



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119443** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 51/10** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2015 12247</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Ларсен Рой Г. (NO), Репетто-Лламазарес Ада (NO)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>06.06.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>НОРДІК НАНОВЕКТОР АСА, Kjelsåsveien 168B, N-0884 Oslo, Norway (NO)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.06.2019</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>РА 2013 70313</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO2011/092295 A2, 04.08.2011, WO2013/088363 A1, 20.06.2013, ERIKA ELGSTRÖM ET AL, "Pattern of antigen expression in metastases after radioimmunotherapy of a syngeneic rat colon carcinoma utilizing the BR96 antibody", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY &amp; ONCOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, (20121113), vol. 1, no. 1, doi: 10.1186/2162-3619-1-34, ISSN 2162-3619, page 34, XP021123309 [AD] 1-19 * abstract *, Jerry A Peterson ET AL, "Cancer Res Carcinomas Target Antigen Expression (Breast MUC-1 Mucin) in Breast Effect of Multiple, Repeated Doses of Radioimmunotherapy on Updated version", (19970714), pages 1103 - 1108, URL: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/6/1103.full.pdf">http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/6/1103.full.pdf</a>, (20140714), XP055128668 [A] 1-19 * abstract *.</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>07.06.2013</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>DK</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>11.04.2016, Бюл.№ 7</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.06.2019, Бюл.№ 12</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/EP2014/061824, 06.06.2014</b>		

**(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ АНТИГЕНУ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується радіоімунокон'югатів, які здатні до підвищуючої регуляції експресії одного або більше антигенів. Антигени з підвищеною регуляцією можуть являти собою антигени, які спрямовуються радіоімунокон'югатами або іншими антигенами, експресованими на таких самих клітинах. Винахід також стосується способів лікування раку та захворювань та розладів імунної системи застосуванням даної підвищеної експресії антигенів.

UA 119443 C2



### Галузь винаходу

Винахід стосується радіоімунокон'югатів, які здатні до підвищуючої регуляції експресії одного або більше антигенів. Антигени з підвищеною регуляцією можуть представляти собою антигени, які є спрямованими радіоімунокон'югатами або різними антигенами, експресованими в тих самих клітинах.

### Передумови створення винаходу

Застосування терапії моноклональними антитілами (МАТ) відноситься до галузі, що викликає велику зацікавленість та потребує великих дослідницьких зусиль. Для того, щоб бути ефективною, МАТ залежить від достатньої кількості антигенів на клітину, антигени якої можуть зв'язуватись, запускаючи відповідь (Sugimoto et al., 2009, Czuczman et al., 2008).

Застосування радіоімунотерапії (RIT) було схвалене як терапевтичний варіант в терапії раку (Stevens et al., 2012). Сьогодні радіоімунотерапію головним чином застосовують у тих пацієнтів, які зазнають рецидивів після хіміотерапії та/або МАТ (Stevens et al., 2012).

З літератури відомо, що високий рівень дози зовнішнього опромінення пучком може викликати збільшення CD20 в В-клітинах, та що дана відповідь інгібувалась антиоксидантами, такими як аскорбінова кислота, ПЕГ-каталаза, тощо, та посилювалась окиснювачами, такими як  $H_2O_2$  та бутіоніну сульфоксимін (Kunala et al., 2001; Gupta et al., 2008). Слід відзначити, що ефект тривав протягом тільки приблизно 48 год. після зовнішнього опромінення пучком.

Однак, не було відомо, що радіоімунотерапія з низьким рівнем дози могла б підвищувати регулювати експресію антигену. Фактично, Elgström et al. (2012) виявили зменшення експресії антигену після експериментальної радіоімунотерапії.

Крім того, терапія моноклональними антитілами може спричиняти знижену експресію антигену в клітинах пухлини (Musto et al., 2011), а також антитілами в поєднанні з хіміотерапією (Hiraga et al., 2009).

Таким чином, в даній галузі відомо, що зовнішнє опромінення пучком з високим рівнем дози може спричинити підвищену експресію антигену, та що радіоімунотерапія та терапія моноклональними антитілами може спричинити знижену експресію антигену в ракових клітинах.

