

COMPLEJOS RADIOFARMACÉUTICOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con métodos para la formación de complejos de isótopos de torio y particularmente complejos de torio-227 con determinados ligandos octodentados conjugados con porciones para dirigir a tejido. La invención también se relaciona con los complejos, y con el tratamiento de enfermedades, particularmente enfermedades neoplásicas, que involucran la administración de dichos complejos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La muerte de células específicas puede ser esencial para el éxito del tratamiento de una variedad de enfermedades en sujetos mamíferos. El ejemplo típico de esto es el tratamiento de enfermedades malignas tales como sarcomas y carcinomas. Sin embargo la eliminación selectiva de determinados tipos celulares también puede tener un rol en el tratamiento de otras enfermedades, especialmente enfermedades hiperplásicas y neoplásicas.

Los métodos más comunes de tratamiento selectivo son actualmente la cirugía, la quimioterapia y la radiación de haz externo. La terapia con radionucleidos dirigidos es, sin embargo, un campo prometedor y en desarrollo con el potencial de administrar radiación muy citotóxica específicamente a tipos celulares

asociados con la enfermedad. Las formas más comunes de radiofármacos actualmente autorizados para el uso en humanos emplean radionucleidos emisores beta y/o emisores gamma. Sin embargo, ha habido algo de interés en el uso de radionucleidos emisores alfa en la terapia debido a su potencial más específico para matar células.

El rango de radiación de emisores alfa típicos en ambientes fisiológicos generalmente es menor que 100 micrómetros, el equivalente de solo unos pocos diámetros celulares. Esto hace a estas fuentes bien adecuadas para el tratamiento de tumores, que incluyen micrometástasis, porque tienen el rango para alcanzar células vecinas en un tumor pero si están bien dirigidas entonces pasará poca energía irradiada más allá de las células blanco. Por lo tanto, no se necesita que cada célula sea dirigida como blanco pero el daño al tejido blanco circundante puede minimizarse (véase Feinendegen y col., *Radiat Res* 148:195-201 (1997)). Por el contrario, una partícula beta tiene un rango de 1 mm o más en agua (véase Wilbur, *Antibody Immunocon Radiopharm* 4: 85-96 (1991)).

La energía de radiación de partículas alfa es alta en comparación con la llevada por partículas beta, rayos gamma y rayos X, siendo típicamente entre 5 y 8 MeV, o 5 a 10 veces la de una partícula beta y 20 o más

veces la energía de un rayo gamma. Por lo tanto, esta deposición de una gran cantidad de energía en una distancia muy corta provee a la radiación α con una transferencia de energía lineal (LET) excepcionalmente alta, eficacia biológica relativa (RBE) alta y relación de mejora por oxígeno (OER) baja comparado con la radiación gamma y beta (véase Hall, "Radiobiology for the radiologist", Quinta edición, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, USA, 2000). Esto explica la citotoxicidad excepcional de los radionucleidos emisores alfa y también impone demandas rigurosas en el direccionamiento biológico de dichos isotopos y al nivel de control y estudio de distribución de radionucleidos emisores alfa que es necesario con el objetivo de evitar efectos secundarios inaceptables.

La Tabla 1 a continuación presenta las propiedades de decaimiento físico de los emisores alfa propuestos ampliamente hasta el momento en la literatura que posiblemente tienen eficacia terapéutica.

Tabla 1

Nucleido candidato	$T_{1/2}^*$	Clínicamente ensayado para
^{225}Ac	10,0 días	leucemia
^{211}At	7,2 horas	Glioblastoma
^{213}Bi	46 minutos	leucemia

^{223}Ra	11,4 días	metástasis de hueso
^{224}Ra	3,66 días	espondilitis anquilosante

* Vida media

Hasta el momento, respecto a la aplicación en radioinmunoterapia la atención principal se ha enfocado en ^{211}At , ^{213}Bi y ^{225}Ac y estos tres nucleidos se han explorado en ensayos de inmunoterapia clínica.

Varios de los radionucleidos que han sido propuestos tienen vida corta, es decir tienen vidas medias menores a las 12 horas. Dicha vida media corta hace difícil producir y distribuir de un modo comercial radiofármacos en base a estos radionucleidos. La administración de un nucleido de vida corta también aumenta la proporción de la dosis de radiación que se emitirá en el cuerpo antes de alcanzar el sitio blanco.

La energía de retroceso de la emisión alfa provocará en muchos casos la liberación de nucleidos hijos de la posición de decaimiento del parental. Esta energía de retroceso es suficiente para desprender muchos núcleos hijos del ambiente químico que puede haber tenido el parental, por ejemplo cuando el parental estaba complejado por un ligando tal como un agente quelante. Esto ocurrirá incluso cuando el hijo sea químicamente compatible con, es decir complejable por, el mismo ligando. Igualmente, cuando el nucleido

hijo es un gas, particularmente un gas noble tal como radón, o es químicamente incompatible con el ligando, este efecto de liberación será incluso mayor. Cuando los nucleidos hijos tienen vidas medias mayores a unos pocos segundos, pueden difundir hacia el sistema sanguíneo, no restringidos por el complejante que sostiene el parental. Estos hijos radiactivos libres pueden de esta manera provocar toxicidad sistémica no deseada.

El uso de Torio-227 ($T_{1/2} = 18,7$ días) bajo condiciones en las cuales se mantiene el control del isótopo hijo ^{223}Ra se propuso hace unos pocos años (véase WO 01/60417 y WO 02/05859). Esto fue en situaciones en las cuales se usa un sistema transportador que permite a los nucleidos hijos estar retenidos por un ambiente cerrado. En un caso, el radionucleido se dispone dentro de un liposoma y el tamaño sustancial del liposoma (en comparación a la distancia de retroceso) ayuda a retener los nucleidos hijos dentro del liposoma. En el segundo caso, se usan complejos buscadores de hueso del radionucleido que se incorporan a la matriz ósea y por lo tanto se restringe la liberación de los nucleidos hijos. Estos son métodos potencialmente muy ventajosos, pero la administración de liposomas no es deseable en algunas circunstancias y hay muchas enfermedades del tejido blando en las cuales

los radionucleidos no pueden estar rodeados por una matriz mineralizada para retener los isótopos hijos.

Más recientemente, se estableció que la toxicidad de los núcleos hijos ^{223}Ra liberado durante el decaimiento del ^{227}Th podría ser tolerado en el cuerpo de un mamífero en mucho mayor medida que lo predicho por ensayos previos con núcleos comparables. En ausencia de medios específicos para retener los hijos radio del torio-227 descrito precedentemente, la información disponible públicamente respecto a la toxicidad del radio pone de manifiesto que no es posible usar torio-227 como un agente terapéutico ya que las dosificaciones requeridas para alcanzar un efecto terapéutico del decaimiento del torio-227 podría producir una dosificación muy tóxica y posiblemente letal de radiación del decaimiento de los hijos radio, es decir no hay ventana terapéutica.

En WO 04/091668 se describe el hallazgo inesperado que existe una ventana terapéutica de tratamiento en la cual puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un radionucleido torio-227 dirigido a un sujeto (típicamente un mamífero) sin generar una cantidad de radio-223 suficiente para provocar una mielotoxicidad inaceptable. Por lo tanto puede usarse para el tratamiento y profilaxis de todos los tipos de enfermedades en sitios de tejidos óseos y blandos.

En vista de los desarrollos precedentes, ahora es posible emplear núcleos de torio-227 emisores alfa en terapia con endoradionucleidos sin mielotoxicidad que resulta del ^{223}Ra generado. No obstante, la ventana terapéutica permanece relativamente estrecha y en todos los casos se desea administrar no más del radioisótopo emisor alfa a un sujeto que lo absolutamente necesario. Por lo tanto, el aprovechamiento útil de esta nueva ventana terapéutica podría mejorarse en gran medida si el núcleo de torio-227 emisor alfa pudiese complejarse y dirigirse con un grado alto de confiabilidad.

Debido que los radionucleidos están constantemente decayendo, el tiempo invertido en el manejo del material entre el aislamiento y la administración al sujeto es de gran importancia. También sería de considerable valor si el núcleo de torio emisor alfa pudiese complejarse, dirigirse y/o administrarse en una forma que fuese rápida y conveniente de preparar, preferiblemente que requiera pocos pasos, con periodos cortos de incubación y/o temperaturas que no afecten irreversiblemente las propiedades de la entidad de direccionamiento. Adicionalmente, los procesos que pueden llevarse a cabo en solventes que no necesitan la eliminación antes de la administración (esencialmente en solución acuosa) tienen la ventaja considerable de evitar el paso de evaporación del solvente o diálisis.

También sería considerado de valor significativo si se pudiese desarrollar una formulación de producto farmacéutico marcado con torio que demuestre estabilidad significativamente mejorada. Esto es crítico para asegurar que se cumplen los estándares robustos de calidad de producto a la vez que se permite un camino logístico para distribuir las dosis de los pacientes. Por lo tanto se prefieren las formulaciones con radiolisis mínima durante un periodo de entre 1 y 4 días.

Se ha mostrado previamente que los agentes quelantes octadentados que contienen grupos hidroxipiridinona son adecuados para coordinar el emisor alfa torio-277, para la unión posterior a una porción de direccionamiento (WO2011098611). Se describió que los quelantes octadentados, que contienen cuatro grupos 3,2-hidroxipiridinona unidos por grupos conectores a un esqueleto en base a amina, tienen un grupo reactivo separado usado para la conjugación a una molécula de direccionamiento. Las estructuras preferidas de la invención previa contenían grupos 3,2-hidroxipiridinona y empleaban la porción isotiocianato como química de acoplamiento preferida al componente anticuerpo como se muestra en el compuesto ALG-DD-NCS. El isotiocianato se usa ampliamente para unir una marca a proteínas a través de grupos amina. El grupo

isotiocianato reacciona con el extremo amino terminal y aminas primarias en proteínas y ha sido usado para marcar muchas proteínas que incluyen anticuerpos. A pesar de que el enlace tiourea formado en estos conjugados es razonablemente estable, se ha informado que los conjugados de anticuerpo preparados a partir de isotiocianatos fluorescentes se deterioran en el tiempo. [Banks PR, Paquette DM., Bioconjug Chem (1995) 6:447-458]. La tiourea formada por la reacción del isotiocianato de fluoresceína con aminas también es susceptible de conversión a una guanidina bajo condiciones básicas [Dubey I, Pratviel G, Meunier B] Journal: Bioconjug Chem (1998) 9:627-632]. Debido a la vida media de decaimiento prolongada del torio-227 (18,7 días) acoplado a la vida media biológica larga de un anticuerpo monoclonal se desea usar porciones de unión más estables para generar conjugados que son químicamente más estables *in vivo* y durante el almacenamiento.

El trabajo previo más relevante sobre la conjugación de ligandos de hidroxipiridinona se publicó en WO2013/167754 y describe ligandos que poseen una porción solubilizante en agua que comprende una funcionalidad hidroxialquilo. Debido a la reactividad de los grupos hidroxilo de esta clase de quelato la activación como un éster activado no es posible ya que

múltiples reacciones de competencia conducen a una mezcla compleja de productos a través de reacciones de esterificación. Por lo tanto los ligandos de WO2013/167754 deben estar acoplados a la proteína de direccionamiento a tejido por medio de química alternativa tal como isotiocianato generando un conjugado de tiourea menos estable como se describió precedentemente. Además en WO2013167755 y WO2013167756 se describen los conjugados hidroxialquilo/isotiocianato aplicados a los anticuerpos dirigidos contra CD33 y CD22 respectivamente.

Los presentes inventores ahora han establecido que la formación de un complejo dirigido a tejido por acoplamiento de quelantes específicos a porciones de direccionamiento apropiadas, seguido por el agregado de un ion de torio emisor alfa, puede generar un complejo fácilmente, bajo condiciones suaves y por medio de una porción de unión que permanece más estable durante el almacenamiento y administración del complejo.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención provee por lo tanto un método para la formación de un complejo de torio dirigido a tejido, en donde dicho método comprende:

- a) formar un quelante octadentado que comprende cuatro porciones hidroxipiridinona

(HOPO), sustituido en la posición N con un grupo C_1-C_3 alquilo, y una porción de acoplamiento que termina en un grupo ácido carboxílico (o equivalente protegido del mismo);

b) acoplar dicho quelante octadentado a por lo menos un péptido o proteína que dirige a tejido que comprende por lo menos una porción amina mediante por lo menos un reactivo de acoplamiento con amida para generar de esta manera un quelante dirigido a tejido; y

c) poner en contacto el quelante dirigido a tejido con una solución acuosa que comprende un ion de por lo menos un isótopo de torio emisor alfa.

En dichos complejos (y preferiblemente en todos los aspectos de la presente invención) el ion de torio generalmente formará complejo por el ligando que contiene hidroxipiridinona octadentado, que a su vez se unirá a la porción que dirige a tejido mediante un enlace amida.

Típicamente, el método será un método para la síntesis de quelantes octadentado en base a 3,2-hidroxipiridinona que comprenden una función carboxilato reactiva que puede activarse en la forma de un éster activo (tal como un éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS)) mediante activación *in*

situ o por síntesis y aislamiento del éster activo mismo.

El éster NHS resultante puede usarse en un paso de conjugación simple para producir un rango amplio de formatos de proteína modificada por quelante. Adicionalmente, los conjugados de anticuerpos muy estables son fácilmente marcados con torio-227. Esto debe hacerse a temperatura ambiente o cercana a ella, típicamente con rendimientos radioquímicos y pureza elevados.

El método de la invención se realizará preferiblemente en solución acuosa y en una forma de realización puede realizarse en ausencia o ausencia sustancial (menor de 1% en volumen) de cualquier solvente orgánico.

Las porciones preferidas para dirigir incluyen anticuerpos policlonales y particularmente monoclonales y fragmentos de los mismos. Los fragmentos de unión específicos tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y anticuerpos específicos de cadena simple son fragmentos típicos.

Los complejos para dirigir a tejido de la presente invención pueden formularse en medicamentos adecuados para la administración a un humano o a un sujeto animal no humano.

En un segundo aspecto la invención provee por lo tanto métodos para la generación de una formulación

farmacéutica que comprende formar un complejo dirigido a tejido como se describe en la presente seguido por el agregado de por lo menos un transportador y/o excipiente farmacéutico. Los transportadores y excipientes adecuados incluyen soluciones amortiguadoras, agentes quelantes, agentes estabilizantes y otros componentes adecuados conocidos en el arte y descritos en cualquier aspecto en la presente.

En otro aspecto, la invención adicionalmente provee un complejo de torio dirigido a tejido. Dicho complejo tendrá las características descritas en la presente, particularmente las características preferidas descritas en la presente. El complejo puede formarse o tendrá la capacidad de formarse por cualquiera de los métodos descritos en la presente. Dichos métodos pueden producir entonces por lo menos un complejo de torio dirigido a tejido como se describe en cualquier aspecto o forma de realización en la presente.

En aún otro aspecto, la presente invención provee una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de los complejos descritos en la presente. La formulación puede formarse o puede tener la capacidad de formarse por cualquiera de los métodos descritos en la presente y puede contener por lo menos una solución

amortiguadora, estabilizante y/o excipiente. La selección de la solución amortiguadora y estabilizante puede ser tal que en conjunto pueden ayudar a proteger el complejo dirigido a blanco de la radiolisis. En una forma de realización, la radiolisis del complejo en la formulación es mínima incluso después de varios días posteriores a la fabricación de la formulación. Esto es una ventaja importante porque resuelve temas potenciales asociados con la calidad y la logística de la provisión de los fármacos que son claves para la habilitación y aplicación práctica de esta tecnología.

Esta invención ha mostrado utilidad en la preparación de una multitud de conjugados de anticuerpo marcados con torio para dirigir a sitios de interés biológico, tales como receptores asociados a tumores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el contexto de la presente invención, "dirigido a tejido" se usa en la presente para indicar que la sustancia en cuestión (particularmente cuando está en la forma de complejo dirigido a tejido como se describe en la presente), sirve para ser localizada (y particularmente para localizar cualquier complejo de torio conjugado) preferencialmente por lo menos un sitio de tejido en el cual se desea su presencia (por ejemplo para administrar un decaimiento radiactivo). Por lo tanto el grupo o porción para dirigir a tejido

sirve para proveer una mejor localización a por lo menos un sitio deseado en el cuerpo de un sujeto luego de la administración al sujeto comparado con la concentración de un complejo equivalente que no tiene la porción para dirigir. La porción para dirigir en el presente caso preferiblemente se seleccionará para unirse específicamente a receptores de la superficie celular asociados con células cancerígenas u otros receptores asociados con el microambiente tumoral.

Hay un número de blancos que se sabe que están asociados con enfermedades hiperplásicas y neoplásicas. Estos incluyen determinados receptores, proteínas de superficie celular, proteínas transmembrana y proteínas/péptidos encontrados en la matriz extracelular en la vecindad de células enfermas. Los ejemplos de los receptores y antígenos de superficie celular que pueden estar asociados con enfermedades neoplásicas incluyen CD22, CD33, FGFR2 (CD332), PSMA, HER2, Mesotelina, etc. En una forma de realización, la porción para dirigir a tejido (por ejemplo péptido o proteína) tiene especificidad por al menos un antígeno o receptor seleccionado de CD22, CD33, FGFR2 (CD332), PSMA, HER2 y Mesotelina.

CD22, o grupo de diferenciación-22, es una molécula que pertenece a la familia SIGLEC de lectinas

(SIGLEC=lectinas del tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico).

CD33 o Siglec-3 es un receptor transmembrana expresado en células del linaje mieloide.

FGFR2 es un receptor para el factor de crecimiento fibroblástico. Es una proteína que en humanos está codificada por el gen FGFR2 que reside en el cromosoma 10.

HER2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER/EGFR/ERBB).

El antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) es una enzima que en humanos está codificado por el gen FOLH1 (folato hidrolasa 1).

La msotelina, también conocida como MSLN, es una proteína que en humanos está codificada por el gen MSLN.

Un compuesto de unión para dirigir a tejido particularmente preferido en el presente caso se seleccionará para que se una específicamente al receptor CD22. Esto puede reflejarse, por ejemplo al tener una afinidad de unión 50 veces mayor o aún mayor por las células que expresan CD22 respecto a las células que no expresan CD22 (por ejemplo por lo menos 100 veces mayor, preferiblemente por lo menos 300 veces mayor). Se cree que el CD22 se expresa y/o sobreexpresa

en células que tienen determinados estados de enfermedad (como se indica en la presente) y por lo tanto el compuesto de unión específico por CD22 puede servir para dirigir el complejo a dichas células afectadas por la enfermedad. Similarmente una porción para dirigir a tejido puede unirse a marcadores de superficie celular (por ejemplo receptores CD22) presentes en las células en la vecindad de células afectadas con enfermedad. Los marcadores de superficie celular CD22 pueden expresarse con mayor intensidad en la superficie de células enfermas respecto a la superficie de las células sanas o expresarse con mayor intensidad en la superficie de células durante periodos de crecimiento o replicación respecto a las fases latentes. En una forma de realización, puede usarse un compuesto de unión para dirigir a tejido específico por CD22 en combinación con otro compuesto de unión para un marcador de superficie celular específico de enfermedad, dando de esta manera un complejo de unión dual. Los compuestos de unión para dirigir a tejido para CD-22 típicamente serán péptidos o proteínas, como se describe en la presente.

Los diferentes aspectos de la invención como se describen en la presente se relacionan al tratamiento de enfermedades, particularmente para la dirección selectiva a tejido enfermo, así como relacionado a

complejos, conjugados, medicamentos, formulación, conjuntos de componentes, etc. útiles en dichos métodos. En todos los aspectos, el tejido enfermo puede residir en un único sitio en el cuerpo (por ejemplo en el caso de un tumor sólido localizado) o puede residir en una pluralidad de sitios (por ejemplo cuando se afectan varias articulaciones en artritis o en el caso de una enfermedad cancerosa distribuida o con metástasis).

El tejido enfermo que va a ser utilizado blanco puede ser un sitio de tejido blando, un sitio de tejido calcificado o una pluralidad de sitios que pueden estar todos en tejidos blandos, todos en tejido calcificado o pueden incluir por lo menos un sitio de tejido blando y/o por lo menos un sitio de tejido calcificado. En una forma de realización, por lo menos un sitio de tejido blando es utilizado como blanco. Los sitios usados como blanco y los sitios de origen de la enfermedad pueden ser los mismos, pero como alternativa pueden ser diferentes (tal como cuando los se usan específicamente como blanco los sitios metastásicos). Cuando hay involucrado más de un sitio este puede incluir el sitio de origen o puede ser una pluralidad de sitios secundarios.

