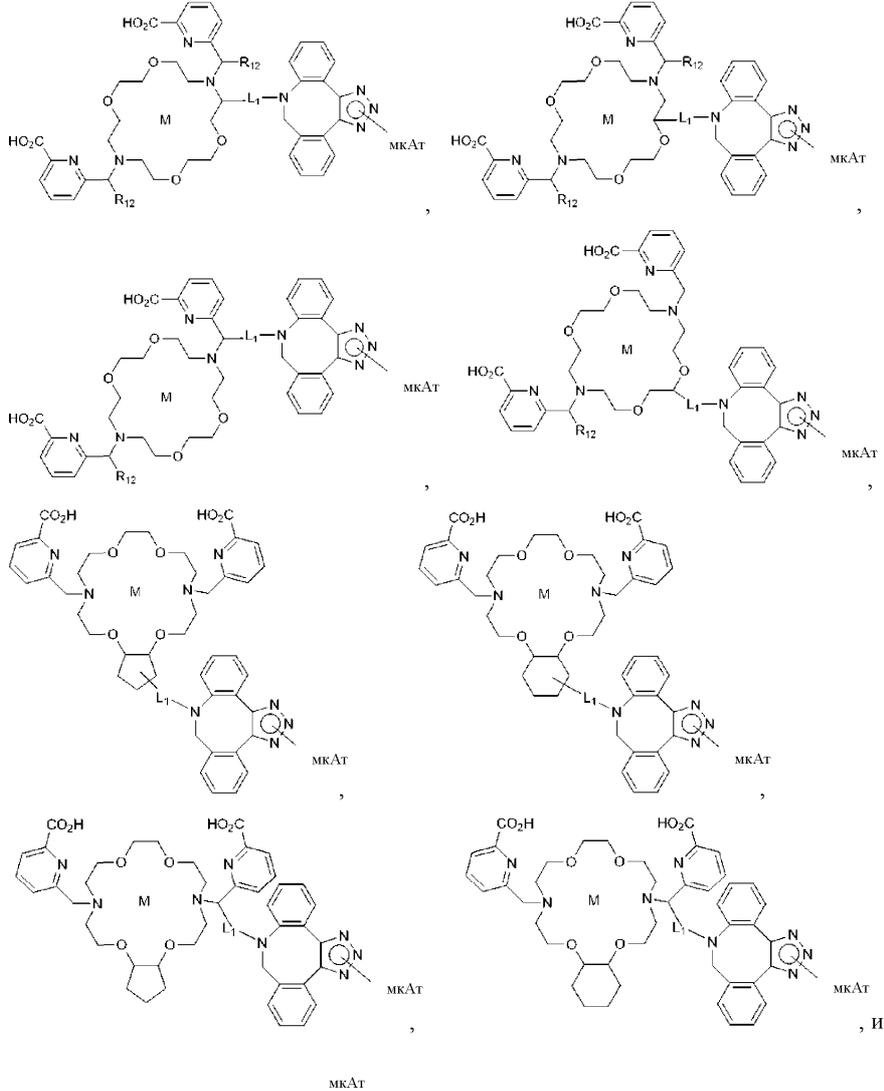
где алкил представляет собой метил, этил, пропил, бутил или пентил;

циклоалкинил представляет собой циклоалкильную группу, содержащую от 8 до 10 атомов углерода и содержащую по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода;
 алкинил определяется как алкильная группа, имеющая от 2 до 10 атомов углерода и содержащая по меньшей мере одну тройную связь между двумя атомами углерода; и
 ацилгалогенид относится к фрагменту $-C(O)X$, где X представляет собой галоген.