Представлений стандарт застосування радіоімунотерапії як відновлюючого лікування, наприклад, ритуксимабом (антитіло), надається як підготовче кондиціонує лікування перед зеваліном (радіоімунокон'югат).

Проблемою в даному підході є те, що експериментальна робота та клінічні дані показали, що терапія антитілами може спричинити дрейф антигенів, який є тиском відбору в клітинах з низькою експресією антигену, які стають резистентними до лікування (Musto and D'Auria, 2011). Крім того, було вказано в експериментальній RIT (Elgström et al., 2012).

Таким чином, спрямований терапевтичний варіант, який міг би викликати протилежний ефект, тобто, збільшення антигенів в оброблених клітинах, повинен бути дуже цінним терапевтичним засобом.

### Суть винаходу

Винахід стосується радіоімунокон'югатів, які здатні до підвищуючої регуляції експресії одного або більше антигенів. Антигени з підвищеною регуляцією можуть представляти собою антигени, які є спрямованими радіоімунокон'югатами, різними антигенами, експресованими в тих самих клітинах, або їх комбінацією.

Дана експресія дозволяє спрямовуюче та специфічне інгібування ракових клітин та клітин імунної системи.

Таким чином, один аспект винаходу стосується радіоімунокон'югата, який містить моноклональне антитіло, необов'язковий лінкер та радіонуклід, для застосування в підвищуючій регуляції антигенної експресії одного або більше антигенів.

В одному варіанті здійснення винаходу передбачається один або більше підвищувачи регулюваних антигенів, експресованих на поверхні В-клітинних ракових клітин.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається підвищена регуляція, виконана перед імунотерапією або терапією імунокон'югатом у пацієнта, який страждає від раку.

В наступному варіанті здійснення винаходу передбачається пацієнт, що страждає від В-клітинної злоякісної пухлини, вибраної з групи, що складається з неходжкінської лімфоми та хронічного лімфоцитарного лейкозу.

В ще іншому варіанті здійснення винаходу передбачається мічене радіоактивним ізотопом моноклональне антитіло HH1.

В одному варіанті здійснення винаходу передбачається лінкер, хелатуючий лінкер, вибраний з групи, що складається з p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-естер, p-SCN-Bn-DTPA та CHX-A"-DTPA.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається радіонуклід, вибраний з групи, що складається з  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{117}\text{mSn}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  та  $^{227}\text{Th}$ .

В наступному варіанті здійснення винаходу передбачається підвищуючи регульований антиген, вибраний з групи, що складається з CD37, CD19, CD20, CD21, CD22, HLA-DR, CD23, CD39, CD52, CDw75 та CD80.

В ще іншому варіанті здійснення винаходу передбачається радіоімунокон'югат, сформульований у вигляді фармацевтичної композиції.

В іншому варіанті здійснення представлений винахід включає фармацевтичну композицію, один або більше фармацевтично прийнятні носії або ад'юванти.

В наступному варіанті здійснення винаходу передбачається застосування в комбінованій терапії, де радіоімунокон'югат слідує одночасно з або після лікування терапією антитілами, терапією імунокон'югатом або їх комбінацією.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається підвищуючи регульований антиген CD20, та підвищена регуляція слідує за анти-CD20 терапією антитілами з ритуксимабом при одноразовому введенні або в схемах повторюваних введень.

В ще іншому варіанті здійснення винаходу передбачається одночасна або після лікувальна спрямована взаємодія іншого антигену, ніж радіоімунокон'югат.

Інший аспект винаходу стосується способу підвищуючої регуляції антигенної експресії, який включає введення радіоімунокон'югата особі, для якої підвищуючи регульована антигенна експресія буде доцільною.

В одному варіанті здійснення винаходу передбачається людина, яка страждає від В-клітинної злоякісної пухлини.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається застосування комбінованої терапії, в якій радіоімунокон'югат вводять одночасно або після лікування терапією антитілами, терапією імунокон'югатом або їх комбінацією.