El término "tejido blando" se usa en la presente para indicar tejidos que no tienen una matriz

mineralizada "dura". En particular, los tejidos blandos como se usa en la presente puede ser cualquier tejido que no sea tejido óseo. Correspondientemente, "enfermedad de tejido blando" como se usa en la presente indica una enfermedad que se produce en un "tejido blando" como se usa en la presente. La invención es particularmente adecuada para el tratamiento de cánceres y "enfermedades de tejido blando" abarcando así carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y cánceres de mezcla de tipos que se producen en cualquier tejido "blando" (es decir no mineralizado), así como otras enfermedades no cancerosas de dicho tejido. La "enfermedad de tejido blando" cancerosa incluye tumores sólidos que se producen en tejidos blandos así como tumores metastásicos y micrometastásicos. Ciertamente, la enfermedad de tejido blando puede comprender un tumor sólido primario de tejido blando y por lo menos un tumor metastásico de tejido blando en el mismo paciente. Como alternativa, la "enfermedad de tejido blando" puede consistir en solo un tumor primario o solo metástasis siendo el tumor primario una enfermedad ósea. Las neoplasias hematológicas y especialmente las enfermedades neoplásicas de células linfoides, tales como linfomas y leucemias linfoides, que incluyen linfoma no Hodgkin, neoplasias de células B de linfomas

de células B son particularmente adecuados para el tratamiento y/o direccionamiento en todos los aspectos apropiados de la invención. Similarmente, cualquier enfermedad neoplásica de la médula ósea, nódulos linfáticos espinales (especialmente espina dorsal) y/o células sanguíneas son adecuados para el tratamiento y/o direccionamiento en todos los aspectos apropiados de la invención.

Algunos ejemplos de neoplasias de células B que son adecuados para el tratamiento y/o direccionamiento en aspectos apropiados de la presente invención incluyen:

Leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítica pequeña, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico (tal como macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de zona marginal espectral, neoplasias de células plasmáticas (por ejemplo mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedades de deposición de inmunoglobulinas monoclonales, enfermedades de cadena pesada), linfoma de células B de zona marginal extranodular (linfoma MALT), linfoma de células B de zona marginal nodular (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células en manta, linfoma de células B grande difuso, linfoma de células B grande de mediastino (tímico), linfoma de células B grande

intravascular, linfoma de efusión primario y linfoma de Burkitt/leucemia.

Algunos ejemplos de neoplasias adecuadas para el tratamiento con el uso de un agente dirigido a FGFR2 de la presente invención incluyen aquellos en donde los eventos de mutación están asociados con la formación y progresión de tumores que incluyen cáncer de mama, de endometrio y gástrico.

Algunos ejemplos de neoplasias derivadas de mieloides adecuadas para el tratamiento usando un agente dirigido a CD33 de la presente invención incluye leucemia mieloide aguda (AML).

Algunos otros de neoplasias adecuadas para el tratamiento usando un agente dirigido al antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) de la presente invención incluyen cáncer de próstata y de cerebro.

Algunos otros ejemplos de neoplasias adecuadas para el tratamiento usando un agente dirigido contra el Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) de la presente invención incluye cáncer de mama.

Algunos otros ejemplos neoplasias adecuadas para el tratamiento usando un agente dirigido contra mesotelina de la presente invención incluyen malignidades tales como mesotelioma, cáncer de ovario, de pulmón y pancreático.

Una contribución clave para el éxito de esta invención es que los anticuerpos conjugados sean estables durante periodos aceptables de tiempo durante el almacenamiento. Por lo tanto la estabilidad del anticuerpo conjugado no radiactivo y del producto farmacológico marcado con torio final debe cumplir criterios rigurosos demandados por la fabricación y distribución de los productos radiofarmacéuticos. Un hallazgo sorprendente fue que la formulación descrita en la presente que comprende un direccionamiento a tejido demuestra una estabilidad destacable durante el almacenamiento. Esto se aplica incluso a temperaturas elevadas típicamente usadas para estudios de estabilidad acelerada.

En una forma de realización que puede aplicarse a todos los aspectos compatibles de la invención, el complejo dirigido a tejido puede disolverse en una solución amortiguadora adecuada. En particular, se ha encontrado que el uso de una solución amortiguada con citrato provee una formulación sorprendentemente estable. Esto preferiblemente es solución amortiguada con citrato en el rango entre 1 y 100 mM (pH entre 4 y 7), particularmente en el rango entre 10 y 50 mM, pero más preferiblemente entre 20 y 40 mM de solución amortiguada con citrato.

En una forma de realización adicional que puede aplicarse que puede aplicarse a todos los aspectos compatibles de la invención, el complejo dirigido a tejido puede disolverse en una solución amortiguadora adecuada que contiene ácido p-aminobutírico (PABA). Una combinación preferida es solución amortiguada con citrato (preferiblemente en todas las concentraciones descritas en la presente) en combinación con PABA. Las concentraciones preferidas para PABA para usar en cualquier aspecto de la presente invención, incluyendo en combinación con otros agentes se encuentra entre aproximadamente 0,005 y 5 mg/ml, preferiblemente entre 0,01 y 1 mg/ml y más preferiblemente entre 0,01 y 1 mg/ml. Las concentraciones entre 0,1 y 0,5 mg/ml son las más preferidas.

En una forma de realización adicional que puede aplicarse a todos los aspectos compatibles de la invención, el complejo dirigido a tejido puede disolverse en una solución amortiguadora adecuada que contiene ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Una combinación preferida es el uso de EDTA con solución amortiguada con citrato. Una combinación particularmente preferida es el uso de EDTA con solución amortiguada con citrato en presencia de PABA. En dichas combinaciones se prefiere que el citrato, PABA y EDTA según sea apropiado estén presentes en los

rangos de concentración y rangos preferidos de concentración indicados en la presente. Las concentraciones preferidas para EDTA para usar en cualquiera de los aspectos de la presente invención, incluyendo en combinación con otros agentes se encuentran alrededor de entre 0,02 y 200 mM, preferiblemente entre 0,2 y 20 mM y más preferiblemente entre 0,05 y 8 mM.

En una forma de realización adicional que puede aplicarse a todos los aspectos compatibles de la invención, el complejo dirigido a tejido puede disolverse en una solución amortiguadora adecuada que contiene por lo menos un polisorbato (éster de ácido graso de sorbitano tratado con PEG). Los polisorbatos preferidos incluyen Polisorbato 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitano), Polisorbato 60 (monoestearato de polioxietileno (20) sorbitano), Polisorbato 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitano), Polisorbato 80 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano) y mezclas de los mismos. El polisorbato 80 (P80) es uno de los polisorbatos más preferidos. Las concentraciones preferidas de los polisorbato (especialmente los polisorbatos preferidos indicados en la presente) para usar en cualquiera de los aspectos de la presente invención, incluyendo en combinación con otros agentes se encuentra alrededor de

entre 0,001 y 10% de peso en volumen, preferiblemente entre 0,01 y 1% de peso en volumen y más preferiblemente entre 0,02 y 0,5% de peso en volumen.

A pesar de que el PABA se ha descrito previamente como un radioestabilizante (véase US4880615 A) se observó un efecto positivo de PABA en la presente invención sobre el conjugado no radiactivo en el almacenamiento. Este efecto estabilizante en ausencia de radiolisis constituye una ventaja particularmente sorprendente porque la síntesis del quelante dirigido a tejido típicamente se realizará significativamente antes que el contacto con el ion torio. Por lo tanto, el quelante dirigido a tejido puede generarse entre 1 hora y 3 años antes del contacto con el ion torio y preferiblemente se almacenará en contacto con PABA durante por lo menos una parte de ese periodo. Es decir, los pasos a) y b) de la presente invención puede llevarse a cabo entre 1 hora y 3 años antes del paso c) y entre los pasos b) y c), el quelante dirigido a tejido puede almacenarse en contacto con PABA, particularmente en una solución amortiguadora, tal como una solución amortiguada con citrato y opcionalmente con EDTA y/o un polisorbato. Siendo todos los materiales preferiblemente del tipo y concentraciones indicados en la presente. Por lo tanto el PABA es un componente muy preferido de las formulaciones de la

invención y puede producir una estabilidad a largo plazo para el quelante dirigido a tejido y/o para el complejo de torio dirigido a tejido. En la Figura 1 se ilustra el efecto de PABA en el presente sistema.

El uso de solución amortiguada con citrato como se describe en la presente provee una ventaja sorprendente adicional respecto a la estabilidad del complejo de torio dirigido a tejido en las formulaciones de la presente invención. Los presentes inventores realizaron un estudio de radiación del efecto de las soluciones amortiguadoras sobre la generación de peróxido de hidrógeno con resultados inesperados. Se sabe que el peróxido de hidrogeno produce como resultado la radiolisis de agua y contribuye a la modificación química de conjugados proteicos en solución. Por lo tanto la generación de peróxido de hidrógeno tiene un efecto no deseado en la pureza y estabilidad del producto. La Figura 2 muestra la observación sorprendente que se midieron niveles menores de peróxido de hidrógeno en las soluciones de anticuerpo HOPO conjugado de esta invención irradiado con Co-60 (10 kGy) en solución amortiguada con citrato en comparación con otras soluciones amortiguadoras ensayada. Por lo tanto, las formulaciones de la presente invención comprenderán preferiblemente

solución amortiguada con citrato como se describe en la presente.

Los presentes inventores han establecido adicionalmente un hallazgo sorprendente adicional relacionado con el efecto combinado de determinados componentes en las formulaciones de esta invención. Esto se relaciona nuevamente con la estabilidad del conjugado radiomarcado. El propósito de este estudio fue evaluar la estabilidad del ^{227}Th -AGC1118 conjugado (véase más adelante) durante el almacenamiento. El ensayo IRF de unión se llevó a cabo usando ^{227}Th -AGC1118 con una actividad específica de alrededor de 8000 Bq/ μg . Se prepararon cinco soluciones de almacenamiento diferentes para el ^{227}Th -AGC1118, usando solución amortiguada con citrato 30 o 100 mM, o solución amortiguada con citrato 30 mM adicionado con 0,02, 0,2 o 2 mg/ml de pABA, pH 5,5. En la Figura 3 se muestra el efecto positivo significativo sobre la radioestabilidad de las formulaciones de esta invención, particularmente cuando se combinan con citrato y/o PABA en los rangos indicados en la presente. El citrato que se ha encontrado en el estudio descrito precedentemente que es la solución amortiguadora más eficaz, se encontró sorprendentemente que este efecto se mejoraba aún más con el agregado de PABA.

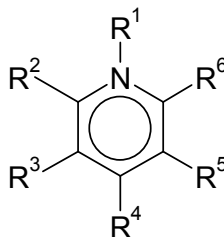
Un componente clave de los métodos, complejos y formulaciones de la presente invención es la porción octadentado quelante. El trabajo previo más relevante sobre la formación de complejos de iones torio con ligandos hidroxipiridinona se publicó como WO2011/098611 y describe la facilidad relativa de la generación de iones torio formando complejo con ligandos que contienen HOPO octadentado.

Los quelantes previamente conocidos de torio también incluyen los quelantes Poliaminopoliácido que comprenden un esqueleto poliazaalcano lineal, cíclico o ramificado con grupos ácidos (por ejemplo carboxialquilo) unidos a los nitrógenos del esqueleto. Los ejemplos de dichos quelantes incluyen derivados de DOTA tales como ácido p-isotiocianatobencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (p-SCN-Bz-DOTA) y derivados de DTPA tales como ácido p-isotiocianatobencil-dietilenotriaminopentaacético (p-SCN-Bz-DTPA), siendo los primeros quelantes cíclicos, y los últimos quelantes lineales.

Los derivados del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético se han ejemplificado precedentemente, pero los métodos estándares no pueden usarse fácilmente para quelar el torio con derivados de DOTA. El calentamiento del derivado de DOTA con el metal provee el quelado

eficazmente, pero frecuentemente con rendimientos bajos. Hay una tendencia a que al menos una porción del ligando se desnaturalice irreversiblemente durante el procedimiento. Adicionalmente, debido a su susceptibilidad relativamente alta a la desnaturalización irreversible, generalmente es necesario evitar la unión de la porción de direccionamiento hasta que se hayan completado todos los pasos de calentamiento. Esto agrega un paso químico (con todo el trabajo y separación necesario) que debe realizarse durante la vida media de decaimiento del isótopo de torio emisor alfa. Obviamente que es preferible no manipular el material emisor alfa de esta manera ni generar el desecho correspondiente en mayor medida que lo necesario. Adicionalmente, todo el tiempo utilizado para la preparación del conjugado gasta una proporción del torio que decaerá durante este periodo de preparación.

Un aspecto clave de la presente invención en referencia a todos sus aspectos es el uso de un ligando octadentado, particularmente un ligando octadentado que contiene hidroxipiridinona que comprende cuatro porciones HOPO. Dichos ligandos típicamente comprenderán por lo menos cuatro grupos quelantes en donde cada uno tiene independientemente la siguiente estructura piridina sustituida (I):



(I)

en donde R^1 es un grupo alquilo tal como un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada C_1 a C_5 que incluye metilo, etilo, n- o iso-propilo y n-, sec- iso- o tert-butilo. El R^1 preferido es C_1 a C_3 , especialmente metilo. En una forma de realización preferida hay un sustituyente metilo presente en el nitrógeno de las cuatro porciones de fórmula (I).

Los grupos alquilo referidos en la presente típicamente serán grupos alquilo C_1 a C_8 de cadena lineal o ramificada tales como metilo, etilo, n- o iso-propilo, n-, iso- tert- o sec-butilo y otros.

En determinadas divulgaciones previas, tales como WO2013/167756, WO2013/167755 y WO2013/167754 el grupo que corresponde a R^1 ha sido principalmente un grupo solubilizante tal como hidroxilo o hidroxialquilo (por ejemplo $-CH_2OH$, $-CH_2-CH_2OH$, $-CH_2-CH_2-CH_2OH$, etc.). Esto tiene determinadas ventajas en términos de mayor solubilidad, pero dichos quelantes son difíciles de unir a porciones para dirigir usando enlaces amida debido a la reactividad en la posición R^1 . En la

presente invención, por lo tanto, R^1 generalmente no es hidroxilo ni hidroxialquilo.

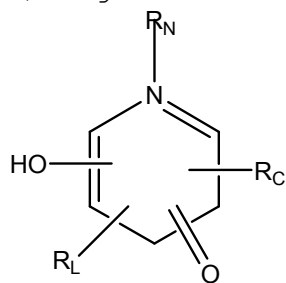
En la fórmula (I), los grupos R^2 a R^6 pueden seleccionarse independientemente cada uno entre H, OH, =O, una porción de acoplamiento y una porción conectora. Preferiblemente, exactamente uno de los grupos R^2 a R^6 será =O y exactamente uno de los grupos R^2 a R^6 será OH. Los tres grupos remanentes de R^2 a R^6 pueden ser H pero por lo menos uno de R^2 a R^6 será una porción conectora y/o porción de acoplamiento. La porción de acoplamiento se describe en la presente más adelante pero termina en un ácido carboxílico para la unión por un enlace amida a la porción para dirigir. La porción de acoplamiento puede unirse directamente al anillo en uno de los grupos R^2 a R^6 pero se unirá más preferiblemente a la porción conectora, que constituirá ella misma uno de los grupos R^2 a R^6 .

Las porciones 3,2-HOPO sustituidas en N son altamente preferidas como grupos HOPO de la presente invención y en una forma de realización, las cuatro porciones de complejación del ligando octadentado pueden ser porciones 3,2-HOPO.

Las porciones quelantes adecuadas se pueden formar por métodos conocidos en el arte, incluyendo los métodos que se describen en US 5.624.901 (por ejemplo

los ejemplos 1 y 2) y en WO2008/063721 (ambas incorporadas a la presente como referencia).

Los grupos quelantes preferidos incluyen a aquellos de fórmula (II) siguiente:



(II)

En la fórmula (II) previa, la porción $=O$ representa un grupo oxo unido a cualquier carbono del anillo de piridina, el $-OH$ representa una porción hidroxilo unida a cualquier carbono del anillo de piridina y el $-R_L$ representa una porción conectora que se une a la porción hidroxipiridinona u otras porciones de complejación, de manera que se forma el ligando octadentado completo. Cualquier porción conectora descrita en la presente es adecuada como R_L incluyendo los grupos hidrocarbilo cortos, tales como C_1 a C_8 hidrocarbilo, incluyendo al grupo C_1 a C_8 alquilo, alquenilo o alquinilo, incluyendo los grupos metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y/o hexilo de todas las tipologías. R_L se puede unir al anillo de fórmula (II) en cualquier carbono del anillo de piridina. Los grupos R_L pueden quedar entonces unidos directamente o otra porción quelante, a otro grupo conector y/o a un átomo

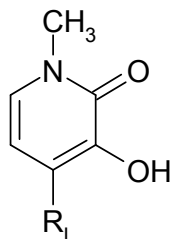
o grupo central, tal como un anillo u otro molde (como se describe en la presente). Los conectores, grupos quelantes y porciones molde opcionales se eligen de manera de formar un ligando octadentado apropiado.

R_c representa una porción de acoplamiento, como se describe más adelante. Las porciones adecuadas incluyen a grupos hidrocarbilo tales como grupos alquilo o alquenilo que terminan en un grupo ácido carboxílico. Los presentes inventores han establecido que el uso de una porción de conexión de ácido carboxílico para formar una amida, tal como mediante los métodos de la presente invención, provee una conjugación más estable entre el quelante y la porción de direccionamiento a tejido.

En una forma de realización preferida las porciones $-OH$ y $=O$ de fórmula II residen en átomos vecinos del anillo de piridina, de forma que los derivados 2,3-, 3,2-; 4,3-; y 3,4-hidroxipiridinona son todos altamente estables. El grupo R_N es un sustituyente metilo.

En una forma de realización preferida, hay presentes cuatro porciones 3,2- hidroxipiridinona en la estructura del ligando octadentado.

Los grupos quelantes más preferidos son aquellos de fórmula (IIa):



(IIa)

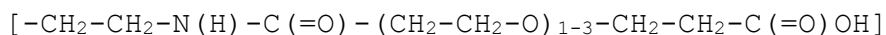
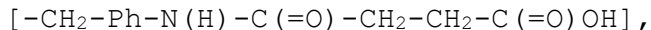
Tal como se usa en la presente, el término "porción conectora" (R_L en la fórmula (II) y la fórmula (IIa)) se usa para indicar una entidad química que sirve para unir por lo menos dos grupos quelantes en los ligandos octadentados, que forman un componente clave en diversos aspectos de la invención. Las porciones conectoras también pueden unirse a la porción conectora que sirve para acoplar la porción del ligando octadentado a la porción de direccionamiento a tejido. Típicamente, cada grupo quelante (por ejemplo aquellos de fórmula (I) y/o (II) y/o (IIa) previos) serán bidentados y por lo tanto típicamente habrá presentes cuatro grupos quelantes HOPO en el ligando. Dichos grupos quelantes se unen entre sí por medio de sus porciones conectoras y se acoplan a la porción de direccionamiento a tejido (en el método de la presente invención) por medio de una porción de acoplamiento. Por lo tanto, una porción conectora (por ejemplo el grupo R_L en la fórmula (II)) puede estar compartida entre más de un grupo quelante de fórmula (I) y/o (II). Las porciones conectoras también pueden servir como

punto de unión entre la parte complejante del ligando octadentado y la porción de direccionamiento. En dicho caso, por lo menos una porción conectora se unirá a una porción de acoplamiento (R_c en la fórmula (II)). Las porciones conectoras adecuadas incluyen a grupos hidrocarbilo cortos, tales como C_1 a C_{12} hidrocarbilo, incluyendo el grupo C_1 a C_{12} alquilo, alqueno o alquino, incluyendo metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y/o hexilo de todas las tipologías. Otros grupos que pueden estar comprendidos en las porciones conectoras (R_L) incluyen a cualquier grupo funcional robusto adecuado tal como los grupos arilo (por ejemplo grupos fenilo), amidas, aminas (especialmente secundarias o terciarias) y/o éteres. Las porciones R_c también pueden comprender secciones alquilo y/o arilo y opcionalmente grupos tales como amina, amida y conexiones éter. En general, todos los componentes de la porción conectora necesitarán ser robustos ante las condiciones de almacenamiento a las que someterá el complejo. Esto incluye radiolisis alfa y por lo tanto no se prefieren los grupos funcionales lábiles.

En una forma de realización, la porción conectora comprende un ácido carboxílico terminal, por lo menos una porción alquilo (por ejemplo una porción metilo o etilo), por lo menos una amida y por lo menos una porción arilo (por ejemplo un grupo fenilo). La porción

conectora se puede unir a una o más porciones conectoras del ligando octadentado por medio de un enlace carbono-carbono, una amida, una amina y/o una conexión éter.

En la forma de realización más preferida de esta invención, la porción conectora (R_c) que conecta el ligando octadentado a la porción de direccionamiento se elige de



o

$[-[CH_2]_{1-3}-Ar-N(H)-C(=O)-[CH_2]_{1-5}-C(=O)OH]$, en donde Ar es un grupo aromático tal como un grupo fenileno sustituido o sin sustituir y Ph es un grupo fenileno, preferiblemente un grupo para-fenileno.