9. Радиоактивный иммуноконъюгат, содержащий комплекс радиоактивного металла по п.8, конъюгированный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

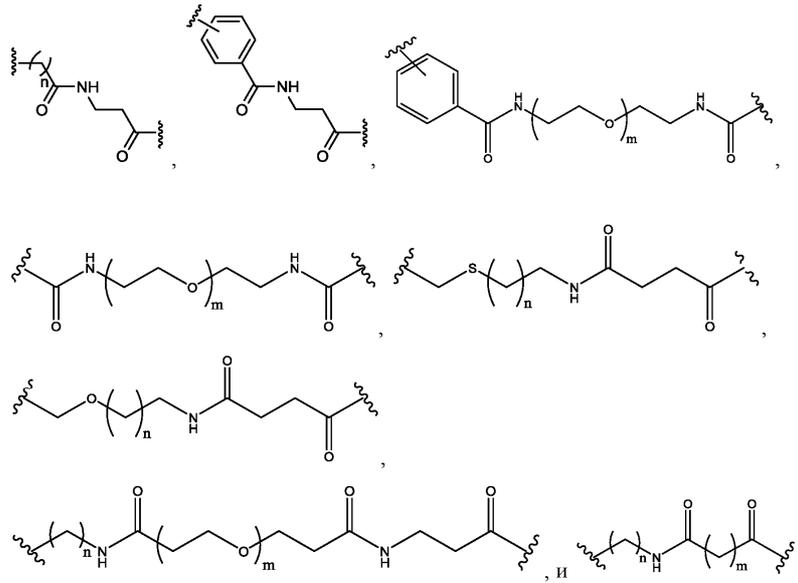
10. Радиоактивный иммуноконъюгат по п.9, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связан с R_{11} радиоактивного комплекса посредством триазольного фрагмента.

11. Радиоактивный иммуноконъюгат, имеющий структуру, выбранную из группы, состоящей из



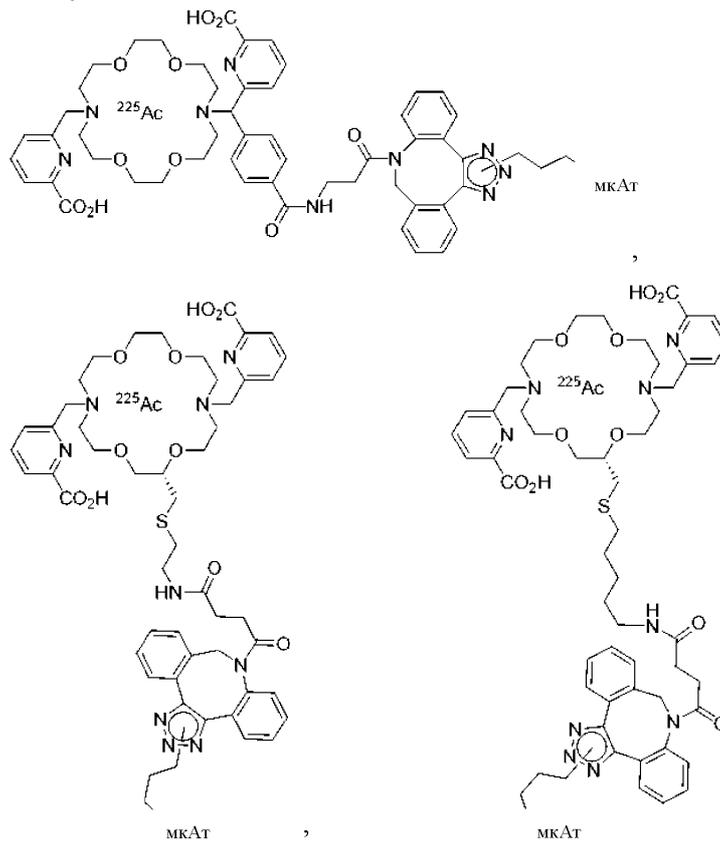
где М представляет собой актиний-225 (^{225}Ac);