В іншому варіанті здійснення радіоімуноterapia та імуноterapia або терапия імунокон'югатом повторюється в декількох циклах.

В іншому варіанті здійснення радіоімуноterapia надається у вигляді низької дози, яка сама по собі має низький ефект щодо загибелі клітин в пухлині, але має значну підвищену регуляцію антигену.

Короткий опис креслень

Фігура 1 - підвищення CD20 та CD37 експресії в клітинах Дауді після 24 годин інкубування з беталутином ( $t=0$  після видалення беталутину при додаванні свіжого середовища) як визначено, застосовуючи проточну цитометрію.

Фігура 2 - підвищена регуляція CD37 та CD20 в клітинах Дауді, інкубованих протягом 1 години та 24 годин з  $^{177}\text{Lu}$ -тетуломабом (беталутином) як визначено, застосовуючи проточну цитометрію.

Фігура 3 (Таблиця 1) - підвищення антигенної експресії після 1 години інкубування з  $^{177}\text{Lu}$ -тетуломабом (беталутином) як визначено, застосовуючи проточну цитометрію.

Фігура 4 (Таблиця 2) - підвищена регуляція CD20 та CD37 для клітин, оброблених  $^{177}\text{Lu}$ -ритуксимабом (беталутином) як визначено, застосовуючи проточну цитометрію.

Фігура 5 (Таблиця 3) - % підвищення зв'язування  $^{125}\text{I}$ -ритуксимабу з клітинами пухлини після радіоімуноterapiї в порівнянні з контролем 4 дні/8 днів/11 днів/15 днів після додавання беталутину або контролю, як визначено, застосовуючи аналіз клітинного зв'язування.

Фігура 6 - біорозподілення  $^{125}\text{I}$ -ритуксимабу через 3 дні після ін'єкції  $^{125}\text{I}$ -ритуксимабу. Мишам ін'єкційно вводили за 5 днів раніше або з 350 МБк/кг беталутин (оброблені) або холодний HH1 (контроль).

Винахід зараз буде описано більш детально наступним чином.

Детальний опис винаходу

Автори винаходу на свій подив виявили при здійсненні експериментів з низьким рівнем дози бета випромінюючого  $^{177}\text{Lu}$ -міченого HH1 антитіла (який також називають " $^{177}\text{Lu}$ -тетуломаб", або "беталутин") проти В-клітинного асоційованого антигену CD37, що клітини, оброблені цим, будуть підвищуючи регулювати експресію як CD37, так і CD20, інший В-клітинний асоційований антиген.

Таким чином, показано, що лікування  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 може покращити стан при МАТ в В-клітинних захворюваннях, таких як рак та аутоімунне захворювання.

Крім того, несподівано було виявлено, що низький рівень дози радіоімуноterapiї, застосовуючи  $^{177}\text{Lu}$ -HH-1 проти CD37 антиген-позитивних клітин не тільки спричиняло зростання

експресії антигену в ракових клітинах, але також викликало тривалий ефект у порівнянні з опублікованими даними для зовнішнього опромінення пучком.

Лікування радіоімунотерапією спричиняло підвищену експресію як CD37, так і CD20 антигенів. Потрібно мати на увазі, що радіоімунотерапія з, наприклад, <sup>177</sup>Lu-NH-1 могла б використовуватись як індукційна терапія до терапії антитілами, оскільки терапія антитілами

сильно залежить від прийнятої експресії антигену. Іншим заслуговуючим уваги виявленням було те, що підвищуюче регульована антигенна експресія могла тривати від одного до двох тижнів після дії радіоімунотерапії в порівнянні з тільки приблизно двома днями після зовнішнього опромінення пучком.

Передбаченим може бути новий спосіб використання спрямованої терапії антитілами, тобто, індукційна терапія з радіоімунотерапією з наступною терапією антитілом або антитіло-кон'югатом в наступні дні та тижні, щоб використовувати підвищену антигенну експресію.