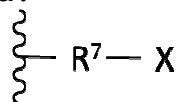
Las porciones conectoras pueden ser o comprender cualquier otra conexión química robusta adecuada incluyendo grupos ésteres, éteres, amina y/o amida. El número total de átomos que conectan dos porciones quelantes (dando cuenta de la distancia más corta si existe más de una distancia) en general será limitado, de forma de restringir las porciones quelantes en un arreglo adecuado para la formación del complejo. Por lo tanto, las porciones conectoras típicamente se elegirán para proveer no más de 15 átomos entre porciones quelantes, preferiblemente, entre 1 y 12 átomos, y más

preferiblemente entre 1 y 10 átomos entre porciones quelantes. Cuando una porción conectora une dos porciones quelantes directamente, el conector típicamente tendrá entre 1 y 12 átomos de longitud, preferiblemente entre 2 y 10 (tales como etilo, propilo, n-butilo etc). Cuando la porción conectora se une a un molde central (véase más adelante) entonces cada conector puede ser más corto con dos conectores separados que unen las porciones quelantes. Una longitud de conector de entre 1 y 8 átomos, preferiblemente entre 1 y 6 átomos puede ser preferida en este caso (en donde metilo, etilo y propilo son adecuados, como la de grupos tales como estos que tienen una unión éster, éter o amida en uno o ambos extremos).

Además de la porción conectora, que principalmente sirve para unir los diferentes grupos quelantes del ligando octadentado entre sí y/o a un molde central, el ligando octadentado además comprende una porción de acoplamiento (R_c) con un ácido carboxílico terminal. La función de la porción conectora es la de conectar el ligando octadentado a la porción de direccionamiento a través de un enlace covalente estable, especialmente una amida. Preferiblemente, las porciones de acoplamiento se conectarán covalentemente a los grupos quelantes, ya sea por unión covalente directa a uno de

los grupos quelantes o más típicamente por unión a una porción conectora o molde. Si se usan dos o más porciones de acoplamiento, cada una puede unirse a cualquiera de los sitios disponibles tales como cualquier molde, conector o grupo quelante.

En una forma de realización, la porción conectora puede tener la estructura:



en donde R^7 es una porción puente, que es un miembro que se elige de alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir; y X es una porción de direccionamiento unida por una amida o un ácido carboxílico o grupo funcional equivalente. Las porciones puente preferidas incluyen a todos aquellos grupos que se indican en la presente como porciones conectoras adecuadas.

Las porciones de direccionamiento preferidas incluyen a todas aquellas que se describen en la presente y los grupos X reactivos preferidos incluyen a cualquier grupo capaz de actuar como un "ácido carboxílico" en la formación de una conexión covalente amida a una porción de direccionamiento, incluyendo, por ejemplo, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NHR}$ y grupos en donde la R de NHR puede ser H o cualquiera de los grupos hidrocarbilo

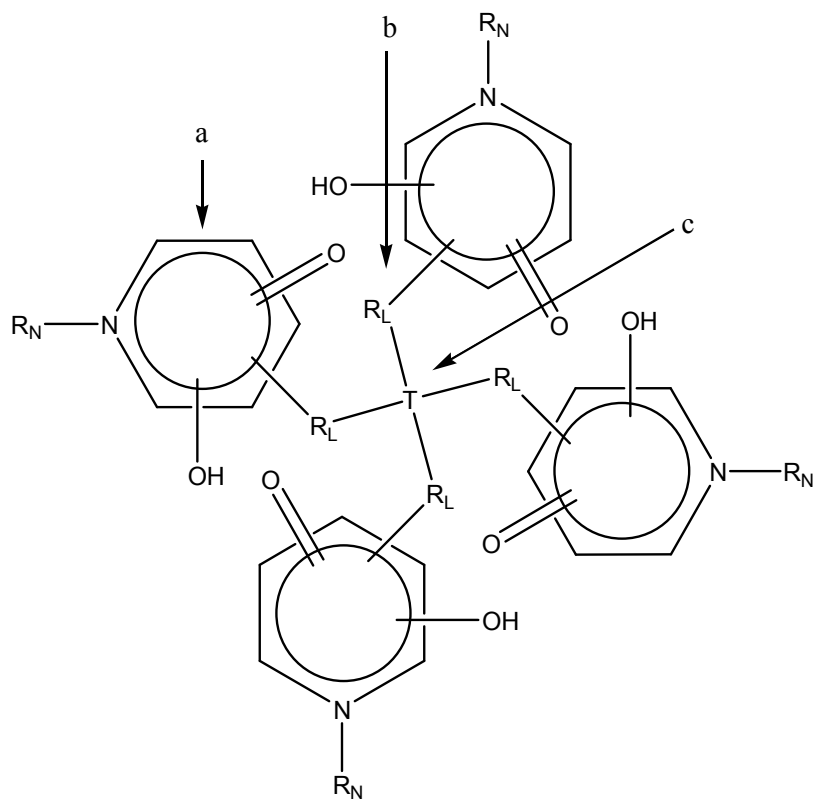
cortos que se describen en la presente. Los grupos altamente preferidos para unión a una porción de direccionamiento incluyen a las épsilon-aminas de los residuos de lisina. Los ejemplos no limitantes de grupos X reactivos adecuados, incluyen a ésteres de N-hidroxisuccimidilo, imido ésteres, harulos de acilo, N-maleimidas, y alfa-halo acetilo.

En una forma de realización preferida de esta invención la porción puente R^7 se elige para ser arilo sustituido y la porción conectora (R_c) que conecta el ligando octadentado a la porción de direccionamiento se elige de $[-C(=O)-CH_2CH_2-X-]$ con lo que el grupo carboxilato libre sobre el ligando HOPO se activa *in situ* en la forma de un éster de N-hidroxisuccinimida en solución acuosa inmediatamente antes de la conjugación a la porción de direccionamiento.

La porción conectora preferiblemente se une, de forma que el ligando octadentado acoplado resultante será capaz de someterse a formación de complejos estables con iones metálicos. La porción conectora por lo tanto preferentemente se conectará al conector, molde o porción quelante en un sitio en donde no interfiere en forma significativa con la complejación. Dicho sitio preferiblemente estará en el conector o molde, más preferiblemente en una posición distante de la superficie que se une al blanco.

Cada porción de fórmula (I) o (II) o (IIa) en el ligando octadentado se puede unir al resto del ligando mediante cualquier grupo conector apropiado como se describe en la presente y en cualquier topología apropiada. Por ejemplo, se pueden unir cuatro grupos de fórmula (I) y/o (II) y/o (IIa) mediante sus grupos conectores a un esqueleto, de manera de formar un ligando lineal, o se pueden puentear mediante grupos conectores para formar una estructura de tipo "oligómero", que puede ser lineal o cíclica. Como alternativa, las porciones de ligando de fórmulas (I) y/o (II) y/o (IIa) se pueden unir en una topología "cruzada" o "en estrella" a un átomo o grupo central, cada una mediante un conector (por ejemplo la porción " R_L "). Las porciones conectoras (R_L) se pueden unir solamente a través de enlaces carbono-carbono, o pueden unirse entre sí, a otros grupos quelantes, a un esqueleto, molde, porción conectora u otro conector mediante cualquier funcionalidad robusta adecuada incluyendo a una amina, amida, éter o enlace tioéter.

Un arreglo "en estrella" se indica en la fórmula (III) siguiente:



(III)

En donde todos los grupos y posiciones son como se indicó previamente y "T" es además un átomo o grupo molde central, tal como un átomo de carbono, cadena de hidrocarbilo (tal como cualquiera de las que se describe en la presente previamente), anillo alifático o aromático (incluyendo anillos heterocíclicos) o sistema anular fusionado. El molde más básico sería un carbono individual, que luego se uniría a cada una de las porciones quelantes mediante sus grupos conectores. Las cadenas más largas, tales como etilo o propilo, son igualmente viables con dos porciones quelantes uniendo cada extremo del molde. Evidentemente, se puede usar

conexión robusta adecuada en la unión del molde y las porciones conectoras incluyendo enlaces carbono-carbono, enlaces éster, éter, amina, amida, tioéter o disulfuro.

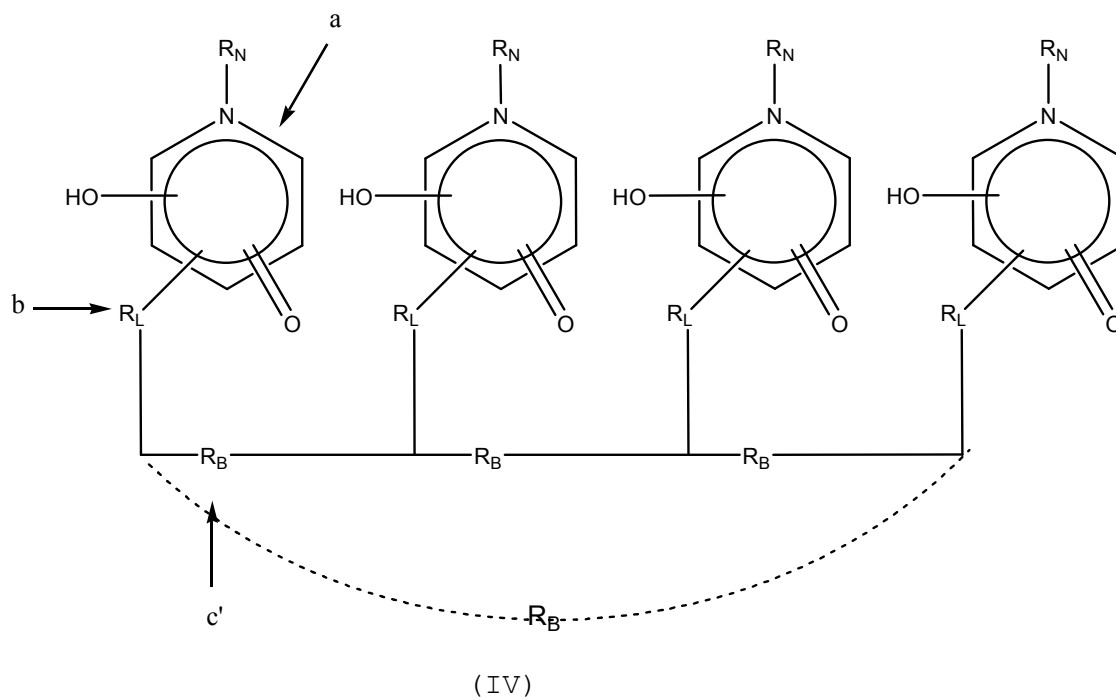
Evidentemente, en las estructuras de fórmula (II), (III), (IV) y (IVb), aquellas posiciones del anillo de la o las piridina que no están sustituidas (por ejemplo con una porción conectora o porción de acoplamiento) pueden portar sustituyentes descritos para R^1 a R^5 en la fórmula (I), según sea apropiado. En particular, puede haber presentes sustituyentes alquilo pequeños, tales como grupos metilo, etilo o propilo en cualquier posición.

El ligando octadentado además comprenderá por lo menos una porción conectora como se describió previamente. Ésta puede ser cualquier estructura adecuada incluyendo cualquiera de las indicadas en la presente y terminarán con la porción de direccionamiento, en los complejos finales o un ácido carboxílico en los métodos de la presente invención.

La porción conectora puede conectarse a cualquier punto adecuado del conector, molde o porción quelante, tal como en los puntos, *b* y/o *c* como se indica en la fórmula (III). La unión de la porción conectora puede ser mediante cualquier conexión robusta adecuada tal como enlaces carbono-carbono, enlaces éster, éter,

amina, amida, tioéter o disulfuro. De forma similar, los grupos capaces de formar cualquiera de dichas conexiones con la porción de direccionamiento son adecuados para el extremo funcional de la porción conectora, y esa porción terminará con dichos grupos cuando se unen a la parte blanco.

Una estructura de tipo "esqueleto" alternativa se indica más adelante en la fórmula (IV)



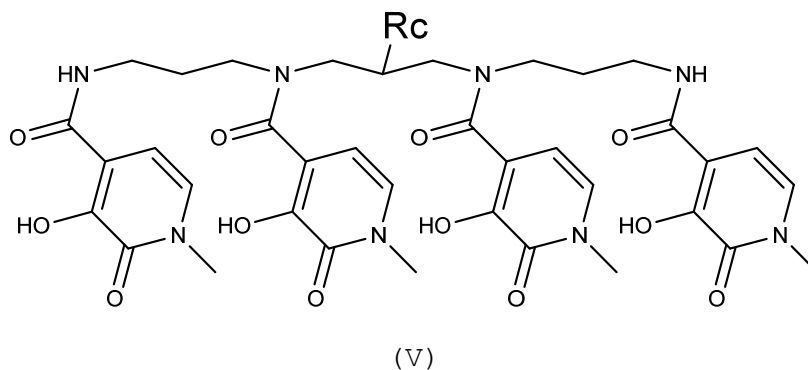
En donde todos los grupos y posiciones son como se indicó previamente y "R_B" es además una porción esqueleto, que típicamente tendrá una estructura y función similar a cualquiera de las porciones conectoras como se indica en la presente, y por lo tanto cualquier definición de una porción conectora puede aplicarse a la porción esqueleto cuando el

contexto lo permita. Las porciones esqueleto adecuadas formarán un andamiaje a donde las porciones quelantes se unen por medio de sus grupos conectores. Usualmente, se requieren tres o cuatro porciones esqueleto. Típicamente esto será tres para un esqueleto lineal o cuatro si el esqueleto es cíclico. Las porciones esqueleto particularmente preferidas incluyen a cadenas hidrocarbonadas cortas (tales como las que se describen en la presente) opcionalmente con un heteroátomo o porción funcional en uno o ambos extremos. Los grupos amina y amida son particularmente adecuados a este respecto.

La porción conectora puede unirse a cualquier punto adecuado del conector, esqueleto o porción quelante, tal como en los puntos *a*, *b* y/o *c'* como se indica en la fórmula (IV). La unión de la porción conectora puede ser mediante cualquier conexión robusta adecuada tal como enlaces carbono-carbono, enlaces éster, éter, amina, amida, tioéter o disulfuro. De forma similar, los grupos capaces de formar cualquiera de dichas conexiones a la porción de direccionamiento son adecuados para el extremo funcional de la porción conectora y esa porción terminará en dichos grupos cuando se una a la parte blanco.

Un ejemplo de un ligando octadentado de tipo "esqueleto" que tiene cuatro porciones quelantes 3,2-

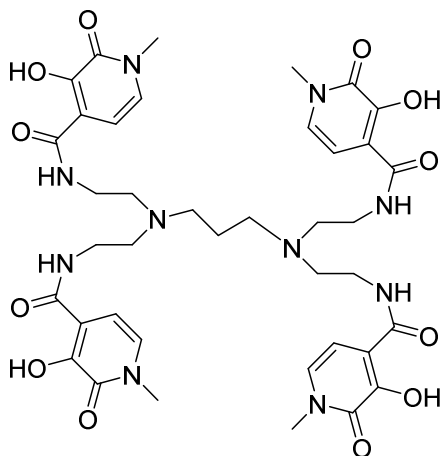
HOPPO unidas a un esqueleto por grupos conectores amida tendrá la fórmula (V) como sigue:



Evidentemente, puede agregarse una porción de acoplamiento R_c en cualquier punto adecuado de esta molécula, tal como en uno de los grupos amina secundarios o en un punto de ramificación o cualquiera de los grupos alquilo de esqueleto. Un sitio preferido para el grupo R_c se muestra en la fórmula (V). R_c terminará en un ácido carboxílico, o se unirá por medio de una conexión de amida a la porción de direccionamiento a tejido en aspectos adecuados de la invención. Todos los grupos alquilo pequeños tales como el propileno de esqueleto o los grupos etileno n -sustituyentes pueden sustituirse con otros alquilenos pequeños tales como cualquiera de los que se describe en la presente (metileno, etileno, propileno, y butileno siendo altamente adecuados entre los mismos).

Los ejemplos de ligandos octadentados "moldeados", que tienen cada una cuatro 3,2-HOPPO porciones quelantes

conectadas por grupos etilamida a etil y propildiamina respectivamente tendrían la fórmula (VI) como sigue:



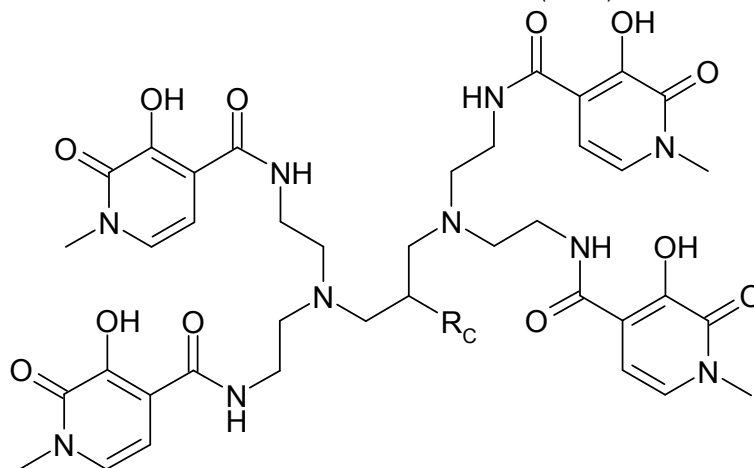
(VI)

Evidentemente, ninguno de los grupos alquileo, que se muestran en la fórmula (VI) como porciones etileno puede sustituirse en forma independiente con otros grupos alquileo pequeños tales como metileno, propileno o n-butileno. Es beneficioso retener la simetría de forma que se prefiere la cadena de propileno C₃ central mientras que permanecen los otros grupos etileno, o se pueden reemplazar los dos etilenos que conectan las porciones HOPO a una o ambas aminas terciarias centrales por metileno o propileno.

La Fórmula (VIb) muestra una posición posible para la porción conectora R_C, que estará presente en la fórmula (VI) en cualquier posición apropiada, tal como un grupo -CH-.

Como se indicó previamente, el ligando octadentado típicamente incluirá a una porción de acoplamiento que

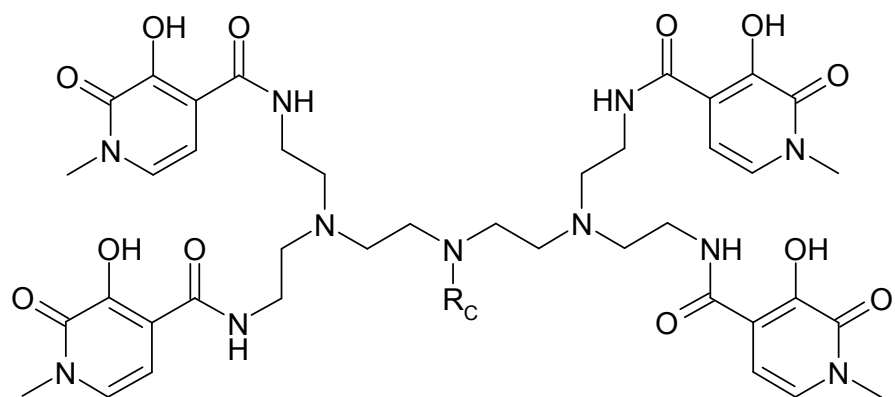
se puede unir al resto del ligando en cualquier punto. Un punto adecuado para la unión de la porción conectora se muestra más adelante en la fórmula (VIb):



(VIb)

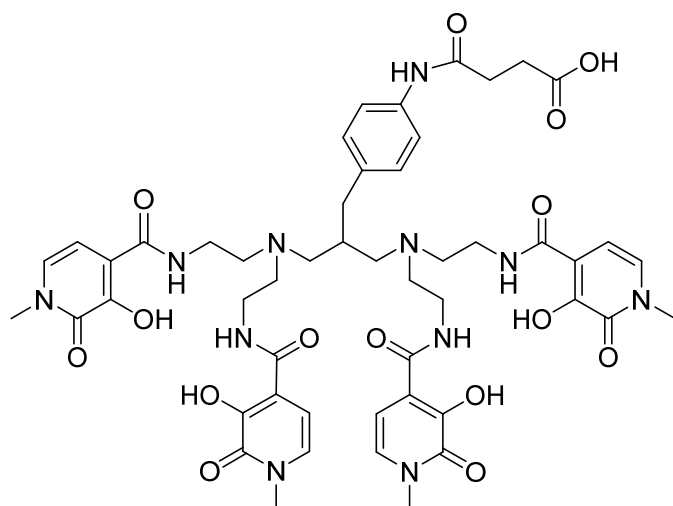
en donde R_C es cualquier porción de acoplamiento adecuada, particularmente para la unión a un grupo de direccionamiento a tejido a través de un grupo amida. Un grupo hidrocarbilo corto tal como un grupo aromático o alifático de C_1 a C_8 cíclico, de cadena ramificada o lineal que termina en un ácido o grupo activo equivalente para la formación de una amida a la porción de direccionamiento a tejido, es altamente adecuado como grupo R_C en la fórmula (VIb) y a lo largo de la presente.