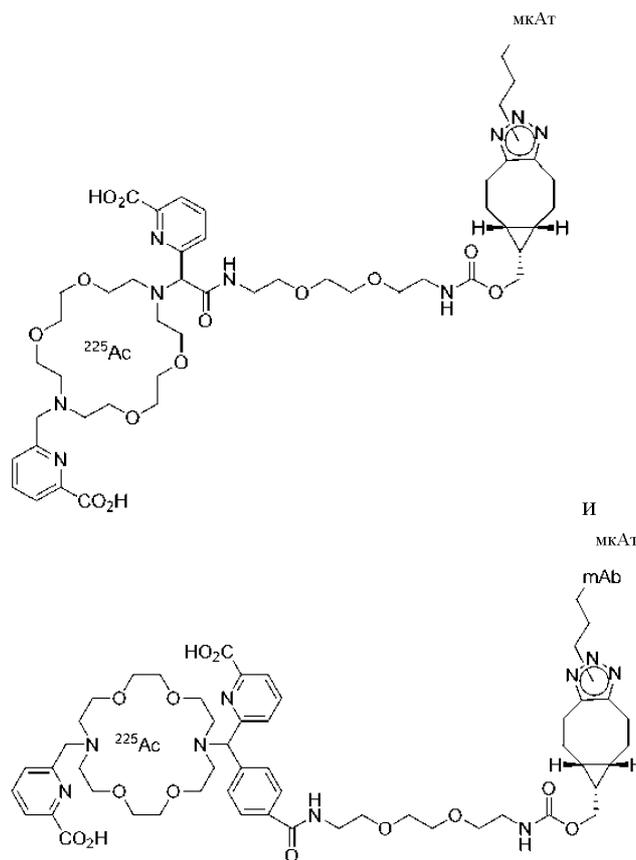
L_1 представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из



где n представляет собой целое число от 1 до 4, а m представляет собой целое число от 0 до 6; мкАт представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и каждый R_{12} представляет собой водород.

12. Радиоактивный иммуноконъюгат по п.11, причем радиоактивный иммуноконъюгат выбран из группы, состоящей из следующего:





если мкАт представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

13. Радиоактивный иммуноконъюгат по любому из пп.9-12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с опухолевым антигеном.

14. Способ получения радиоактивного иммуноконъюгата по п.9, включающий приведение хелатора по п.5 в контакт с бета-излучающим или альфа-излучающим ионом радиоактивного металла с образованием таким образом радиоактивного иммуноконъюгата по п.9.

15. Способ получения радиоактивного иммуноконъюгата по п.9, включающий:

(i) обеспечение модифицированного полипептида, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной группой;

(ii) обеспечение хелатирующего комплекса, содержащего хелатор, ковалентно связанный с алкинильной группой или циклоалкинильной группой;

(iii) приведение модифицированного полипептида в контакт с хелатирующим комплексом в условиях, позволяющих азидной группе реагировать с алкинильной группой или циклоалкинильной группой с образованием таким образом иммуноконъюгата; и

(iv) приведение иммуноконъюгата в контакт с ионом альфа-излучающего радиоактивного металла с образованием таким образом радиоактивного иммуноконъюгата, причем радиоактивный иммуноконъюгат содержит радиоактивный комплекс, содержащий ион альфа-излучающего радиоактивного металла, связанный с хелатором, при этом радиоактивный комплекс имеет структуру, выбранную из комплексов радиоактивного металла по п.8,

где М представляет собой актиний-225 (^{225}Ac); и

R_{11} представляет собой алкинильную или циклоалкинильную группу.

16. Способ получения радиоактивного иммуноконъюгата по п.9, включающий:

(i) обеспечение модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно связанный с азидной группой;

(ii) обеспечение радиоактивного комплекса, содержащего ион альфа-излучающего радиоактивного металла, связанного с хелатором посредством координационной связи, причем хелатор ковалентно связан с алкинильной или циклоалкинильной группой; и

(iii) приведение в контакт модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с радиоактивным комплексом в условиях, позволяющих азидной группе реагировать с алкинильной или циклоалкинильной группой с получением таким образом радиоактивного иммуноконъюгата, где радиоактивный комплекс содержит структуру, выбранную из комплексов радиоактивного металла по п.8,

где М представляет собой актиний-225 (^{225}Ac);

R_{11} представляет собой алкинильную или циклоалкинильную группу.