Таким чином, представлений винахід стосується радіоімунокон'югатів, які здатні до підвищуючої регуляції експресії одного або більше антигенів. Антигени з підвищеною регуляцією можуть представляти собою антигени, які спрямовуються радіоімунокон'югатами, різними антигенами, експресованими в тих самих клітинах, або комбінацією.

Дана експресія надає спрямоване та специфічне інгібування ракових клітин та клітин імунної системи.

Застосування радіоімунокон'югатів

Таким чином, один аспект винаходу стосується радіоімунокон'югата, який містить моноклональне антитіло, необов'язковий лінкер та радіонуклід, для застосування в підвищуючій регуляції антигенної експресії або одного або більше антигенів.

В одному варіанті здійснення винаходу передбачається один або більше підвищуючи регульованих антигенів, експресованих на поверхні В-клітинних ракових клітин.

В іншому варіанті здійснення винаходу радіоімунокон'югати винаходу будуть пригнічувати клітини імунної системи.

Такі клітини імунної системи можуть викликати захворювання, такі як аутоімунні захворювання.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається підвищена регуляція, проведена перед імунотерапією або терапією імунокон'югатом у пацієнта, який страждає від раку або захворювання.

В наступному варіанті здійснення винаходу пацієнт страждає від В-клітинної злоякісної пухлини, вибраної з групи, що складається з неходжкінської лімфоми, гострого лімфобластного лейкозу та хронічного лімфоцитарного лейкозу.

В одному варіанті здійснення винаходу пацієнт страждає від В-клітинної злоякісної пухлини, яка представляє собою неходжкінську лімфому.

В одному варіанті здійснення винаходу пацієнт страждає від В-клітинної злоякісної пухлини, яка представляє собою гострий лімфобластний лейкоз.

В одному варіанті здійснення винаходу пацієнт страждає від В-клітинної злоякісної пухлини, яка представляє собою хронічний лімфоцитарний лейкоз.

В іншому варіанті здійснення радіоімунотерапія надається у вигляді низької дози, яка сама по собі має низький ефект щодо загибелі клітин в пухлині, але має значну підвищену регуляцію антигену.

В контексті винаходу термін підвищуючи регульований визначається як значно підвищена експресія антигену на протеїновому рівні або рівні мРНК.

Винахід несподівано показав, що попереднє лікування В-клітинної злоякісної пухлини, застосовуючи <sup>177</sup>Lu-мічене NH1 антитіло, є здатною до підвищуючої регуляції ритуксимабом мішені CD20.

Таким чином, один аспект винаходу стосується застосування комбінованого лікування В-клітинної злоякісної пухлини, застосовуючи <sup>177</sup>Lu-мічене NH1 антитіло з подальшим ритуксимабом.

Переважаючий варіант здійснення винаходу стосується <sup>177</sup>Lu-міченого NH1 антитіла з подальшим ритуксимабом для застосування в лікуванні В-клітинної злоякісної пухлини.

Дане вікно між введенням <sup>177</sup>Lu-міченого NH1 антитіла та ритуксимаба може бути оптимізованим, щоб генерувати максимальну підвищену регуляцію на CD20. Вікно зазвичай буде становити щонайменше один день, 3-5 днів або 3-10 днів.

Вікно також може становити 0-30 днів, більш переважно 3-15 днів після здійснення радіоімунотерапії. У випадку тривалого часу циркулювання антитіл навіть при спільному або попередньому лікуванні може розглядатись, якщо тільки антитіло є присутнім в значній концентрації в крові в момент, коли має місце підвищуючи регуляція антигену.

В межах обсягу винаходу передбачається застосування радіоімунотерапії з іншим міченим радіоактивним ізотопом антитілом проти CD37 або інших антигенів, асоційованих з гематологічним раком, наприклад, міченим радіоактивним ізотопом анти-CD20 антитілом, включаючи ібритумомаб, тозитумомаб, ритуксимаб, офатумумаб, велтузумаб та окрелизумаб, або міченим радіоактивним ізотопом CD19, CD21, CD22, HLA-DR, CD23, CD39, CD52, CDw75 або CD80 антитілом, включаючи блінатумомаб та епратузумаб.