Los ejemplos de moldes también incluyen a otros mediante los que el grupo de acoplamiento R_C se conecta covalentemente a un átomo de nitrógeno en el esqueleto amino como se muestra en la fórmula (VII).

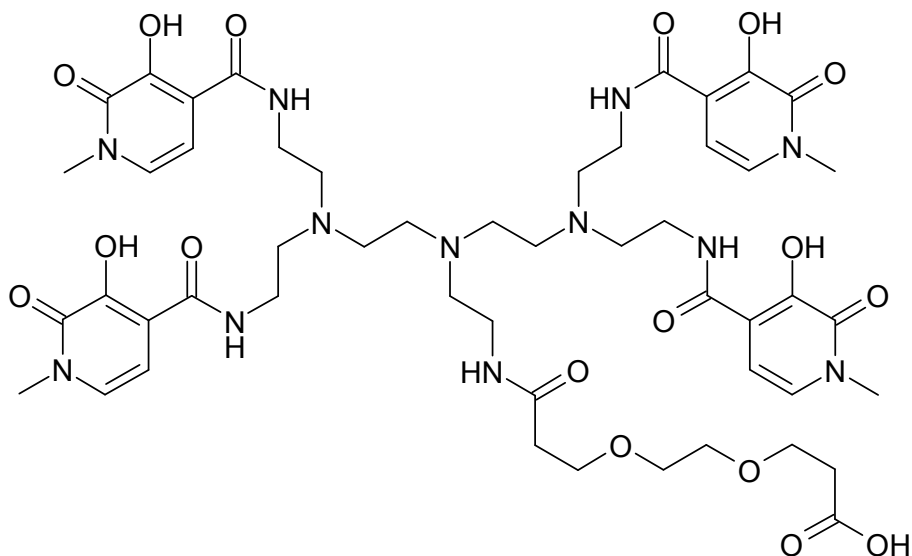


(VII)

Los ligandos octadentados altamente preferidos que muestran sitios adecuados para la unión a ligando incluyen a aquellos de fórmulas (VIII) y (IX) siguientes:



(VIII)



(IX)

La síntesis de compuesto (VIII) se describe en la presente más adelante y sigue la ruta sintética que se describe en la presente más adelante.

AGC0019, y los compuestos de fórmulas (VI), (VIb), (VII), (VIII) y (IX) forman quelantes octadentados preferidos que tienen porciones conectoras que terminan en grupos ácidos carboxílicos. Los ligandos octadentados que se muestran en esas estructuras y las porciones conectora mostradas también forman ejemplos preferidos de su tipo y se pueden combinar en cualquier forma. Dichas combinaciones serán evidentes para la persona con experiencia en el arte.

El paso a) de los métodos de la presente invención se puede llevar a cabo por cualquier ruta sintética adecuada. Típicamente esto implicará la conexión a

cuatro porciones HOPO (tales como aquellas de fórmulas (I) y/o (II) y/o (IIa)) por medio de un grupo de conexión, a una porción de acoplamiento, opcionalmente por medio de un molde. Todos estos grupos se describen en la presente y las formas de realización preferidas son equivalentemente preferidas en este contexto. El acoplamiento entre las porciones HOPO, conectores, porción conectora y opcionalmente molde típicamente será por medio de un grupo robusto tal como una amida, amina, éter o enlace carbono-carbono. Los métodos para la síntesis de dichos enlaces y cualquier estrategia protectora necesaria son bien conocidos en el arte de la química sintética. Algunos ejemplos específicos de métodos sintéticos se dan a continuación en los siguientes Ejemplos. Dichos métodos proveen ejemplos específicos, pero los métodos sintéticos que se ilustran también se podrán usar en un contexto general por parte de las personas con experiencia en el arte. Los métodos que se ilustran en los Ejemplos por lo tanto también pretenden ser divulgaciones generales que pueden aplicarse a todos los aspectos y formas de realización de la invención cuando el contexto lo permita.

Es preferible que los complejos de torio emisor alfa y un ligando octadentado en todos los aspectos de la presente invención se formen o sean formable sin

calentar por arriba de 60°C (por ejemplo sin calentar por arriba de 50°C), preferiblemente sin calentar por arriba de 38°C y más preferiblemente sin calentar por arriba de 25°C (tal como en el rango entre 20 y 38°C). Los rangos típicos pueden ser, por ejemplo entre 15 y 50 °C o entre 20 y 40°C. La reacción de complejación (parte c)) en los métodos de la presente invención) se puede llevar a cabo durante cualquier periodo razonable, pero preferentemente será de entre 1 y 120 minutos, preferiblemente entre 1 y 60 minutos, y más preferiblemente entre 5 y 30 minutos.

Además es preferible que el conjugado de la porción de direccionamiento y el ligando octadentado se preparen antes del agregado del isótopo de torio emisor alfa (por ejemplo ion $^{227}\text{Th}^{4+}$). Los productos de la invención por lo tanto preferiblemente se forman o son formables por la complejación de isótopo de torio emisor alfa (por ejemplo ion $^{227}\text{Th}^{4+}$) mediante un conjugado de un ligando octadentado y una porción de direccionamiento a tejido (el quelante de direccionamiento a tejido).

Se pueden conectar diversos tipos de compuestos de direccionamiento al torio (por ejemplo torio-227) a través de un quelante octadentado (que comprende una porción de acoplamiento como se describe en la presente). La porción de direccionamiento se puede

seleccionar de grupos de direccionamiento conocidos, que incluyen a anticuerpos monoclonales o policlonales, factores de crecimiento, péptidos, hormonas y análogos de hormona, derivados de folato, biotina, avidina y estreptavidina o análogos de los mismos. Otros posibles grupos de direccionamiento incluyen a ARN, ADN, o fragmentos de los mismos adecuados funcionalizados (tales como un aptámero), oligonucleótidos, hidratos de carbono, lípidos o compuestos hechos por combinación de dichos grupos con o sin proteínas etc. Pueden incluirse grupos PEG como se indicó previamente, de forma de incrementar el tiempo de retención biológico y/o reducir la estimulación inmune.

En general, tal como se usa en la presente, las porciones de direccionamiento a tejido serán "péptidos" o "proteínas", siendo estructuras formadas principalmente por un esqueleto de amida entre componentes aminoacídicos ya sea con o sin características de estructura secundaria y terciaria.

La porción de direccionamiento a tejido puede, en una forma de realización, excluir buscadores de huesos, liposomas y anticuerpos o fragmentos de anticuerpo conjugados a folato.

De acuerdo a esta invención, el ^{227}Th se puede complejar mediante agentes complejantes de direccionamiento unidos o unibles mediante una conexión

de amida a las porciones de direccionamiento a tejido, como se describe en la presente. Típicamente las porciones de direccionamiento tendrán un peso molecular entre 100 g/mol y varios millones de g/mol (particularmente entre 100 g/mol y 1 millón de g/mol), y preferiblemente tendrán afinidad por un receptor relacionado con la enfermedad directamente, y/o comprenderán un aglutinante adecuado preadministrado (por ejemplo biotina o avidina) unido a una molécula que se ha direccionado hacia la enfermedad antes de administrar el ^{227}Th . Las porciones de direccionamiento adecuadas incluyen a poli y oligopéptidos, proteínas, fragmentos de ADN y ARN, aptámeros etc, preferiblemente una proteína, por ejemplo avidina, estreptavidina, un anticuerpo policlonal monoclonal (incluyendo anticuerpos de tipo IgG e IgM), o una mezcla de proteínas o fragmentos o construcciones de proteínas. Los anticuerpos, construcciones de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo fragmentos Fab o cualquier fragmento que comprenda por lo menos una región de unión a antígeno), construcciones de fragmentos (por ejemplo anticuerpos de cadena individual) o una mezcla de los mismos, son particularmente preferidos. Los fragmentos adecuados particularmente incluyen a Fab, F(ab')_2 , Fab' y/o scFv.

Las construcciones de anticuerpo pueden ser cualquier anticuerpo o fragmento indicado en la presente.

En una primera forma de realización de direccionamiento que puede aplicarse a todos los aspectos de la invención, el unidor específico (porción de direccionamiento a tejido) se puede elegir para que se dirija al receptor CD22. Dicha porción de direccionamiento a tejido puede ser un péptido con similitud o identidad de secuencia con por lo menos una secuencia como se establece a continuación:

Cadena Liviana:

Murina

DIQLTQSPSSLAVSAGENVTMSC**KSSQSVLYSANHKNYLA**WYQQKP

GQSP

Humanizada-----SA-V-DR-----

-----KA

Murina

KLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGTDFTLTISRVQVEDLAIYYCHQ

YLSS

Humanizada-----S--S-----F---SL-P--I-

T-----

Murina **WT**FGGGTKLEIKR (SeqID1)

Humanizada----- (SeqID2)

Cadena Pesada:

Murina

QVQLQESGAELSKPGASVKMSCKASGYTFT**SYWLH**WIKQRPGQGLE

WIG

Humanizada1 -----Q-----VK---S---V-----

-VR-A-----

Humanizada2 ----VQ-----VK---S---V-----

-VR-A-----

Murina

YINPRNDYTEYNQNFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY

CAR

Humanizada1 -----I---E-TN----E--

--R---T-F-F---

Humanizada2 -----I---E-TN----E--

--R---T-F-F---

Murina **RDITTFY**WGQGTTLTVSS (SeqID3)

Humanizada1 -----V---- (SeqID4)

Humanizada2 -----V---- (SeqID5)

En las secuencias anteriores, "-" en las secuencias Humanizadas (Humanizada) indica que el residuo está inalterado a partir de la secuencia murina.

En las secuencias previas (SeqID1-5), las regiones en negritas se cree que son las regiones específicas de unión claves (CDRs), las regiones subrayadas se cree que tienen importancia secundaria en la unión, y las

regiones sin destacar se cree que representan regiones estructurales, más que específicas de unión.

En todos los aspectos de la invención, la porción de direccionamiento a tejido puede tener una secuencia que tiene identidad de secuencia sustancial o similitud de secuencia sustancial con por lo menos una o cualquiera de aquellas secuencias que se establecen en Seq ID 1- 5. Una identidad/similitud de secuencia sustancial se puede considerar al tener una similitud/identidad de secuencia de por lo menos 80% con las secuencias completas y/o por lo menos 90% con las regiones específicas de unión (aquellas regiones que se muestran en negritas en las secuencias previas y opcionalmente aquellas secciones subrayadas). La similitud o más preferiblemente la identidad de secuencia preferible puede ser por lo menos 92%, 95%, 97%, 98% o 99% para las regiones en negritas y preferiblemente también para las secuencias completas. La similitud y/o identidad de secuencia pueden determinarse usando el programa "BestFit" del paquete de programas Genetics Computer Group Version 10 de la University of Wisconsin. El programa usa el algoritmo de alineamiento local de Smith y Waterman con valores por omisión: penalidad por creación de no coincidencia= 8, penalidad por extensión de no coincidencia =2,

Coincidencia promedio= 2,912, no coincidencia promedio 2,003.

Una porción de direccionamiento a tejido puede comprender más de una secuencia peptídica, en cuyo caso por lo menos una, y preferiblemente todas las secuencias pueden (independientemente) cumplir la similitud de secuencia y preferiblemente identidad de secuencia descritas previamente y con cualquiera de Seq ID 1-5.

Una porción de direccionamiento a tejido puede tener una afinidad de unión por CD22 y en una forma de realización también puede tener una secuencia con hasta aproximadamente 40 variaciones para los dominios completos (preferiblemente entre 0 y 30 variaciones). Las variantes pueden ser por inserción, eliminación y/o sustitución y pueden ser contiguas o no contiguas con respecto a las Seq ID 1-5. Las sustituciones o inserciones típicamente serán de por medio de por lo menos uno de los 20 aminoácidos del código genético, y las sustituciones más generalmente serán sustituciones conservativas.

En una segunda forma de realización de direccionamiento que puede aplicarse a todos los aspectos de la invención, el unidor específico (porción de direccionamiento a tejido) se puede elegir para que se dirija al receptor CD33. Dicha porción de

direccionamiento a tejido puede ser un anticuerpo monoclonal y se puede elegir para ser lintuzumab o lintuzumab con un residuo extra de lisina en el extremo C-terminal.

En una tercera forma de realización de direccionamiento que puede aplicarse a todos los aspectos de la invención, el unidor específico (porción de direccionamiento a tejido) se puede elegir para que se dirija al antígeno HER-2. La porción de direccionamiento a tejido puede ser un anticuerpo monoclonal y preferiblemente es trastuzumab.

Otras secuencias de anticuerpo adecuadas para el direccionamiento de FGFR2, Mesotelina y PSMA se ejemplifican en la sección de ejemplos. Sin embargo ha de ser obvio para una persona con experiencia en el arte que cualquier formato de proteína que se sepa que se dirige a un blanco específico de enfermedad que contiene un residuo de lisina en la secuencia, será un candidato para los métodos de esta invención y correspondientemente puede aplicarse a todos los otros aspectos.

Con respecto al componente de torio emisor alfa, es un hallazgo reciente clave de que ciertos isótopos de torio alfa radiactivos (por ejemplo ^{227}Th) se pueden administrar en una cantidad que es terapéuticamente eficaz y además que no genera una mielotoxicidad

intolerable. El torio-227 (^{227}Th) es el isótopo preferido de torio en todos los aspectos de la presente invención. Tal como se usa en la presente, el término "aceptablemente no mielotóxico" se usa para indicar que, más importantemente, la cantidad de Radio-223 que se genera por el decaimiento del radioisótopo de torio-227 administrado en general no es suficiente para ser directamente letal para el sujeto. Ha de ser claro para la persona con experiencia en el arte, sin embargo, que la cantidad de daño a la médula (y la probabilidad de una reacción letal) que será un efecto secundario aceptable de dicho tratamiento, variará en forma significativa con el tipo de enfermedad tratada, los objetivos del régimen de tratamiento, y la prognosis para el sujeto. A pesar de que los sujetos preferidos para la presente invención son humanos, otros mamíferos, particularmente animales de compañía como perros, se beneficiarán a partir del uso de la invención, y el nivel de daño medular aceptable también puede ser un reflejo de la especie del sujeto. El nivel de daño medular aceptable en general será mayor en el tratamiento de una enfermedad maligna que para una enfermedad no maligna. Una medida conocida del nivel de mielotoxicidad es el conteo de neutrófilos y, en la presente invención, una cantidad de ^{223}Ra aceptablemente no mielotóxica será típicamente una cantidad controlada

de tal forma que la fracción de neutrófilos en su punto inferior (nadir) no es menos de 10% del conteo antes del tratamiento. Preferiblemente, la cantidad de ^{223}Ra aceptablemente no mielotóxica será una cantidad tal que la fracción de células neutrofílicas es por lo menos 20% del nadir y más preferiblemente por lo menos 30%. Una fracción de células neutrofílicas nadir de por lo menos 40% y lo más preferido.

Además, se pueden usar compuestos que contienen torio radioactivo (por ejemplo ^{227}Th) en regímenes de altas dosis, en donde la mielotoxicidad del radio (por ejemplo ^{223}Ra) que se genera normalmente sería intolerable cuando se incluye un apoyo con células madres o un método de recuperación comparable. En dichos casos, el conteo de células neutrofílicas se puede reducir por debajo de 10% en el nadir y excepcionalmente se reducirá a 5% o si es necesario menos de 5%, con la condición que se tomen precauciones adecuadas y se dé un subsiguiente apoyo con células madre. Dichas técnicas son bien conocidas en el arte.

Un isótopo de torio de particular interés en la presente invención es el torio-227, y el torio-227 es el isótopo preferido para todas las referencias al torio en la presente cuando el contexto lo permita. El torio-227 es relativamente fácil de producir y se puede preparar indirectamente a partir de ^{226}Ra irradiado con

neutrones, el que contendrá un núclido madre de ^{227}Th , es decir ^{227}Ac ($T_{1/2} = 22$ años). El actinio-227 se puede separar fácilmente del ^{226}Ra blanco y usarse como un generador de ^{227}Th . Este proceso se puede llevar a escala industrial si es necesario, y así se puede evitar el problema de aprovisionamiento que se encuentra con la mayoría de los otros candidatos emisores alfa considerados para la radioterapia dirigida por moléculas.

El torio-227 decae a través de radio-223. En este caso, el hijo primario tiene una vida media de 11,4 días. A partir de una fuente pura de ^{227}Th , solo se producen cantidades moderadas de radio durante los primeros pocos días. Sin embargo, la toxicidad potencial del ^{223}Ra es mayor que la del ^{227}Th debido a que la emisión del ^{223}Ra de una partícula alfa es seguida, a los pocos minutos, por tres partículas alfa adicionales a partir de los hijos de corta vida media (véase la Tabla 2 siguiente que establece la serie de decaimiento para el torio-227).

Tabla 2

Núclido	Modo de decaimiento	Energía media por partícula (MeV)	Vida media
^{227}Th	α	6,02	18,72 días

^{223}Ra	α	5,78	11,43 días
^{219}Rn	α	6,88	3,96 segundos
^{215}Po	α	7,53	1,78 ms
^{211}Pb	β	0,45	36,1 minutos
^{211}Bi	α	6,67	2,17 minutos
^{207}Tl	β	1,42	4,77 minutos
^{207}Pb			Estable

Parcialmente debido a que genera productos de decaimiento potencialmente peligrosos, el torio-227 ($T_{1/2} = 18,7$ días) no se ha considerado ampliamente para terapia con partículas alfa.

Para distinguir a los complejos de torio complejos del isótopo de torio natural más abundante, es decir torio-232 (vida media de 1010 años y eficazmente no radiactivo), ha de comprenderse que los complejos de torio y las composiciones de los mismos que se reivindican en la presente incluyen al radioisótopo de torio emisor alfa (es decir por lo menos un isótopo de torio con una vida media de 103 años, por ejemplo torio-227) en una abundancia relativa mayor que la natural, por ejemplo por lo menos 20% mayor. Esto no necesita afectar la definición del método de la invención, en donde se requiere explícitamente una cantidad terapéuticamente eficaz de un torio

radiactivo, tal como torio-227, pero preferiblemente será el caso en todos los aspectos.

En todos los aspectos de la invención, es preferible que el ion de torio emisor alfa sea un ion de torio-227. El ion 4+ del torio es un ion preferible para usar en los complejos de la presente invención. Correspondientemente, el ion de 4+ del torio-227 es altamente preferido.

El torio-227 se puede administrar en cantidades suficientes para proveer efectos terapéuticos deseados sin generar tanto Radio-223 como para causar supresión por médula ósea intolerable. Es deseable mantener los isótopos hijos en la región blanco con lo que se pueden obtener efectos terapéuticos adicionales a partir de su decaimiento. Sin embargo, No es necesario mantener control de los productos de decaimiento del torio con el objetivo de tener un efecto terapéutico útil sin inducir una mielotoxicidad inaceptable.

Asumiendo que el efecto de muerte de las células tumorales será a partir del torio-227 y no a partir de sus isotopos de decaimiento, la dosis terapéutica probable de este isótopo puede establecerse por comparación con otros emisores alfa. Por ejemplo, para astatina-211, las dosis terapéuticas en animales han sido típicamente entre 2 y 10 MBq por kg. Mediante corrección por vida media y energía, la dosificación

correspondiente para el torio-227 sería por lo menos entre 36 y 200 kBq por kg de peso corporal. Esto establecería un límite inferior a la cantidad de ^{227}Th que se podría administrar útilmente en espera de un efecto terapéutico. Este cálculo asume una retención comparable de astatina y torio. Claramente, sin embargo la vida media de 18,7 días del torio resultará más probablemente en una mayor eliminación de este isótopo antes de su decaimiento. Esta dosificación calculada por lo tanto se debe considerar normalmente como la cantidad eficaz mínima. La dosis terapéutica expresada en términos de ^{227}Th totalmente retenido (es decir ^{227}Th que no se elimina del cuerpo) típicamente será por lo menos 18 o 25 kBq/kg, preferiblemente por lo menos 36 kBq/kg y más preferiblemente por lo menos 75 kBq/kg, por ejemplo 100 kBq/kg o más. Se espera que cantidades mayores de torio tengan mayor efecto terapéutico, pero las mismas no se pueden administrar si resultan en efectos secundarios intolerables. Igualmente, si se administra torio en una forma que tiene una vida media biológica corta (es decir la vida media antes de su eliminación del cuerpo que aún porta el torio), entonces se requerirán mayores cantidades de radioisótopo para un efecto terapéutico debido a que una gran parte del torio se eliminaría antes de que decaiga. Sin embargo, habrá una disminución

correspondiente en la cantidad de Radio-223 generado. Las cantidades anteriores de torio-227 a administrar cuando el isótopo se retiene completamente, se pueden relacionar fácilmente con dosis equivalentes con vidas medias biológicas más cortas. Dichos cálculos son bien conocidos en el arte y se dan en WO 04/091668 (por ejemplo en el texto y en los Ejemplos 1 y 2).