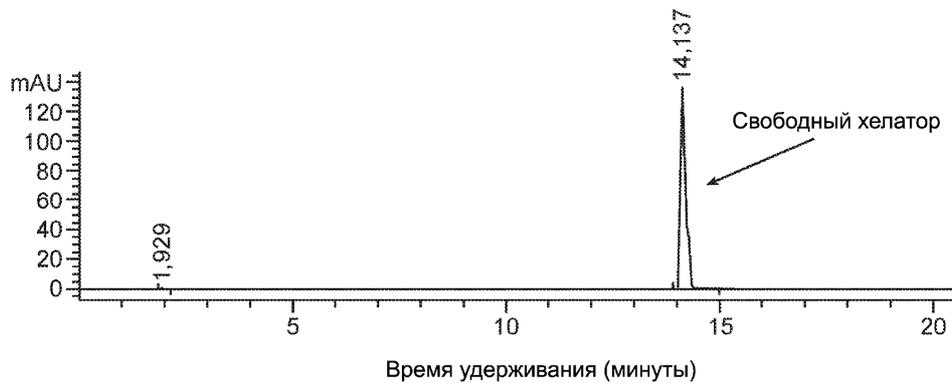
17. Способ по любому из п.15 или 16, в котором R_{11} выбран из группы, состоящей из бициклонони-ла (BCN), дифтористого циклооктинила (DIFO), дибензоциклооктинила (DIBO), кето-DIBO, биарилаза-циклооктинонила (BARAC), дибензоазациклооктинила (DIBAC, DBCO, ADIBO), диметоксиазациклоок-тинила (DIMAC), дифторбензоциклооктинила (DIFBO), монобензоциклооктинила (MOBO) и тетраме-токсидибензоциклооктинила (TMDIBO).

18. Фармацевтическая композиция, содержащая радиоактивный иммуноконъюгат по любому одно-му из пп.9-12 и фармацевтически приемлемый носитель.

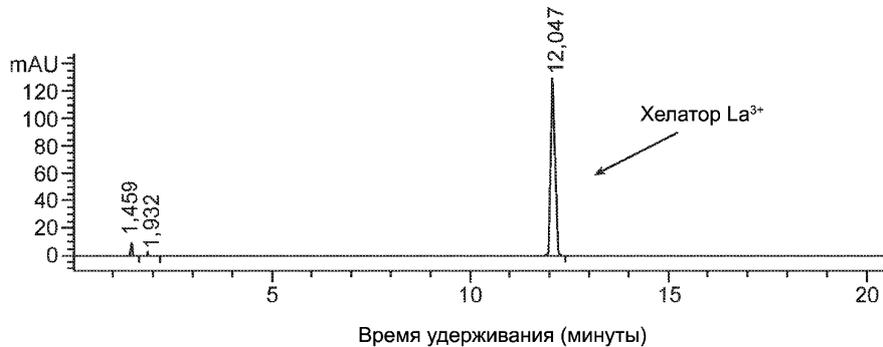
19. Способ селективного нацеливания на неопластические клетки для лучевой терапии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фар-мацевтической композиции по п.18.

20. Способ лечения неопластического заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической ком-позиции по п.18.

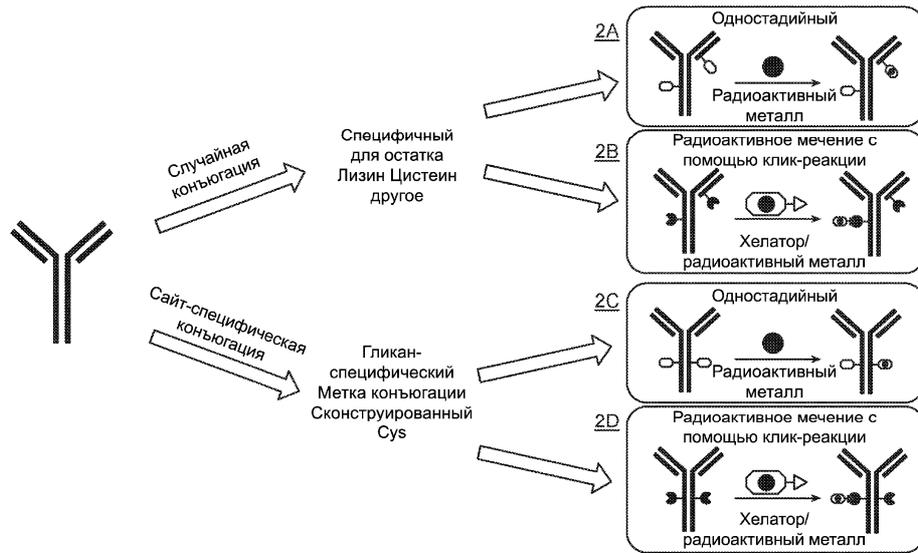
21. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту тера-певтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.18.



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2