Прикладами використовуваних радіонуклідів будуть  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{117}\text{mSn}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  та  $^{227}\text{Th}$ , які можуть бути кон'югованими з допомогою хелатуючого лінкера з антитілом або електрофільною або нуклеофільною взаємодією з групами протеїну.

Радіоімунокон'югати

Радіоімунокон'югати можуть бути будь-якими, які є здатними зв'язуватися з або спрямовано взаємодіяти з антигеном, що викликає зацікавленість.

Радіоімунокон'югати включають, але не обмежуються цим, зевалін, Веххаг та беталутин.

В контексті винаходу передбачається беталутин, який також називають, як  $^{177}\text{Lu}$ -HN1,  $^{177}\text{Lu}$ -HN-1,  $^{177}\text{Lu}$ -тетуломаб або  $^{177}\text{Lu}$ -тетраксетан-тетуломаб.

В іншому варіанті здійснення винаходу один або більше антитіл або радіоімунокон'югатів спрямовано взаємодіятимуть з CD20.

Антитіла включають, але не обмежуються цим, ритуксимаб, велтузумаб, офатумумаб, афутузумаб, тозитумомаб, редитукс та ібритумомаб.

В іншому варіанті здійснення винаходу один або більше антитіл або радіоімунокон'югатів спрямовано взаємодіятимуть з CD37.

В переважному варіанті здійснення винаходу CD37 радіоімунокон'югат представляє собою беталутин.

Антитіла

Антитіла за винаходом можуть бути будь-яким моноклональним антитілом, здатним спрямовано взаємодіяти з будь-яким з антигенів, які обговорюються нижче.

Антитіла включають, але не обмежуються цим, ритуксимаб, епратузумаб, L19, F8, F16, галиксимаб, торалізумаб, алемтузумаб, офатумумаб, велтузумаб, афутузумаб, тозитумомаб, редитукс, ібритумомаб, K7153A, 37.1 та HN1.

В одному варіанті здійснення винаходу моноклональним антитілом є HN1 (тобто, тетуломаб).

В одному варіанті здійснення винаходу моноклональним антитілом є ритуксимаб.

Конкретні варіанти HN1 розкриті в PCT/IB2012/057230 та PCT/EP2011/051231, які, таким чином, є включеними з допомогою посилань та розкриті, як конкретні варіанти здійснення, які є включеними в даний винахід.

Тому можливим буде регулювати варіант HN1, включений в радіоімунокон'югати винаходу, ґрунтуючись на зазначених вище розкриттях.

Такий варіант включає химерні варіанти або варіанти з певною ідентичністю послідовності з ланцюгами HN1.

В переважному варіанті здійснення винаходу варіантом є химерний HN1 або гуманізований HN1.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається химерний варіант HN1 chHN1.1, який є химерним HN1 ізотипом IgG1, або chHN1.3H, який є химерним HN1 ізотипом IgG3 з R435H мутацією.

В іншому варіанті здійснення винаходу моноклональним антитілом є ритуксимаб.

Лінкери

Радіонуклід може бути приєднаним до антитіла з допомогою необов'язкового лінкера.

Наприклад, радіоімунокон'югати з йодом не потребують лінкер. Це означає, що  $^{125}\text{I}$ -HN1 не потрібно включати лінкер.

Радіонуклід може приєднуватись до антитіла спочатку за рахунок взаємодії біфункціонального хелатуючого агента, наприклад, p-SCN-bn-DOTA (Macrocyclics, Tx, USA), з антитілом, з подальшим очищенням, щоб видалити некон'югований хелатуючий агент, та потім за рахунок взаємодії кон'югата хелатуючий агент-антитіло з радіонуклідом, з подальшим очищенням, щоб видалити будь-який некон'югований радіонуклід.

Альтернативно, спочатку можуть бути поєднані хелатуючий агент та радіонуклід, та потім кон'юговані з антитілом.