Si un compuesto radiomarcado libera nucleidos hijos, es importante conocer el destino, si es aplicable, de cualquier nucleido radiactivo hijo. Con el ^{227}Th , el principal producto derivado es ^{223}Ra , que está bajo evaluación clínica debido a sus propiedades de dañar al hueso. El Radio-223 se elimina de la sangre muy rápidamente y se concentra en el esqueleto o bien se excreta por vía intestinal y rutas renales (véase Larsen, J Nucl Med 43(5, Suplemento): 160P (2002)). El Radio-223 liberado *in vivo* a partir de ^{227}Th por lo tanto no puede afectar al tejido blando sano en una gran extensión. En este estudio de Müller en Int. J. Radiat. Biol. 20:233-243 (1971) sobre la distribución de ^{227}Th como sal de citrato disuelta, se halló que el ^{223}Ra generado a partir de ^{227}Th en los tejidos blancos se redistribuyó fácilmente a hueso o bien se excretó. La toxicidad conocida del radio emisor alfa, particularmente en médula ósea, es por lo tanto un tópico de interés para las dosificaciones de torio.

En WO 04/091668 se estableció por primera vez que, de hecho, una dosis de por lo menos 200 kBq/kg de ^{223}Ra puede ser administrada y tolerada en seres humanos. Estos datos se presentan en esa publicación. Por lo tanto, ahora se puede ver que, algo inesperadamente, existe una ventana terapéutica en donde se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ^{227}Th (tal como mayor que 36 kBq/kg) a un sujeto mamífero sin esperar que dicho sujeto sufra un riesgo inaceptable o incluso letal de mielotoxicidad. Sin embargo, es extremadamente importante que se haga el mejor uso de esta ventana terapéutica y por lo tanto es esencial que el torio radioactivo se compleje rápidamente y eficazmente, y que se mantenga con muy alta afinidad de forma que se administre la mayor proporción posible de la dosis al sitio blanco.

La cantidad de ^{223}Ra que se genera a partir de un fármaco con ^{227}Th dependerá de la vida media biológica del compuesto radiomarcado. La situación ideal sería usar un complejo con una captación tumoral rápida, incluyendo la internalización en la célula tumoral, una fuerte retención tumoral y una vida media biológica corta en los tejidos normales. Los complejos con vida media biológica menor que la ideal sin embargo pueden ser útiles siempre que la dosis de ^{223}Ra se mantenga dentro del nivel tolerable. La cantidad de Radio-223

que se genera *in vivo* dependerá de la cantidad de torio que se administra y del tiempo de retención biológico del complejo de torio. La cantidad de Radio-223 que se genera en cualquier caso particular se puede calcular fácilmente por parte de una persona con experiencia en el arte. La cantidad administrable máxima de ^{227}Th se determinará por la cantidad de radio que se genera *in vivo* y debe ser menor que la cantidad que producirá un nivel intolerable de efectos secundarios, particularmente mielotoxicidad. Esta cantidad en general será menos de 300kBq/kg, particularmente menos de 200 kBq/kg y más preferiblemente menos de 170 kBq/kg (por ejemplo menos de 130 kBq/kg). La dosis eficaz mínima será determinada por la citotoxicidad del torio, la susceptibilidad del tejido enfermo a la radiación alfa generada y el grado al cual el torio se combina eficazmente, se mantiene y se administra mediante el complejo de direccionamiento (siendo al combinación de ligando y la porción de direccionamiento en este caso).

En el método de la invención, el complejo de torio se administra deseablemente a una dosificación de torio-227 de entre 18 y 400 kBq/kg de peso corporal, preferiblemente entre 36 y 200 kBq/kg, (tal como entre 50 y 200 kBq/kg) más preferiblemente entre 75 y 170 kBq/kg, especialmente entre 100 y 130 kBq/kg. Correspondientemente, una dosificación individual puede

estar comprendida alrededor de estos rangos multiplicados por un peso corporal adecuado, tal como entre 30 y 150 Kg, preferiblemente entre 40 y 100 Kg (por ejemplo un rango entre 540 kBq y 4000 KBq por dosis etc). La dosificación de torio, el agente de complejación y la ruta de administración serán más deseables de forma que la dosificación de Radio-223 que se genera *in vivo* sea menos de 300 kBq/kg, más preferiblemente menos de 200 kBq/kg, aún más preferiblemente menos de 150 kBq/kg, especialmente menos de 100 kBq/kg. Otra vez, esto proveerá una exposición a ^{223}Ra que se calcula multiplicando estos rangos por cualquiera de los pesos corporales indicados. Los niveles previos de dosis preferiblemente son la dosis retenida completa de ^{227}Th , pero pueden ser la dosis administrada, teniendo en cuenta que algo del ^{227}Th se eliminará del cuerpo antes de que decaiga.

Cuando la vida media biológica del complejo de ^{227}Th es corta en comparación con la vida media física (por ejemplo menos de 7 días, especialmente menos de 3 días) se puede necesitar administrar dosis en forma significativamente mayores para proveer la dosis retenida equivalente. Por lo tanto, por ejemplo, una dosis retenida completa de 150 kBq/kg es equivalente a un complejo con una vida media de 5 días, administrado a una dosis de 711 kBq/kg. La dosis administrada

equivalente que se administra para cualquier dosis retenida adecuada se puede calcular a partir de la tasa de eliminación biológica del complejo usando métodos bien conocidos en el arte.

Debido a que el decaimiento del núcleo de ^{227}Th provee un átomo de ^{223}Ra , la retención y la actividad terapéutica del ^{227}Th estarán directamente relacionadas con la dosis de ^{223}Ra que recibe el paciente. La cantidad de ^{223}Ra que se genera en cualquier situación particular se puede calcular usando métodos bien conocidos.

En una forma de realización preferida, la presente invención por lo tanto provee un método para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto mamífero (como se describe en la presente), en donde dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un complejo de torio dirigido a tejido como se describe en la presente.

Obviamente es deseable minimizar la exposición de un sujeto al isótopo hijo ^{223}Ra , a menos que las propiedades de este sean empleadas útilmente. En particular, la cantidad de Radio-223 que se genera *in vivo* típicamente será mayor que 40 kBq/kg, por ejemplo mayor que 60 kBq/Kg. En algunos casos, será necesario

para el ^{223}Ra que se genera *in vivo* ser más de 80 kBq/kg, por ejemplo más de 100 o 115 kBq/kg.

Los conjugados marcados con torio-227 en soluciones transportadoras adecuadas se pueden administrar por vía intravenosa, intracavitaria (por ejemplo intraperitoneal), subcutánea, oral o tópica, como aplicación individual o bien en un régimen de aplicación fraccionada. Preferiblemente, los complejos conjugados a una porción de direccionamiento se administrarán como soluciones mediante ruta parenteral (por ejemplo transcutánea), especialmente intravenosa o por una ruta intracavitaria. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención se formularán en solución estéril para administración parenteral.

El torio-227 en los métodos y productos de la presente invención se puede usar solo o en combinación con otras modalidades de tratamiento incluyendo cirugía, terapia con radiación por rayos externos, quimioterapia, otros radionucleidos, o ajuste de la temperatura de tejido, etc. Esto forma otra forma de realización preferida del método de la invención y las formulaciones/medicamentos correspondientemente pueden comprender por lo menos un agente terapéuticamente activo adicional tal como otro agente radioactivo o agente quimioterapéutico.

En una forma de realización particularmente preferida, el sujeto también se somete a tratamiento con células madres y/o otra terapia de soporte para reducir los efectos de la mielotoxicidad inducida por radio-223.

Las moléculas de la invención marcadas con torio (por ejemplotorio-227) se pueden usar para el tratamiento de enfermedades cancerosas o no cancerosas mediante el direccionamiento a receptores relacionados con la enfermedad. Típicamente, dicho uso médico del ^{227}Th será por radioinmunoterapia basada en la conexión de ^{227}Th mediante un quelante a un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o una construcción de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo para el tratamiento de enfermedades cancerosas y no cancerosas. El uso de ^{227}Th en los métodos y fármacos de acuerdo a la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de cualquier forma de cáncer incluyendo carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias, especialmente cáncer de pulmón, mama, próstata, vejiga, riñón, estómago, páncreas, esófago, cerebro, ovario, útero, cáncer oral, cáncer colorrectal, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de no Hodgkin.

En una forma de realización adicional de la invención, los pacientes con enfermedad de tejido blando y esquelética pueden tratarse tanto con el ^{227}Th

como con el ^{223}Ra que se genera *in vivo* por el torio administrado. en este aspecto particularmente ventajoso, se obtiene un componente terapéutico extra para el tratamiento a partir de la cantidad no mielotóxica aceptable de ^{223}Ra por direccionamiento a la enfermedad esquelética. En este método terapéutico, el ^{227}Th típicamente se utiliza para tratar cáncer primario y/o cáncer metastásico de tejido blando por direccionamiento adecuado a los mismos y el ^{223}Ra que se genera por el decaimiento del ^{227}Th se utiliza para tratar la enfermedad esquelética asociada en el mismo sujeto. Esta enfermedad esquelética puede ser una metástasis a esqueleto a partir del cáncer primario en tejido blando, o puede ser la enfermedad primaria en donde del tratamiento de tejido blando es contra un cáncer metastásico. Ocasionalmente, las enfermedades de tejido blando y esquelética puede no estar relacionadas (por ejemplo el tratamiento adicional de una enfermedad esquelética en un paciente con una enfermedad reumatológica de tejido blando).

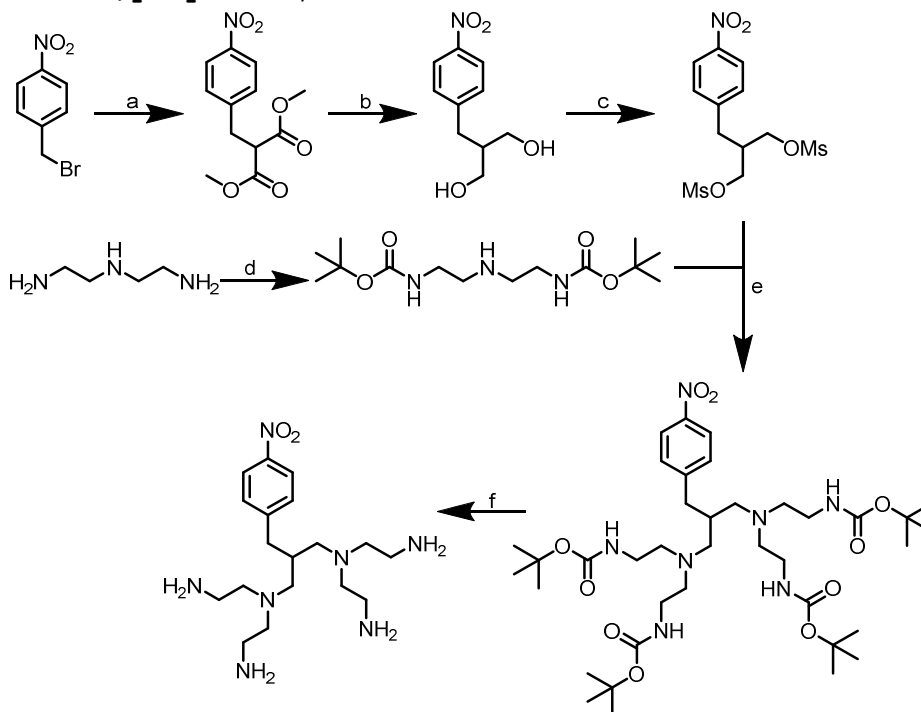
Las condiciones que son particularmente adecuadas para el tratamiento en los métodos, usos y otros aspectos de la presente invención incluyen a enfermedades neoplásicas e hiperplásicas tales como un carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma o cáncer de tipo mixto, incluyendo linfoma de no Hodgkin o

neoplasias de células B, cáncer de mama, endometrial, gástrico, leucemia mieloide aguda, de próstata o cerebro, mesotelioma, de ovario, pulmón o pancreático.

Más adelante se proveen algunos ejemplos de síntesis. Los pasos que se muestran en estas síntesis serán aplicables a muchas formas de realización de la presente invención. El paso a) por ejemplo, puede proceder a través del intermediario AGC0021 que se muestra más abajo en muchas o en todas las formas de realización que se describen en la presente.

Síntesis de intermediario clave AGC0020

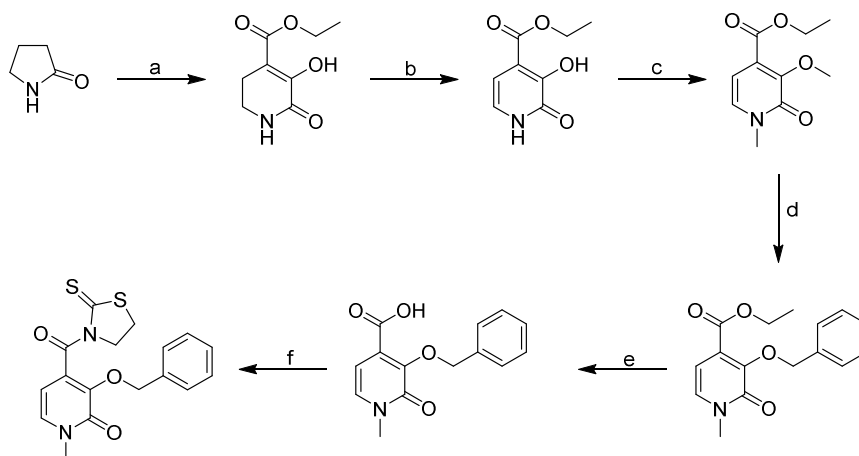
N,N,N',N'-tetraquis(2-aminoetil)-2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diamina



- a) Dimetilmalonato, hidruro de sodio, THF, b) DIBAL-H, THF, c) MsCl, Net3, CH2Cl2
d) Imidazol, Boc2O, tolueno, e) DIPEA, acetonitrilo, f) MeOH, agua, AcCl

Síntesis de intermediario clave AGC0021

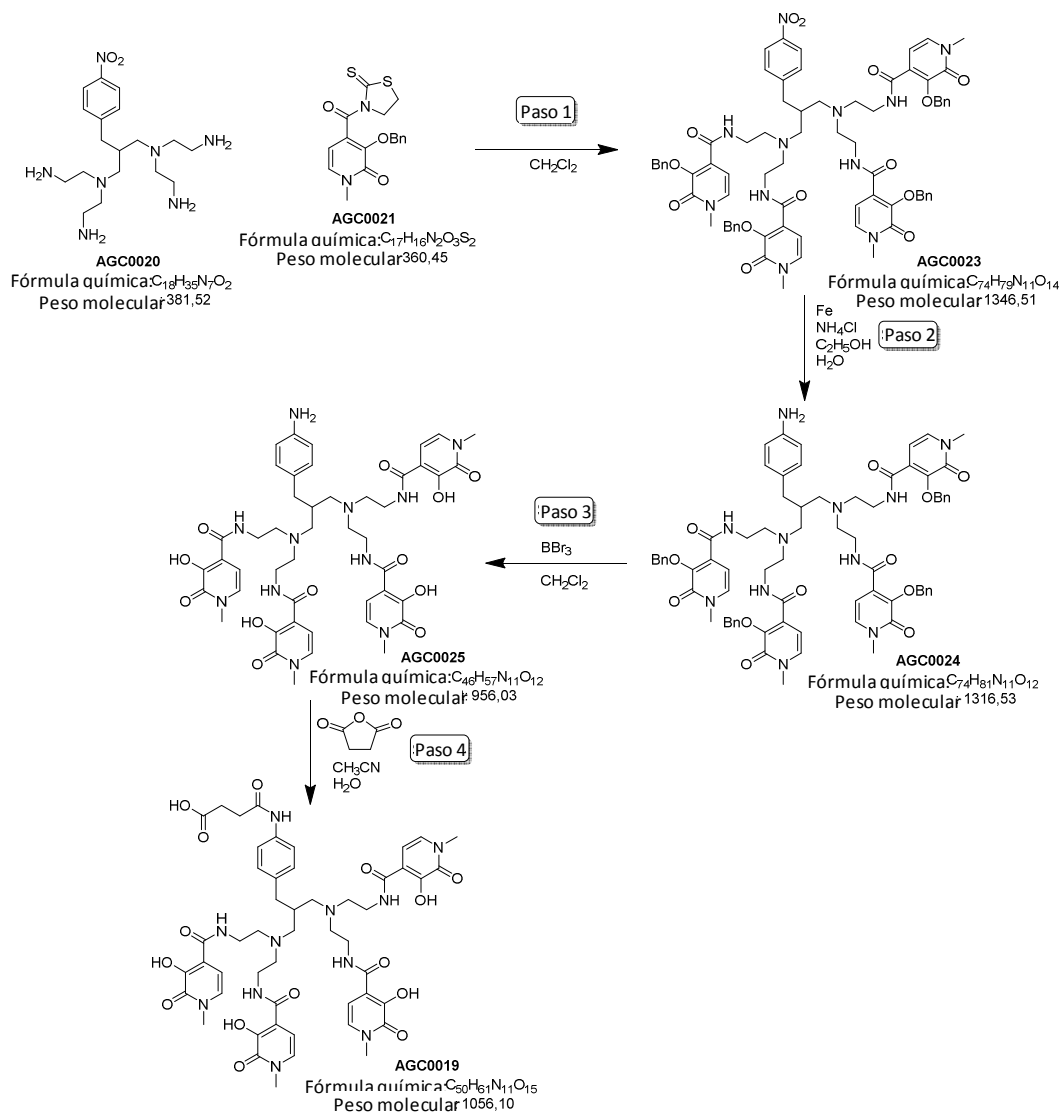
3-(benciloxi)-1-metil-4-[(2-tioxo-1,3-thiazolidin-3-il)carbonil]piridin-2(1H)-ona



- a) Dietiloxalato, etóxido de potasio, tolueno, etanol, b) Pd/C, p-xileno, c) MeI, K₂CO₃, DMSO, acetona
 d) i) BBr₃, DCM, ii) BnKr, K₂CO₃, KI, acetona, e) NaOH, agua, MeOH f) , DCC, DMAP, DCM

Síntesis de quelato de compuesto de fórmula (VIII)

Ácido 4-{[4-(3-[bis(2-{[(3-hidroxi-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)carbonil]amino}etil)amino]-2-{[bis(2-{[(3-hidroxi-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-4-il)carbonil]amino}etil)amino]metil}propil)fenil]amino}-4-oxobutanoico



En los métodos de formación de los complejos de la presente invención, se prefiere que la reacción de acoplamiento entre el quelante octadentado y la porción de direccionamiento a tejido se lleve a cabo en solución acuosa. Esto tiene varias ventajas. Primero, elimina el trabajo al fabricante de eliminar todo el solvente por debajo de niveles aceptables y certificar

la eliminación. Segundo, reduce los desechos y más importantemente acelera la producción por evitar un paso de separación eliminación. En el contexto de los presentes radiofármacos, es importante que la síntesis se lleve a cabo tan rápidamente como sea posible debido a que el radioisótopo estará decayendo a todos los tiempos y el tiempo transcurrido en la preparación desperdicia material valioso y introduce isótopos hijos contaminantes.

Las soluciones solución adecuadas incluyen a agua purificada y soluciones amortiguadoras tales como cualquiera de las muchas soluciones amortiguadoras bien conocidas en el arte. Las soluciones amortiguadoras de acetato, citrato, fosfato (por ejemplo PBS) y sulfonato (tales como MES) son ejemplos típicos de soluciones amortiguadoras acuosas bien conocidas.

En una forma de realización, el método comprende formar una primera solución acuosa de ligando que contiene hidroxipiridinona octadentado (como se describe a lo largo de la presente) y una segunda solución acuosa de una porción de direccionamiento a tejido (como se describe a lo largo de la presente) y contactar dicha primera y dicha segunda soluciones acuosas.

Las porciones de acoplamiento adecuadas se discutieron en detalle previamente y todos los grupos y

porciones discutidas en la presente como grupos de acoplamiento y/o conexión se pueden usar apropiadamente para acoplar la porción de direccionamiento al ligando. Algunos grupos de acoplamiento preferidos incluyen a grupos de acoplamiento de amida, éster, éter y amina. Los ésteres y las amidas se pueden formar convenientemente por medio de generación de grupos de éster activados a partir de un ácido carboxílico. Dicho ácido carboxílico puede estar presente en la porción de direccionamiento, en la porción conectora y/o en la porción de ligando y típicamente reaccionará con un alcohol o amina para formar un éter o amida. Dichos métodos son bien conocidos en el arte y pueden utilizar reactivos de activación bien conocidos incluyendo a reactivos activadores de N-hidroxi maleimida, carbodiimida y/o azodicarboxilato tales como DCC, DIC, EDC, DEAD, DIAD etc.

En una forma de realización preferida, el quelante octadentado que comprende cuatro porciones hidroxipiridinona, sustituido en la posición N con un grupo C₁-C₃alquilo, y una porción de acoplamiento que termina en un grupo ácido carboxílico se puede activar usando por lo menos un reactivo de acoplamiento (tal como cualquiera de los que se describen en la presente) y un agente activador tal como una N-hidroxisuccinimida (NHS) para formar el éster de NHS de quelante

octadentado. Este éster activado (por ejemplo NHS) se puede separar o usar sin separación para acoplamiento a cualquier posición de la porción de direccionamiento a tejido que tiene un grupo amina libre (tal como sobre una cadena lateral de lisina). Otros ésteres activados son bien conocidos en el arte y pueden ser cualquier éster de un grupo saliente eficaz, tal como grupos fluorados, tosilatos, mesilatos, ioduro, etc. Los ésteres de NHS, sin embargo, son los preferidos.

La reacción de acoplamiento preferiblemente se lleva a cabo en un periodo comparativamente corto y a alrededor de temperatura ambiente. Los periodos típicos para la reacción de acoplamiento de 1 paso o 2 pasos serán de entre 1 y 240 minutos, preferiblemente entre 5 y 120 minutos, más preferiblemente entre 10 y 60 minutos. Las temperaturas típicas para la reacción de acoplamiento serán entre 0 y 90 °C, preferiblemente entre 15 y 50 °C, más preferiblemente entre 20 y 40 °C. Alrededor de 25 °C o alrededor de 38 °C son temperaturas apropiadas.

El acoplamiento del quelante octadentado a la porción de direccionamiento típicamente se llevará a cabo bajo condiciones que no afectan adversamente (o por lo menos no irreversiblemente) la capacidad de unión de la porción de direccionamiento. Debido a que los aglutinantes son en general porciones basadas en

péptido o proteína, esto requiere condiciones comparativamente suaves para evitar la desnaturalización o pérdida de estructura secundaria/terciaria. Las condiciones acuosas (como se discute en la presente en todos los contextos) serán las preferidas, y será deseable evitar los extremos de pH y/o redox. El paso b) se puede llevar a cabo por lo tanto a un pH entre 3 y 10, preferiblemente entre 4 y 9 y más preferiblemente entre 4,5 y 8. Pueden ser deseables condiciones que son neutras en términos de redox, o muy levemente reductoras para evitar la oxidación al aire.

Un quelante de direccionamiento a tejido preferido que puede aplicarse a todos los aspectos de la invención es el AGC0018 como se describe en la presente. Los complejos de AGC0018 con iones de ^{227}Th forman una forma de realización preferida de los complejos de la invención y formulaciones correspondientes, uso, métodos etc. Otras formas de realización preferidas usables en todos dichos aspectos de la invención incluyen a complejos de ^{227}Th de AGC0019 conjugado a porciones de direccionamiento a tejido (como se describe en la presente) incluyendo anticuerpos monoclonales con afinidad de unión por uno cualquiera de los receptores CD22, FGFR2, Mesotelina, HER-2, PSMA o CD33

Síntesis breve de las Figuras:

Figura 1: Datos que demuestran el efecto de estabilidad de EDTA / PABA sobre el conjugado de anticuerpo no radiactivo AGC1118 en solución.

Figura 2: Efecto sobre los niveles de peróxido de hidrógeno de diferentes soluciones amortiguadoras que contienen conjugados HOPO de anticuerpos irradiados con 10 kGy de radiación.

Figura 3: Efecto radioestabilizante de ^{227}Th -AGC1118 (ensayo IRF) con una actividad específica de hasta aproximadamente 8000 Bq/ μg .

Figura 4: Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC1118 sobre Ramos con diferente actividad total (tiempo de incubación de 4 horas) (véase el Ejemplo 3)

Figura 5: El ^{227}Th -AGC0718 induce la muerte celular específica de blanco de células positivas para CD33 *in vitro* (véase el Ejemplo 4)

Figura 6: Citotoxicidad celular de ^{227}Th -AGC0118 a alta (20 kBq/ μg) y baja (7,4 kBq/ μg) actividad específica. El control negativo fue un complejo péptido-albumina de baja unión con el mismo rango de dosis, mismo tiempo de incubación y días antes de la lectura (véase el Ejemplo 5).

Figura 7: El ^{227}Th -AGC2518 induce la muerte celular específica de blanco de células positivas para FGFR2 *in vitro* (véase el Ejemplo 6).

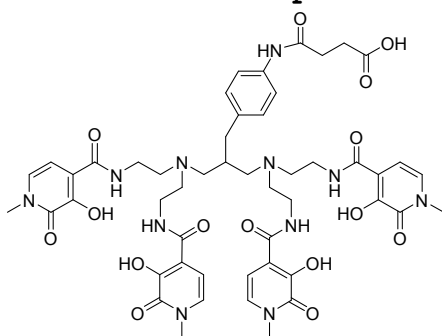
Figura 8: El ^{227}Th -AGC2418 induce la muerte celular específica de blanco de células positivas para mesotelina *in vitro* (véase el Ejemplo 7).

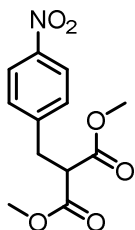
Figura 9: El ^{227}Th -AGC1018 induce la muerte celular específica de blanco y dependiente de la dosis de células LNCaP positivas para PSMA *in vitro* (véase el Ejemplo 9).

La invención a continuación se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Todos los compuestos ejemplificados en los ejemplos son parte de las formas de realización preferidas de la invención (incluyendo intermediarios y precursores preferidos) y pueden ser usados individualmente o en cualquier combinación en cualquier aspecto en donde el contexto lo permita. Por lo tanto, por ejemplo, cada uno y todos los compuestos 2 a 4 del Ejemplo 2, el compuesto 10 del Ejemplo 3 y el compuesto 7 del Ejemplo 4 constituyen formas de realización preferidas de sus diferentes tipos.

Ejemplo 1

Síntesis del compuesto de fórmula (VIII)



Ejemplo 1 a)**Síntesis de Dimetil 2-(4-nitrobencil) malonato**

Se suspendió hidruro de sodio (dispersión 60%, 11,55 g, 289 mmol) en 450 ml de tetrahidrofurano (THF) a 0 °C. Se agregó dimetil malonato (40,0 ml, 350 mmol) por goteo durante aproximadamente 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0 °C. Se agregó bromuro de 4-nitrobencilo (50,0 g, 231 mmol) disuelto en 150 ml de THF por goteo durante aproximadamente 30 minutos a 0 °C, seguido por dos horas a temperatura ambiente.

Se agregaron 500 ml acetato de etilo (EtOAc) y 250 ml de NH₄Cl (aq, sat) antes de filtrar la solución. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con 2*250 ml de EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con 250 ml de solución salina, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se eliminaron los solventes bajo presión reducida.

Se agregaron 300 ml de heptano y 300 ml de metil tert-butil éter (MTBE) al residuo y se calentó a 60 °C. Se filtró la solución. El filtrado se colocó en el freezer durante la noche y se filtró. La torta del

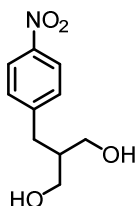
filtro se lavó con 200 ml de heptano y se secó bajo presión reducida, dando el compuesto del título como un sólido blanquecino.

Rendimiento: 42,03 g, 157,3 mmol, 68%.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 3,30(d, 2H, 7,8 Hz), 3,68(t, 1H, 7,8 Hz), 3,70(s, 6H), 7,36(d, 2H, 8,7 Hz), 8,13(d, 2H, 8,7 Hz).

Ejemplo 1 b)

Síntesis de 2-(4-Nitrobencil)propano-1,3-diol



Se disolvió dimetil 2-(4-nitrobencil) malonato (28,0 g, 104,8 mmol) en 560 ml de THF a 0 °C. Se agregó hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) (1M en hexanos, 420 ml, 420 mmol) por goteo a 0 °C durante aproximadamente 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante dos horas a 0 °C.

Se agregaron 20 ml de agua por goteo a la mezcla de reacción a 0 °C. Se agregaron 20 ml de NaOH (aq, 15%) por goteo a la mezcla de reacción a 0 °C seguido por el agregado por goteo de 20 ml de agua a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó a 0 °C durante 20 minutos antes del agregado de aproximadamente 150 g de MgSO₄. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de filtrarlo en un embudo

Büchner. La torta del filtro se lavó con 500 ml de EtOAc. La torta del filtro se eliminó y se agitó con 800 ml de EtOAc y 200 ml de MeOH durante aproximadamente 30 minutos antes de filtrar la solución. Los filtrados se combinaron y se secaron bajo presión reducida.

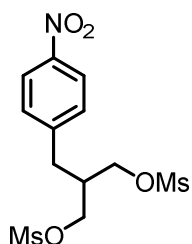
Una DFC sobre sílice usando un gradiente de EtOAc en heptano, seguido por un gradiente de MeOH en EtOAc dio el compuesto del título como un sólido amarillo pálido.

Rendimiento: 15,38 g, 72,8 mmol, 69%.

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃): 1,97-2,13(m, 3H), 2,79(d, 2H, 7,6 Hz), 3,60-3,73(m, 2H), 3,76-3,83 (m, 2H), 7,36(d, 2H, 8,4 Hz), 8,14(d, 2H, 8,4 Hz).

Ejemplo 1 c)

Síntesis de 2-(4-Nitrobencil)propano-1,3-diil dimetanosulfonato



Se disolvió 2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diol (15,3 g, 72,4 mmol) en 150 ml de CH₂Cl₂ a 0 °C. Se agregó trietilamina (23 ml, 165 mmol), seguido por cloruro de metanosulfonilo (12 ml, 155 mmol) por goteo

durante aproximadamente 15 minutos, seguido por agitación a temperatura ambiente durante una hora.

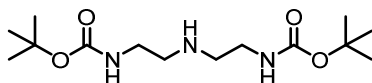
Se agregaron 500 ml de CH_2Cl_2 , y la mezcla se lavó con 2*250 ml de NaHCO_3 (aq, sat), 125 ml de HCl (aq, 0,1 M) y 250 ml de solución salina. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se secó bajo presión reducida, dando el compuesto del título como un sólido naranja.

Rendimiento: 25,80 g, 70,2 mmol, 97 %.

^1H -RMN (400MHz, CDCl_3): 2,44-2,58(m, 1H), 2,87(d, 2H, 7,7 Hz), 3,03(s, 6H), 4,17(dd, 2H, 10,3, 6,0 Hz), 4,26(dd, 2H, 10,3, 4,4 Hz), 7,38(d, 2H, 8,6 Hz), 8,19(d, 2H, 8,6 Hz).

Ejemplo 1 d)

Síntesis de Di-tert-butil(azanodiilbis(etano-2,1-diil))dicarbamato



Se suspendió imidazol (78,3 g, 1,15 mol) en 500 ml de CH_2Cl_2 a temperatura ambiente. Se agregó di-tert-butil dicarbonato (Boc_2O) (262,0 g, 1,2 mol) en porciones. La mezcla de reacción se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con 3*750 ml de agua, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se eliminaron los volátiles bajo presión reducida.

El residuo se disolvió en 250 ml de tolueno y se agregó dietilenotriamina (59,5 ml, 550 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante dos horas a 60 °C.

Se agregó 1 L de CH₂Cl₂, y se lavó la fase orgánica con 2*250 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se redujo bajo presión reducida.

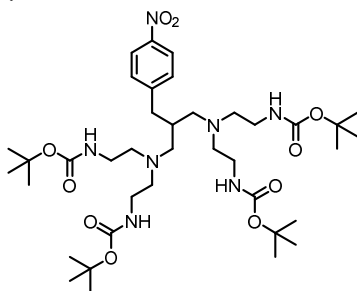
La DFC sobre sílice usando un gradiente de metanol (MeOH) en CH₂Cl₂ con trietilamina dio el compuesto del título como un sólido incoloro.

Rendimiento: 102 g, 336 mmol, 61 %.

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃): 1,41(s, 18H), 1,58(bs, 1H), 2,66-2,77(m, 4H), 3,13-3,26(m, 4H), 4,96(bs, 2H).

Ejemplo 1 e)

Síntesis de tetra-tert-butil (((2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diil)bis(azanetriil)) tetrakis(etano-2,1-diil)) tetracarbamato



Se disolvieron 2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diil dimetanosulfonato (26,0 g, 71 mmol) y di-tert-butil(azanodiilbis(etano-2,1-diil))dicarbamato (76,0 g,

250 mmol) en 700 ml de acetonitrilo. Se agregó N,N-diisopropiletilamina (43 ml, 250 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 días a reflujo.

Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida.

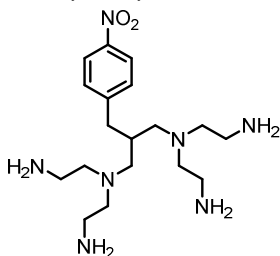
La DFC sobre sílice usando un gradiente de EtOAc en heptano dio el compuesto del título como una espuma sólida amarilla pálida.

Rendimiento: 27,2 g, 34,8 mmol, 49 %.

^1H -RMN (400MHz, CDCl_3): 1,40(s, 36H), 1,91-2,17(m, 3H), 2,27-2,54(m, 10H), 2,61-2,89(m, 2H), 2,98-3,26(m, 8H), 5,26(bs, 4H), 7,34(d, 2H, 8,5 Hz), 8,11(d, 2H, 8,5 Hz).

Ejemplo 1 f)

Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{1'}$ -(2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diil)bis(N^1 -(2-aminoetil)etano-1,2-diamina), AGC0020



Se disolvió tetra-tert-butil (((2-(4-nitrobencil)propano-1,3-diil)bis(azanetriil))tetrakis(etano-2,1-diil))tetracarbamato (29,0 g, 37,1 mmol) en 950ml de MeOH y 50 ml de agua. Se agregó cloruro de acetilo (50

ml, 0,7 mol) por goteo durante aproximadamente 20 minutos a 30 °C. La mezcla de reacción se agitó durante la noche.

Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida y se disolvió el residuo en 250 ml de agua. Se agregaron 500 ml de CH₂Cl₂, seguido por 175 ml de NaOH (aq, 5M, saturado con NaCl). Se separaron las fases, y la fase acuosa se extrajo con 4*250ml de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se secaron bajo presión reducida, dando el compuesto del título como un aceite marrón rojizo viscoso.

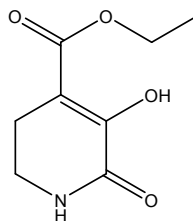
Rendimiento: 11,20 g, 29,3 mmol, 79 %. Pureza (HPLC Figura 9): 99,3%.

¹H-RMN (300MHz, CDCl₃): 1,55(bs, 8H), 2,03(dt, 1H, 6,6, 13,3 Hz), 2,15(dd, 2H, 12,7, 6,6), 2,34-2,47(m, 10H), 2,64-2,77(m, 10H), 7,32(d, 2H, 8,7 Hz), 8,10(d, 2H, 8,7 Hz).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): 37,9, 38,5, 39,9, 58,0, 58,7, 123,7, 130,0, 146,5, 149,5

Ejemplo 1 g)

Síntesis de 5-hidroxi-6-oxo-1,2,3,6-tetrahidropiridina-4-carboxilato de etilo



Se disolvió 2-pirrolidinona (76 ml, 1 mol) y oxalato de dietilo (140 ml, 1,03 mol) en 1 L de tolueno a temperatura ambiente. Se agregó etóxido de potasio (EtOK) (24% en EtOH, 415 ml, 1,06 mol), y la mezcla de reacción se calentó a 90 °C.

Se agregaron 200 ml de EtOH en porciones durante la primera hora de la reacción debido al espesamiento de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante la noche y se enfrió a temperatura ambiente. Se agregaron lentamente 210 ml de HCl (5M, aq) con agitación.

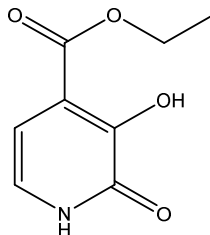
Se agregaron 200 ml de solución salina y 200 ml de tolueno, y se separaron las fases.

La fase acuosa se extrajo con 2x400 ml de CHCl₃. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se redujeron en vacío. El residuo se recristalizó a partir de EtOAc, dando el compuesto del título como un sólido amarillo pálido.

Rendimiento: 132,7 g, 0,72 mol, 72%.

Ejemplo 1 h)

Síntesis de 3-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxilato de etilo

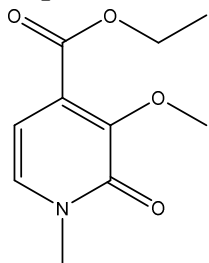


Se disolvió {5-hidroxi-6-oxo-1,2,3,6-tetrahidropiridina-4-carboxilato de etilo} (23,00 g, 124,2 mmol) en 150 ml de p-xileno y se agregó paladio sobre carbono (10%, 5,75 g). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con 300 ml de MeOH y se filtró a través de una almohadilla corta de Celite®. La almohadilla se lavó con 300 ml de MeOH. Los solventes se eliminaron con vacío, dando el compuesto del título como un sólido marrón rojizo pálido.

Rendimiento: 19,63 g, 107,1 mmol, 86%, MS (ESI, pos): 206,1[M+Na]⁺, 389,1[2M+Na]⁺

Ejemplo 1 i)

Síntesis de 3-metoxi-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxilato de etilo



Se disolvió {3-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxilato de etilo} (119,2 g, 0,65 mol) en 600 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1,8 L de acetona a temperatura ambiente. Se agregó K₂CO₃ (179,7 g, 1,3 mol). Se agregó yoduro de metilo (MeI) (162 ml, 321

mmol) disuelto en 600 ml de acetona por goteo durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.

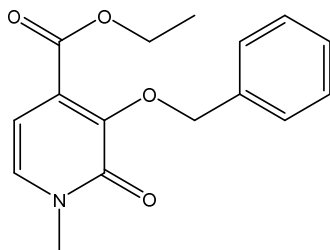
La mezcla de reacción se agitó durante unas dos horas adicionales a temperatura ambiente antes de agregar MeI (162 ml, 2,6 mol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se redujo bajo presión reducida y se agregaron 2,5 L de EtOAc.

La mezcla se filtró y se redujo bajo presión reducida. La purificación por cromatografía rápida seca (DFC) sobre SiO₂ usando un gradiente de EtOAc en heptano dio el compuesto del título.

Rendimiento: 56,1 g, 210,1 mmol, 32 %, MS (ESI, pos): 234,1 [M+Na]⁺, 445,1 [2M+Na]⁺

Ejemplo 1 j)

Síntesis de 3-(benciloxi)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxilato de etilo



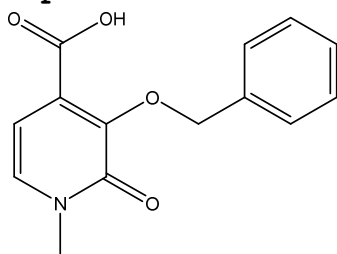
Se disolvió {3-metoxi-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxilato de etilo} (5,93 g, 28,1 mmol) en 80 ml de diclorometano (DCM) a -78 °C y se agregó por goteo BBr₃ (5,3 ml, 56,2 mmol) en 20 ml de DCM. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -

78 °C antes de calentar la reacción a 0 °C. La reacción se detuvo por agregado por goteo de 25 ml tert-butil metil éter (tert-BuOMe) y 25 ml de MeOH. Los volátiles se eliminaron por vacío. El residuo se disolvió en 90 ml de DCM y 10 ml de MeOH y se filtró a través de una almohadilla corta de SiO₂. La almohadilla se lavó con 200 ml de MeOH 10% en DCM. Los volátiles se eliminaron por vacío. El residuo se disolvió en 400 ml de acetona. Se agregaron K₂CO₃ (11,65 g, 84,3 mmol), KI (1,39 g, 8,4 mmol) y bromuro de bencilo (BnBr) (9,2 ml, 84,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con 200 ml de EtOAc y se lavó con 3x50 ml de agua y 50 ml de solución salina. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con 2x50 ml de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron, y se eliminaron los volátiles por vacío y se purificaron por cromatografía rápida seca sobre SiO₂ usando EtOAc (40 - 70%) en heptanos como eluyente para dar el compuesto del título.

Rendimiento: 5,21 g, 18,1 mmol, 65 %, MS (ESI, pos): 310,2[M+Na]⁺, 597,4[2M+Na]⁺

Ejemplo 1 k)

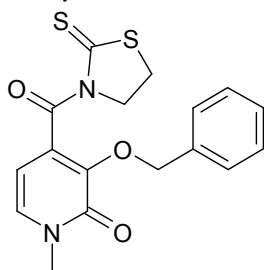
Síntesis de ácido 3-(Benciloxi)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxílico



Se disolvió {3-(benciloxi)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxilato de etilo} (27,90 g, 97,1 mmol) en 250 ml de MeOH y se agregaron 60 ml de NaOH (5M, aq). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente antes de concentrar la mezcla de reacción a aproximadamente 1/3 en vacío. El residuo se diluyó con 150 ml de agua y se acidificó a pH 2 usando ácido clorhídrico (HCl) (5M, aq). El precipitado se filtró y se secó en vacío, dando el compuesto del título como un sólido incoloro. Rendimiento: 22,52g, 86,9 mmol, 89%.

Ejemplo 1 1)

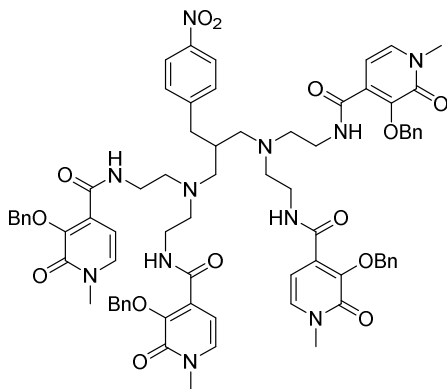
Síntesis de 3-(Benciloxi)-1-metil-4-(2-tioxotiazolidina-3-carbonil)piridina-2(1H)-ona (AGC0021)



Se disolvió {ácido 3-(benciloxi)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridina-4-carboxílico} (3,84 g, 14,8 mmol), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (196 mg, 1,6 mmol) y 2-tiazolina-2-tiol (1,94 g, 16,3 mmol) en 50 ml de DCM. Se agregó N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (3,36g, 16,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche. La reacción se filtró, los sólidos se lavaron con DCM y el filtrado se redujo en vacío. El sólido amarillo resultante se recrystalizó a partir de isopropanol/DCM, dando AGC0021. Rendimiento: 4,65 g, 12,9 mmol, 87 %. MS(ESI, pos): 383[M+Na]⁺, 743[2M+Na]⁺

Ejemplo 1 m)

Síntesis de AGC0023



AGC0023

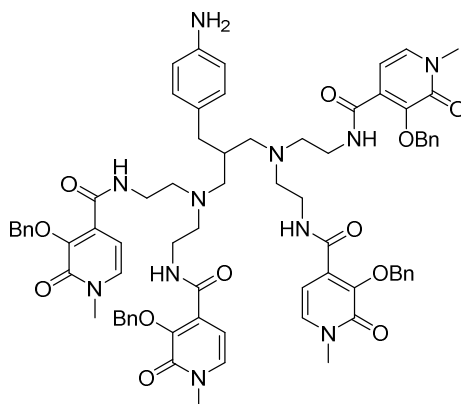
Se disolvió AGC0020 (8,98 g; 23,5 mmol) en CH₂Cl₂ (600 ml). Se agregó AGC0021 (37,43 g; 103,8 mmol). La reacción se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida.

La DFC sobre SiO₂ usando un gradiente de metanol en una mezcla 1:1 de EtOAc y CH₂Cl₂ proveyó AGC0023 como una espuma sólida.

Rendimiento promedio: 26,95 g, 20,0 mmol, 85 %.

Ejemplo 1 n)

Síntesis de AGC0024

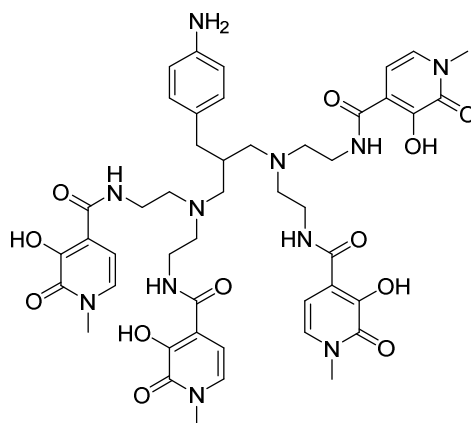


AGC0024

Se disolvió AGC0023 (26,95 g; 20,0 mmol) en etanol (EtOH) (675 ml). Se agregó hierro (20,76 g; 0,37 mol) y NH₄Cl (26,99 g; 0,50 mol), seguido por agua (67 ml). La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante dos horas. Se agregó más hierro (6,75 g; 121 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante una hora a 74 °C. Se agregó más hierro (6,76 g; 121 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante una hora a 74 °C. La mezcla de reacción se enfrió antes de reducir la mezcla de reacción bajo presión reducida.

La DFC sobre SiO₂ usando un gradiente de metanol en CH₂Cl₂ proveyó AGC0024 como una espuma sólida.

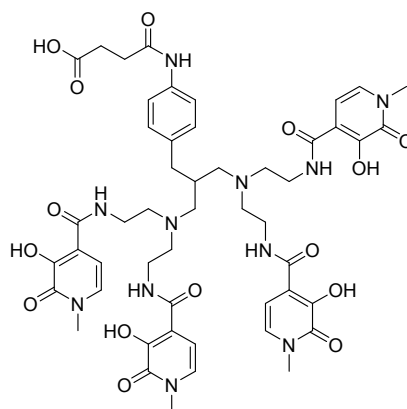
Rendimiento 18,64 g, 14,2 mmol, 71 %.

Ejemplo 1 o)**Síntesis de AGC0025****AGC0025**

Se disolvió AGC0024 (18,64 g; 14,2 mmol) en CH_2Cl_2 (750 ml) y se enfrió a 0 °C. Se agregó BBr_3 (50 g; 0,20 mol) y se agitó la mezcla de reacción durante 75 minutos. La reacción se detuvo por agregado cuidadoso de metanol (MeOH) (130 ml) con agitación a 0 °C. Los volátiles se eliminaron bajo presión reducida. Se agregó HCl (1,25 M en EtOH, 320 ml) al residuo. El frasco luego se centrifugó usando un evaporador rotatorio a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 15 minutos antes de eliminar los volátiles bajo presión reducida.

La DFC sobre sílice C_{18} no desactivada usando un gradiente de acetonitrilo (ACN) en agua proveyó AGC0025 como un sólido vítreo levemente naranja.

Rendimiento: 13,27 g, 13,9 mmol, 98 %.

Ejemplo 1 p)**Síntesis de AGC0019****AGC0019**

Se disolvió AGC0025 (10,63 g; 11,1 mmol) en ACN (204 ml) y agua (61 ml) a temperatura ambiente. Se agregó anhídrido succínico (2,17 g; 21,7 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante dos horas. La mezcla de reacción se redujo bajo presión reducida. La DFC sobre sílice C₁₈ no desactivada usando un gradiente de ACN en agua proveyó un sólido vítreo verdoso.

El sólido se disolvió en MeOH (62 ml) y agua (10,6 ml) a 40 °C. La solución se agregó por goteo a EtOAc (750 ml) bajo sonicación. El precipitado se filtró, se lavó con EtOAc y se secó bajo presión reducida, dando AGC0019 como un sólido blanquecino con un matiz verdoso.

Rendimiento: 9,20 g, 8,7 mmol, 78 %.

H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆), ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆).

Ejemplo 2

Aislamiento de torio-227 puro

El torio-227 se aísla de un generador de actinio-227. El actinio-227 se produjo por radiación de neutrones térmicos de Radio-226 seguido por el decaimiento de Radio-227 ($t_{1/2}=42,2$ m) a Actinio-227. El torio-227 se retuvo selectivamente de una mezcla de decaimiento de actinio-227 en solución de HNO_3 8 M por cromatografía de intercambio aniónico. Se usó una columna de 2 mm de diámetro interno, longitud 30 mm, que contenía 70 mg de resina AG®1-X8 (malla 200-400, forma nitrato). Luego que el Actinio-227, Radio-223 y los hijos eluyeron de la columna, se extrajo el Torio-227 de la columna con HCl 12 M. El eluato que contenía Torio-227 se evaporó hasta sequedad y el residuo se resuspendió en HCl 0,01 M antes del paso de marcaje.

Ejemplo 3

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC1118 contra Ramos

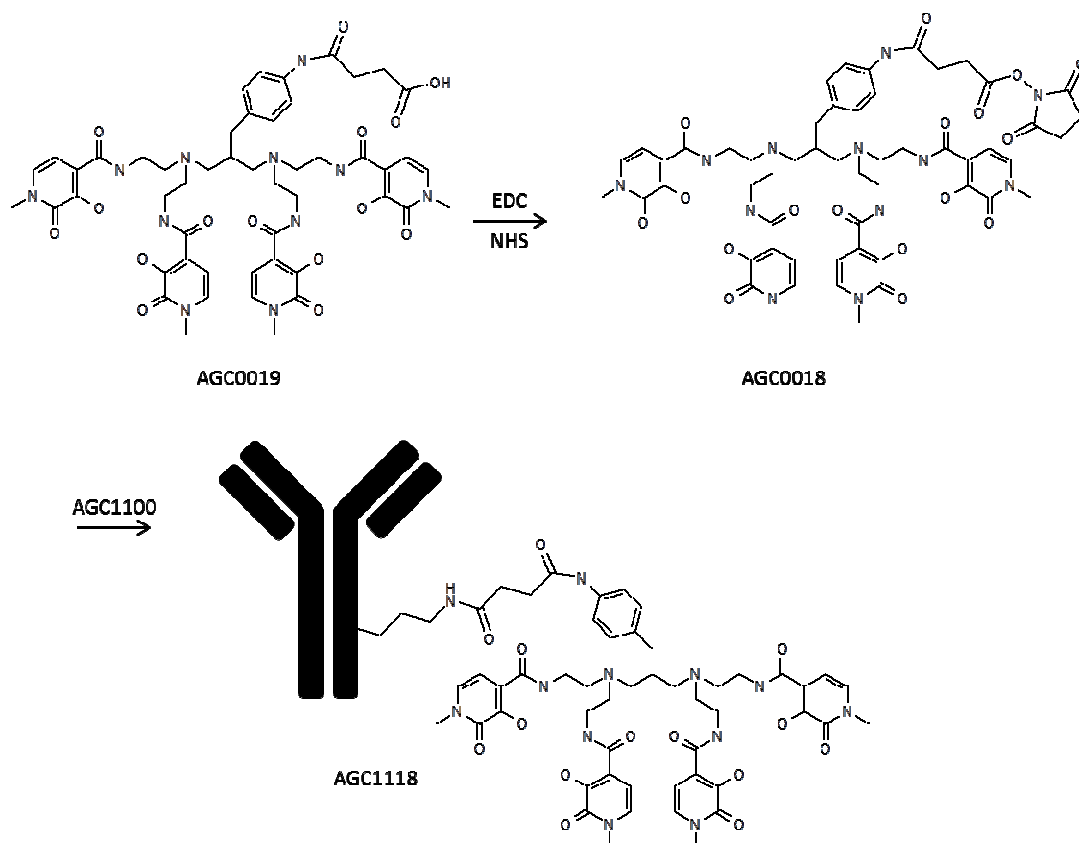
Ejemplo 3 a)

Generación del anticuerpo monoclonal anti-CD22 (AGC1100)

La secuencia del anticuerpo monoclonal (mAb) hLL2, también llamado epratuzumab, aquí indicado como AGC1100, se construyó como se describe en Leung, Goldenberg, Dion, Pellegrini, Shevitz, Shih, y Hansen: Molecular Immunology 32: 1413-27, 1995.

El mAb usado en los presentes ejemplos fue producido por Immunomedics Inc, New Jersey, EE.UU. La producción de este mAb podría ser hecha por ejemplo en células en suspensión de ovario de hámster chino (CHO-S), transfectadas con un plásmido que codifique para los genes que codifican para la cadena liviana y pesada. Los primeros clones estables se podrían seleccionar para usar procedimientos estándares. Luego de aproximadamente 14 días en un biorreactor de uso simple, puede recolectarse el anticuerpo monoclonal después de la filtración del sobrenadante. El AGC1100 podría purificarse adicionalmente por cromatografía de afinidad a proteína A (MabSelect SuRe, Atoll, Weingarten/Alemania), seguido por un paso de intercambio iónico. Podría usarse un tercer paso de purificación en base a electrostática e hidrofobicidad para eliminar agregados e impurezas potencialmente remanentes. La identidad de AGC1100 podría confirmarse por enfoque isoeléctrico, análisis por SDS-PAGE, secuenciamiento de extremo N terminal y análisis por LC/MS. La pureza de la muestra podría analizarse adicionalmente por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Ejemplo 3 b) Acoplamiento de mAb AGC1100 (epratuzumab) con el quelante AGC0019 (compuesto de fórmula (VIII)) para dar el conjugado AGC1118



Antes de la conjugación, se agregó solución amortiguada con fosfato pH 7,5 a la solución de anticuerpo (AGC1100) para aumentar la capacidad amortiguadora de la solución. Se determinó la cantidad de AGC1100 (mAb) en el recipiente.

El quelante AGC0019 se disolvió en 1:1, DMA : 0,1 M solución amortiguada con MES pH 5,4. Se disolvieron NHS y EDC en solución amortiguada con MES 0,1 M pH 5,4.

Se preparó una solución equivalente en molar 1 / 1 / 3 de quelante / N-hidroxisuccinimida (NHS) / 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para activar el quelante. Para la conjugación al anticuerpo se cargó

una relación molar de 7,5/7,5/22,5/1 (quelante/NHS/EDC/mAb) del quelante activado al mAb. Después de entre 20 y 40 minutos, la reacción de conjugación se detuvo con 12% volumen en volumen de ácido cítrico 0,3 M para ajustar el pH a 5,5.

La solución luego se intercambi6 con solución amortiguadora a citrato 30 mM, NaCl 70 mM, EDTA 2 mM, pABA 0,5 mg/ml, pH 5,5 (solución amortiguada para TFF) por filtración de flujo tangencial a volumen constante. Al final de la diafiltración la solución se descarg6 en un recipiente para formulación. El producto se formul6 con solución amortiguadora para TFF (Citrato 30 mM, NaCl 70 mM, EDTA 2 mM, pABA 0,5 mg/ml, pH 5,5) y 7% peso en volumen de polisorbato 80 para obtener 2,6 mg/ml de AGC1118 en citrato 30 mM, NaCl 70mM, EDTA 2mM, pABA 0,5 mg/ml, PS80 0,1% peso en volumen, pH 5,5. Finalmente, la solución se filtr6 a trav6s de un filtro de 0,2 μ m en botellas est6riles antes del almacenamiento.

Ejemplo 3 c)

Preparación de una dosis para inyección de ^{227}Th -AGC1118

Se disolvi6 un vial de película de cloruro de torio-227 20 MBq en 2 ml de solución de HNO_3 8M y se dej6 durante 15 minutos antes de retirar la solución para la aplicación en una columna de intercambio

aniónico para renovar el radio-223 que había crecido en el tiempo. La columna se lavó con 3 ml de HNO₃ 8M y 1 ml de agua antes de la elución del torio-227 con 3 ml de HCl 3M. La actividad eluída del torio-227 se midió y se transfirió una dosis de 10 MBq a un vial de vidrio vacío de 10 ml. El ácido luego se evaporó usando una bomba de vacío y teniendo al vial en un bloque térmico (ajustado a 120°C) durante entre 30 y 60 minutos. Después de alcanzar temperatura ambiente, se agregaron 6 ml de conjugado AGC1118 2,5 mg/ml para radiomarcarse. El vial se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución luego se esterilizó por filtración en un vial estéril y se sacó muestra para análisis por iTLC para determinar RCP antes del uso.

Ejemplo 3 d)

Citotoxicidad de ²²⁷Th-AGC1118 contra Ramos con diferente actividad total y actividad específica

En este estudio se ensayaron dosis de ²²⁷Th-AGC1118 variando la actividad total y la actividad específica con 4 horas de tiempo de incubación. Este estudio se corrió en un formato de placa de 96 pocillos con una actividad específica de 10/50 kBq/μg y actividad total de 5, 10, 20 y 40 kBq/ml.

Las células Ramos se cultivaron en medio RPMI1640 con FBS 10 % y Penicilina/Estreptomicina 1 % (Pasaje

22). Las células se transfirieron a un tubo de centrífuga y se centrifugó a 300G durante 5 minutos y se suspendió en 5 ml de medio antes del recuento en un contador Z2 Coulter. La suspensión celular se diluyó con medio hasta una concentración de células de 400.000 células/ml y se transfirieron a 48 pocillos (200 µl/pocillo) en una placa de 96 pocillos (80.000 células/pocillo). Se usó el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) para medir la viabilidad celular. Véase la Figura 4.

Ejemplo 4

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC0718 contra HL-60

Ejemplo 4 a)

Generación del anticuerpo monoclonal anti-CD33 (AGC0700).

La secuencia del anticuerpo monoclonal (mAb) HuM195/lintuzumab, aquí indicado como AGC0700, se obtuvo de la literatura como se describe en (1) y (2). La fabricación de AGC0700 se llevó a cabo en las instalaciones de CobraBiologics (Södertälje, Suecia). Brevemente, las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana se retrotraducieron a la secuencia de ADN usando el programa de computación Vector NTI® (Invitrogen/Life-Technologies Ltd., Paisley, Reino Unido). El codón para la lisina del extremo C terminal (Lys) se omitió del gen de la cadena

pesada de IgG1 para facilitar la determinación precisa de la relación conjugado a anticuerpo (CAR) como se detalla en el Ejemplo 2. Se optimizaron los codones de la secuencia de ADN para la expresión en células de mamífero y fue sintetizada por GeneArt (GeneArt/ Life-Technologies Ltd., Paisley, Reino Unido) y luego fue clonada en un vector de expresión por CobraBiologics (Södertälje, Suecia). Las células de suspensión de ovario de hámster chino (CHO-S) se transfectaron establemente con el plásmido que codifica para los dominios V_H y V_L de AGC0700 y se hicieron crecer en presencia de medio CD-CHO estándar (Invitrogen/Life-Technologies Ltd., Paisley, Reino Unido), suplementado con puromicina (12,5 mg/l; Sigma Aldrich). Se seleccionaron clones estables, que expresan AGC0700, mediante dilución limitante durante 25 generaciones. Se evaluó la estabilidad de los clones por medida de los títulos de proteína en los sobrenadantes. Se estableció un banco de células del clon más estable y se criopreservó.

La expresión del mAb se llevó a cabo a 37 °C durante aproximadamente 14 días en un biorreactor de uso único a escala de 250 L. El anticuerpo monoclonal se recolectó después de la filtración del sobrenadante. El AC0700 se purificó adicionalmente mediante columna de afinidad a proteína A (MabSelect SuRe, Atoll,

Weingarten/Alemania), seguido por una cromatografía de intercambio aniónico (QFF-Sepharose; GE Healthcare) - y una catiónico (PorosXS; Invitrogen/Life-Technologies Ltd.) para aumentar la pureza y el rendimiento final. La identidad de AGC0700 se confirmó mediante enfoque isoeléctrico y análisis por SDS-PAGE. La actividad del AGC0700 purificado se analizó en un ELISA de unión al blanco inmovilizado CD33-Fc (Novoproteína). La pureza de la muestra se analizó por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Referencias:

(1) Scheinberg DA. "Therapeutic uses of the hypervariable region of monoclonal antibody M195 and constructs thereof". Solicitud de Patente de los EE.UU. 6007814 (28 de diciembre de 1999).

(2) Co MS y col; J Immunol. 1992 Feb 15;148(4):1149-54. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen.

Ejemplo 4 b)

Acoplamiento de mAb AGC0700 (lintuzumab) con el quelante AGC0019 (compuesto de fórmula (VIII)) para dar el AGC0718 conjugado

Las conjugaciones se realizaron como se describe en el ejemplo 3 con excepciones menores.

Antes de la conjugación, se agregó solución amortiguada con fosfato pH 7,5 a la solución de anticuerpo (AGC0700) para aumentar la capacidad amortiguadora de la solución. Se determinó la cantidad de AGC0700 (mAb) en recipiente.

El quelante AGC0019 se disolvió en 1:1, DMA : solución amortiguada con MES 0,1 M pH 5,4. Se disolvieron NHS y EDC en solución amortiguada con MES 0,1 M pH 5,4.

Se preparó una solución de equivalente molar de 1/1/3 de quelante/NHS/EDC para activar el quelante. Para la conjugación del anticuerpo se cargó una relación molar de 20/20/60/1 (quelante/NHS/EDC/mAb) del quelante activado al mAb. Después de entre 40 y 60 minutos, la reacción de conjugación se detuvo con ácido cítrico 0,3 M 12% volumen en volumen para ajustar el pH a 5,5.

La solución luego se intercambió con solución amortiguadora en Citrato 30 mM, NaCl 154 mM, EDTA 2 mM, pABA 2 mg/ml, pH 5,5 (solución amortiguadora para TFF) por Filtración de flujo tangencial a volumen constante. Al final de la diafiltración la solución se descargó a un recipiente de la formulación. El producto se formuló con solución amortiguadora para TFF (Citrato 30 mM, NaCl 154 mM, EDTA 2 mM, pABA 2 mg/ml, pH 5,5) para obtener AGC0718 2,5 mg/ml en citrato 30 mM, NaCl 154mM,

EDTA 2mM, pABA 2mg/ml, pH 5,5. Finalmente, la solución se filtró a través de un filtro de 0,2 µm en botellas estériles antes del almacenamiento.

Ejemplo 4 c)

Preparación de una dosis para inyección de ^{227}Th -AGC0718

Se disolvió un vial de película de cloruro de torio-227 20 MBq en 2 ml de solución de HNO_3 8M y se dejó durante 15 minutos antes de quitar la solución para la aplicación a una columna de intercambio aniónico para la eliminación de radio-223 que había crecido en el tiempo. La columna se lavó con 3 ml de HNO_3 8M y 1 ml de agua antes de la elución de torio-227 con 3 ml de HCl 3M. La actividad eluida de torio-227 se midió y se transfirió una dosis de 10 MBq a un vial de vidrio vacío de 10 ml. Luego se evaporó el ácido usando una bomba de vacío y teniendo el vial en un bloque térmico (ajustado a 120°C) durante entre 30 y 60 minutos. Después de alcanzar temperatura ambiente, Se agregaron 6 ml de AGC0718 conjugado 2,5 mg/ml para radiomarcarse. El vial se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución luego se filtró en esterilidad a un vial estéril y se sacó muestra para el análisis por iTLC para determinar RCP antes del uso.

Ejemplo 4 d)

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC0718 contra HL-60 con diferente actividad total

Para demostrar la toxicidad celular de ^{227}Th -AGC0718 después de la unión a células CD33+, se realizaron ensayos de toxicidad celular *in vitro*. Para este propósito, la línea celular HL-60 de leucemia mielogénica humana, así como una línea de células B negativas para CD33 (Ramos), se expusieron a ^{227}Th -AGC0718. Se ensayaron las actividades totales de 2 y 20 kBq/ml a una actividad específica de 44 kBq/ μg . Todos los procedimientos experimentales se describen en RD2013.093. Brevemente, se prepararon 50.000 células/ml HL-60 humanas en medio IMDM con FBS 10 % y 1 % de Penicilina/Estreptomicina y se sembraron a una densidad de 100.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C con actividades de 0 a 20 kBq/ml de ^{227}Th -AGC0718. Una muestra de conjugado control de isotipo ^{227}Th respectivo así como una muestra de AGC0718 no marcado se prepararon en paralelo como controles respectivos. Las células se lavaron luego con medio fresco y se sembraron en una placa para cultivo de 24 pocillos nueva.

A diferentes puntos de tiempo, las células se recolectaron y se midió la viabilidad usando el conjunto de componentes CellTiterGlo (Promega). La

viabilidad se expresó en % utilizando el control positivo (células sin tratar) como 100%. Véase la Figura 5.

Ejemplo 5

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC0118 contra SKOV-3

Ejemplo 5 a)

Generación de AGC0100 (trastuzumab)

Se adquirió el anticuerpo monoclonal trastuzumab (aquí indicado como AGC0100) de Roche y se disolvió en una concentración de 10 mg/ml en PBS (Dulbecco BIOCHROM).

Ejemplo 5 b)

Acoplamiento de mAb AGC0100 (Trastuzumab) con el quelante AGC0019 (compuesto de fórmula (VIII)) para dar el AGC0118 Conjugado

Las conjugaciones se realizaron como se describe en el ejemplo 3 con modificaciones mínimas y la purificación por TFF del mAb conjugado final se reemplazó por cromatografía en columna de filtración en gel.

Se agregó solución amortiguada con fosfato 1 M 11% pH 7,4 a trastuzumab en PBS. Se disolvieron el quelante (AGC0019), NHS y EDC en las mismas soluciones como se describió en el ejemplo 3 b). La relación molar de quelante/NHS/EDC durante la activación fue 1/1/3. Una relación molar de 8/8/25/1 correspondiente a

quelante/NHS/EDC/mAb y un tiempo de conjugación entre 30 y 40 minutos, produjo una CAR (relación de quelante a anticuerpo) entre 0,7 y 0,9 para el AGC0118 conjugado. La reacción se detuvo por el agregado de 12% volumen en volumen de ácido cítrico 0,3 M hasta un pH final de 5,5.

La purificación e intercambio de solución amortiguadora de los AGC0118 conjugados en Citrato 30 mM pH 5,5, NaCl 154 mM se realizaron por filtración en gel en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) conectada a un sistema ÄKTA (GE Healthcare). Se midió la concentración de proteínas a Abs 280 nm antes de formular el producto con solución amortiguadora (para obtener 2,5 mg/ml de AGC0118 en citrato 30 mM, NaCl 154 mM, EDTA 2 mM, pABA 2mg/ml, pH 5,5). Finalmente, la solución se filtró a través de un filtro de 0,2 µm en botellas estériles antes del almacenamiento.

Ejemplo 5 c)

Preparation de una dosis para inyección de ²²⁷Th-AGC0118

El marcaje se realizó como se describió previamente:

Se disolvió un vial de película de cloruro de torio-227 20 MBq en 2 ml de solución de HNO₃ 8M y se dejó durante 15 minutos antes de quitar la solución para la aplicación a una columna de intercambio

aniónico para la eliminación de radio-223 que había crecido en el tiempo. La columna se lavó con 3 ml HNO_3 8M y 1 ml de agua antes de la elución de torio-227 con 3 ml de HCl 3M. La actividad eluida de torio-227 se midió y se transfirió una dosis de 10 MBq a un vial de vidrio vacío de 10 ml. Luego se evaporó el ácido usando una bomba de vacío y teniendo el vial en un bloque térmico (ajustado a 120°C) durante entre 30 y 60 minutos. Después de alcanzar temperatura ambiente, se agregaron 6 ml de AGC0118 conjugado 2,5 mg/ml para radiomarcarse. El vial se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución luego se filtró en esterilidad a un vial estéril y se sacó muestra para el análisis por iTLC para determinar RCP antes del uso.

Ejemplo 5 d)

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC0118 contra SKOV-3 con diferente actividad total

Se ensayó la citotoxicidad celular de diferentes dosis de ^{227}Th -AGC0118 variando la actividad total agregada a los pocillos durante un tiempo de incubación de 4 horas. Las células SKOV-3 se sembraron a 10000 por pocillo en una placa de 96 pocillos el día anterior al experimento. Se agregó una serie de actividades totales de 5, 10, 20 y 40 kBq/ml del ^{227}Th -AGC0118 quelado, con una actividad específica de 20 kBq/ μg , a

las células en el día 1. Los ^{227}Th -AGC0118 no unidos remanentes se eliminaron con pipeta de disposición múltiple, seguido por un lavado adicional con medio y posteriormente medio de cultivo fresco, después del final del periodo de incubación. Las células SKOV-3 se cultivaron en medio Mc-Coy con FBS 10 % y Penicilina/Estreptomicina 1 %. El medio libre de suero reemplazó el medio de cultivo durante la incubación con ^{227}Th -AGC0118. En el cuarto día se usó el ensayo de viabilidad celular luminescente CellTiter-Glo (Promega) para medir la viabilidad celular. Véase la Figura 6.

Ejemplo 6

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC2518 contra NCI-H716

Ejemplo 6 a)

Generación del anticuerpo monoclonal FGFR2 (BAY1179470; AGC2500).

La generación del anticuerpo monoclonal BAY 1179470, a partir de aquí referido como AGC2500, se describe en detalle en WO2013076186A1. Brevemente, se recuperó el anticuerpo al hacer una selección por afinidad sobre el antígeno FGFR2. El anticuerpo IgG1 humano resultante se expresó en células CHO y se purificó usando una columna de afinidad de proteína A (MAb Select Sure), seguido por cromatografía de exclusión molecular para aislar las fracciones

monoméricas. El anticuerpo se formuló en PBS, pH 7,4. La SEC analítica demostró homogeneidad > 99%.

Ejemplo 6 b)

Acoplamiento de mAb AGC2500 con el quelante AGC0019 (compuesto de fórmula (VIII)) para dar el AGC2518 conjugado

La solución que contiene anticuerpos se ajustó a un pH de 7,5. El quelante AGC0019 se disolvió en 1:1 de DMA: solución amortiguada con MES 0,1 M a pH 5,4. Se disolvieron NHS y EDC en solución amortiguada con MES 0,1 M a pH 5,4. Se preparó una solución 1/1/3 equivalentes molares de quelante/NHS/EDC para activar al quelante. Para la conjugación al anticuerpo se cargó una proporción molar de 10/10/30/1 (quelante/NHS/EDC/mAb) del quelante activado al mAb. Después de 30 minutos, se detuvo la reacción de conjugación con 12% volumen en volumen de ácido cítrico 0,3 M para ajustar el pH a 5,5. La muestra de reacción se cargó además en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 (grado preparativo) para aislar las fracciones monoméricas con citrato 30 mM, NaCl 70 mM, pH 5,5 como fase móvil. Al final de la cromatografía, el anticuerpo conjugado AGC2518 se concentró a 2,5 mg/ml en citrato 30 mM, NaCl 70 mM, EDTA 2 mM y 0,5 mg/ml de pABA. Todos los procedimientos se describen en RD.2014.092, Journal No. 211/149, 140619 AEF.

Ejemplo 6 c)**Preparación de una dosis en inyección de ^{227}Th -AGC2518**

Un vial de película de cloruro de torio-227 20 MBq se disolvió en 2 ml de solución de HNO_3 8M y se dejó durante 15 minutos antes de quitar la solución para la aplicación a una columna de intercambio aniónico para la eliminación del Radio-223 que había aumentado en el tiempo. La columna se lavó con 3 ml de HNO_3 8 M y 1 ml de agua antes de la elución del torio-227 con 3 ml de HCl 3M. Se midió la actividad eluida de torio-227 y se transfirió una dosis de 10 MBq a un vial de vidrio vacío de 10 ml. Luego se evaporó el ácido usando una bomba de vacío y sosteniendo el vial en un bloque térmico (ajustado a 120°C) entre 30 y 60 minutos. Después de alcanzar temperatura ambiente, se agregaron 6 ml de conjugado AGC2518 2,5 mg/ml para radiomarcarse. El vial se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se filtró la solución en esterilidad a un vial estéril y se sacó muestra para el análisis por iTLC para determinar las RCP antes del uso.

Ejemplo 6 d)**Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC2518 contra células NCI-H716 con actividades totales diferentes**

Para demostrar la toxicidad celular del ^{227}Th -AGC2518 después de la unión a las células, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad celular in vitro. Para este propósito, se expuso la línea celular de cáncer colorrectal humano NCI-H716 a ^{227}Th -AGC2518. Las actividades totales de 2, 10, 20 y 40 kBq/ml se probaron a una actividad específica de 2 kBq/ μg . Se preparó un control de isotipo no relacionado similar en paralelo. Todos los procedimientos experimentales se describen en RD2014.138. Brevemente, se prepararon 400000 células humanas NCI-H716 /ml en medio RPMI 1640 con 10 % de FBS y 1 % de Penicilina/Estreptomicina y se sembraron a una densidad de 80.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células durante 30 min a 37°C con actividades de entre 0 y 40 kBq/ml de ^{227}Th -AGC2518 y una respectiva muestra de conjugado control de isotipo- ^{227}Th . Después se lavaron las células con medio fresco y se sembraron en una nueva placa de 96 pocillos. Después de 5 y 7 días, se cosecharon las células y se midió la viabilidad usando el conjunto de componentes CellTiterGlo (Promega). La viabilidad se expresó en % por establecimiento del control positivo (células sin tratar) a 100%. Véase la Figura 7.

Ejemplo 7

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC2418 contra células HT29

Ejemplo 7 a)**Generación de anticuerpo monoclonal anti-Mesotelina (BAY 86-1903; AGC2400).**

La generación del anticuerpo monoclonal BAY 86-1903, a partir de aquí referido como AGC2400, se describe en detalle en WO2009068204. Brevemente, se recuperó el anticuerpo por selección por afinidad sobre el antígeno Mesotelina. El anticuerpo de IgG1 humana resultante se expresó en células CHO y se purificó usando una columna de afinidad de proteína A (MAb Select Sure), seguido por eliminación del agregado usando una columna HIC (Toyopearl Butil 600M). El anticuerpo se formuló en PBS, pH 7,5.

Ejemplo 7 b)**Acoplamiento de mAb AGC2400 con el quelante AGC0019 (compuesto de fórmula (VIII)) para dar el Conjugado AGC2418**

La solución que contiene anticuerpos se ajustó a un pH de 7,5. El quelante AGC0019 se disolvió en 1:1 de DMA: solución amortiguada con MES 0,1 M a pH 5,4. Se disolvieron NHS y EDC en solución amortiguada con MES 0,1 M a pH 5,4. Se preparó una solución 1/1/3 equivalentes molares de quelante/NHS/EDC para activar al quelante. Para la conjugación al anticuerpo se cargó una proporción molar de 16,5/16,5/49,5/1 (quelante/NHS/EDC/mAb) del quelante activado al mAb.

Después de 30 minutos, se detuvo la reacción de conjugación con 12% volumen en volumen de ácido cítrico 0,3 M para ajustar el pH a 5,5. La muestra de reacción se cargó además en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 (grado preparativo) para aislar las fracciones monoméricas con citrato 30 mM, NaCl 70 mM, pH 5,5 como fase móvil. Al final de la cromatografía, el anticuerpo conjugado AGC2418 se concentró a 2,5 mg/ml en citrato 30 mM, NaCl 70 mM, EDTA 2 mM y 0,5 mg/ml de pABA. Todos los procedimientos se describen en RD.2014.111, Journal No. 211/160, 140814 AEF.

Ejemplo 7 c)

Preparación de una dosis en ^{227}Th -AGC2418

Un vial de película de cloruro de torio-227 20 MBq se disolvió en 2 ml de solución de HNO_3 8M y se dejó durante 15 minutos antes de quitar la solución para la aplicación a una columna de intercambio aniónico para la eliminación del Radio-223 que había aumentado en el tiempo. La columna se lavó con 3 ml de HNO_3 8 M y 1 ml de agua antes de la elución del torio-227 con 3 ml de HCl 3M. Se midió la actividad eluida de torio-227 y se transfirió una dosis de 10 MBq a un vial de vidrio vacío de 10 ml. Luego se evaporó el ácido usando una bomba de vacío y sosteniendo el vial en un bloque térmico (ajustado a 120°C) entre 30 y 60 minutos. Después de alcanzar temperatura ambiente, se agregaron

6 ml de conjugado AGC2418 2,5 mg/ml para radiomarcarse. El vial se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se filtró la solución en esterilidad a un vial estéril y se sacó muestra para el análisis por iTLC para determinar RCP antes del uso.

Ejemplo 7 d)

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC2418 contra células HT29, que sobreexpresan el antígeno Mesotelina, con actividades totales diferentes

Para demostrar la toxicidad celular del ^{227}Th -AGC2418 después de la unión a las células Mesotelina+, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad celular in vitro. Para este propósito, se expuso la línea de células de cáncer colorrectal humano HT29, transfectada con el antígeno de Mesotelina, a ^{227}Th -AGC2418. Se titularon las actividades totales a lo largo de 12 puntos en una dilución al tercio, comenzando a 5 kBq/ml a una actividad específica de 10 kBq/ μg . Se preparó un control de isotipo no relacionado similar en paralelo. Todos los procedimientos experimentales se describen en RD2014.154. Brevemente, se prepararon 200.000 células HT29 humanas/ml, transfectadas con antígeno de Mesotelina, en medio RPMI 1640 con 10 % de FBS, 1 % de Penicilina/Estreptomicina, 1 % de NaHCO_3 , 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ higromicina B y se sembraron a una densidad de 40.000

células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células durante 6 días a 37°C con actividades de entre 0 y 40 kBq/ml de ^{227}Th -AGC2418 y una respectiva muestra de conjugado control de isotipo- ^{227} . En el día 6, se cosecharon las células y se midió la viabilidad usando el conjunto de componentes CellTiterGlo (Promega). La viabilidad se expresó en % por establecimiento del control positivo (células sin tratar) a 100%.

Ejemplo8

Comparación de estabilidad de conjugados conectados a amida e isotiocianato

AGC1118 y el correspondiente conjugado con una porción de acoplamiento a isotiocianato (AGC1115) se almacenaron en solución acuosa a 40 °C durante 11 días. Se tomaron muestras en forma periódica.

Muestras de 40 °C normalizadas a cada punto de muestreo de 4 °C

	AGC1118	AGC1115
	CAR (%) norm)	CAR (% norm)
Día 0	100	100
Día 5	105	92
Día 11	103	88

Se puede ver a partir de la tabla previa que no se vio una disminución medible en la concentración de conjugado para el conjugado acoplado a amida. Por el contrario, el conjugado a isotiocianato disminuyó en 8% después de 5 días y en 12% después de 11 días.

Ejemplo 9

Ejemplo 9 a)

Generación del anticuerpo monoclonal anti-PSMA (AGC1000)

El anticuerpo monoclonal anti-PSMA, en la presente denominado como AGC1000, se adquirió de Progenics, EE.UU.

Ejemplo 9 b)

Acoplamiento del mAb AGC1000 con el quelante AGC0019 (compuesto de fórmula (VIII)) para dar el Conjugado AGC1018

La solución que contiene anticuerpos se ajustó a un pH de 7,5. El quelante AGC0019 se disolvió en 1:1, DMA: solución amortiguadora de MES 0,1 M a pH 5,5. Se disolvieron NHS y EDC en solución amortiguadora de 0,1 M a pH 5,5. Se preparó una solución 1/1/2 equivalente molar de quelante/NHS/EDC para activar al quelante. Para la conjugación al anticuerpo se cargó una proporción molar de 20/20/40/1 (quelante/NHS/EDC/mAb) del quelante activado al mAb en 4 porciones con 10 minutos entre cada porción. Después de 50 minutos, se

detuvo la reacción de conjugación con 12% volumen en volumen de TRIS 1 M a pH 7,3. El conjugado se purificó y se intercambió la solución amortiguadora por filtración de flujo tangencial (TFF). La solución amortiguadora de formulación fue Citrato 30 mM, NaCl 70 mM, EDTA 2 mM, 0,5 mg/ml de pABA, pH 5,5. Al final de la diafiltración, se descargó la solución a un recipiente a granel y se ajustó la concentración a 2,7 mg/ml. Finalmente, se filtró la solución a granel a través de un filtro de 0,2 μ m estéril y se transfirió a viales estériles para almacenamiento a -20 °C.

Ejemplo 9 c)

Preparación de una dosis para inyección de ^{227}Th -AGC1018

Un vial de película de cloruro de Th-227 aproximadamente 50 MBq se disolvió en 2 ml de solución de HNO_3 8 M y se dejó durante 15 minutos antes de quitar la solución para la aplicación a una columna de intercambio aniónico para la eliminación del Radio-223 que había aumentado en el tiempo. La columna se lavó con 3 ml de HNO_3 8 M y 1 ml de agua antes de la elución del Th-227 con 3 ml de HCl 3M. El eluato de HCl se evaporó usando una bomba de vacío y un bloque de calentamiento ajustado a 100 °C entre 60 y 90 minutos. La actividad del Th-227 seco se midió en un calibrador de dosis. El Th-227 seco se disolvió en HCl 0,05 M para

dar una concentración de 0,5 MBq/ μ l. Para radiomarcar, el conjugado AGC1018 se diluyó en solución amortiguadora de formulación con el objetivo de conseguir 25 μ g de mAb en 200 μ l. Con la solución de AGC1018, se mezcló 1 MBq de Th-227 y se midió la actividad exacta de Th-227 en un detector de Germanio. Se dejó que transcurra la quelación entre 30 y 60 minutos a temperatura ambiente antes de filtración estéril a un vial estéril. Se extrajo una muestra para análisis por iTLC para determinar las RCP antes del uso.

Ejemplo 9 d)

Citotoxicidad de ^{227}Th -AGC1018 contra células LNCaP que expresan PSMA

Para demostrar la toxicidad celular del ^{227}Th -AGC1018 después de la unión a células positivas a PSMA, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad celular in vitro. Para este propósito, se expuso la línea celular de de cancer de próstata humano LNCaP a ^{227}Th -AGC1018. Se titularon las actividades totales a lo largo de 12 puntos en una dilución al tercio, comenzando a 20 kBq/ml a una actividad específica de 40 kBq/ μ g. Se preparó un control de isotipo no relacionado en paralelo. Todos los procedimientos experimentales se describen en el archivo RD.2015.101. Brevemente, se cultivaron células LNCaP humanas en medio RPMI 1640

suplementado con 10 % de FBS y 1 % de Penicilina/Estreptomicina. Se sembraron las células a una densidad de 2500 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. 24 horas después del sembrado (Día 1), se expusieron las células a ^{227}Th -AGC1018 y control de isotipo- ^{227}Th a actividades totales en el rango entre 0 y 20 kBq/ml durante 5 días a 37°C. En el día 6, se cosecharon las células y se midió la viabilidad usando el conjunto de componentes CellTiterGlo (Promega). La viabilidad se expresó en % por establecimiento del control positivo (células sin tratar) a 100%.