Хелатуючі лінкери, такі як, наприклад, p-SCN-bn-DOTA, можуть застосовуватись для кон'югації інших металевих радіонуклідів з HN1 аналогічно до тієї, яка описана для  $^{177}\text{Lu}$ .

Будь-який тип лінкера з достатньою комплексоутворюючою здатністю та функціональною групою, що дозволяє безпосередню або опосередковану кон'югацію з протеїном або пептидом міг би застосовуватись.

Приклади таких лінкерів описані в літературі (наприклад Brechbiel, 2008; Liu, 2008). Деякими прийнятними прикладами є біфункціональні циклічні хелатуючі агенти, такі як p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-естер; біфункціональні лінійні хелатуючі агенти, такі як p-SCN-Bn-DTPA та CHX-A"-DTPA.

Радіонукліди в представленому винаході переважно будуть кон'югованими зі специфічною молекулою застосуванням біфункціональних хелатуючих агентів.

Вони можуть бути циклічними, лінійними або розгалуженими хелатуючими агентами. Конкретне посилення може бути зроблене на поліамінополікислотні хелатуючі агенти, які містять лінійний, циклічний або розгалужений полізаалкановий скелет з кислотними (наприклад, карбоксилатними) групами, приєднаними до нітрогенів скелету.

Приклади прийнятних хелатуючих агентів включають похідні DOTA, такі як п-ізотіоціанатобензил-1,4,7,10-тетраазаціклодекан-1,4,7,10-тетраоцтова кислота (p-SCN-Bz-DOTA) та похідні DTPA, такі як п-ізотіоціанатобензил-діетилентриамінпентаоцтова кислота (p-SCN-Bz-DTPA), перший з яких є циклічними хелатуючими агентами, останній - лінійними хелатуючими агентами.

Металювання комплексоутворюючого фрагмента можуть виконувати перед або після кон'югації комплексоутворюючого фрагмента зі специфічним фрагментом.

Процедура введення радіоактивної мітки, загалом, буде більш придатною з точки зору використовуваного часу, тощо, якщо хелатуючий агент є кон'югованим з антитілом перед тим, як відбувається введення радіоактивної мітки.

Принципи одержання мічених радіоактивним ізотопом кон'югатів, застосовуючи хелатуючі агенти, приєднані до антитіл, широко описані в, наприклад, Liu, 2008.

Таким чином, НН1 можуть застосовувати, щоб отримати радіоімунокон'югати з відмінностями у властивостях випромінювання та ефективних періодів напіввиведення.

Таким чином, в одному варіанті здійснення винаходу передбачається лінкер, хелатуючий лінкер, вибраний з групи, що складається з p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-естеру, p-SCN-Bn-DTPA та CHX-A"-DTPA.

Бета та/або альфа-випромінюючі радіонукліди з металевим характером дозволяє комплексоутворення з біфункціональними хелатними лінкерами з наступними ілюстративними, але не обмеженими цим, Bn-TCMC, DOTA, Bn-DOTA, Bn-NOTA, Bn-оксо-DO3A, DTPA, CHX-A-DTPA, Bn-DTPA, Bn-PCTA, та молекулами з класів каліксаренів, криптатів та криптаннів, тощо.

Таким чином, лінкером може бути біфункціональний хелатуючий лінкер.

В одному варіанті здійснення винаходу лінкером є хелатуючий лінкер.

Радіонукліди

Як зазначається вище, можливим є конструювати радіоімунокон'югати, що мають різні випромінюючі властивості та ефективні періоди напіврозпаду.

Природна частина конструювання таких радіоімунокон'югатів представляє собою вибір радіонукліда.

В переважному варіанті здійснення винаходу радіонуклід є металевим радіонуклідом.

В наступному варіанті здійснення винаходу радіонуклідом є альфа випромінювач.

Альфа випромінювач може бути вибраним з групи, що складається з  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$ .

В наступному варіанті здійснення винаходу радіонуклідом є бета випромінювач.

Бета випромінювач може бути вибраним з групи, що складається з  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ .

В іншому варіанті здійснення винаходу радіонуклід вибирають з групи, що складається з  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{117}\text{mSn}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  та  $^{227}\text{Th}$ .

В ще іншому варіанті здійснення винаходу період напіврозпаду радіонукліду становить менше, ніж 24 години, та радіонуклід вибирають з групи, що складається з  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ .

В іншому варіанті здійснення винаходу період напіврозпаду радіонукліду становить більше, ніж 24 години, та радіонуклід вибирають з групи, що складається з  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{117}\text{mSn}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  та  $^{227}\text{Th}$ .

Антигени

Антигени за винаходом є антигенами, які можуть бути підвищуючи регульованими радіоімунокон'югатами за представленим винаходом.

Дана підвищена регуляція також може розглядатися як підвищення або індукування експресії антигену. Підвищена регуляція або підвищення може вимірюватися з використанням

стандартних способів, відомих кваліфікованому фахівцю в даній галузі, включаючи вестерн-блоттинг та FACS.

Це може бути один антиген, що є підвищуючи регульованим, але він також може бути декількома.

Наприклад, можливим є підвищуючи регулювати як CD20, так і CD37 з допомогою радіоімунокон'югатів за представленим винаходом.

Таким чином, в одному варіанті здійснення винаходу підвищуючи регульований антиген вибирають з групи, що складається з CD37, CD19, CD20, CD21, CD22, HLA-DR, CD23, CD39, CD52, CDw75 та CD80.

В наступному варіанті здійснення винаходу підвищуючи регульованим антигеном є CD37.

В ще наступному варіанті здійснення винаходу підвищуючи регульованим антигеном є CD20.

В іншому варіанті здійснення винаходу підвищуючи регульованим антигеном є CD22.

В-клітинні антигени, які є підвищуючи регульованими радіоімунотерапією або потенційно можуть бути підвищуючи регульованими, включають CD19, CD20, CD22, CD37 та CD52.

Таким чином, в наступному варіанті здійснення винаходу антигени вибирають з переліку, що складається з CD19, CD20, CD22, CD37 та CD52.

В ще іншому варіанті здійснення винаходу В-клітинні специфічні антигени вибирають з групи, що складається з CD19, CD20, CD22, CD37.

В наступному варіанті здійснення винаходу як CD20, так і CD37 підвищуючи регулюються радіоімунокон'югатами за представленим винаходом.

В іншому варіанті здійснення винаходу як CD22, так і CD37 підвищуючи регулюються радіоімунокон'югатами за представленим винаходом.

В ще іншому варіанті здійснення винаходу як CD52, так і CD37 підвищуючи регулюються радіоімунокон'югатами за представленим винаходом.

В іншому варіанті здійснення винаходу як CD19, так і CD37 підвищуючи регулюються радіоімунокон'югатами за представленим винаходом.

Антиген також може бути антигеном, специфічним для аутоімунних захворювань або розладів.

Коли антиген є специфічним для аутоімунного захворювання, він є антиген понижуюче регульованим, та, таким чином, має здатність лікувати, наприклад, запалення.

Приклади таких антигенів є TNF- $\alpha$ , IL-2 або імуноглобулін E.

В іншому варіанті здійснення винаходу захворюванням є множинна мієлома, та антиген вибирають з групи, що складається з CD38, CD138, BCMA, CD317, CS1, CD40, BLyS, CD56, CD52, KMA, GRP78, BAFF, CXCR4 та LMA.

Антитіла, які беруть участь в лікуванні множинної мієломи або в розробці лікування множинної мієломи, можуть бути вибрані з групи, що складається з деносумаба, елотузумаба, даратумумаба, мілатузумаба, лукатумумаба, MDX-1097, PAT-SM6, табалумаба, улокулумаба та MDX-1458.

Антитільні кон'югати лікарського засобу для лікування множинної мієломи можуть бути вибрані з групи, що складається з BT062, мілатузумаба-DOX, лорвотузумаба-мертанзина.

Антитіла, які беруть участь в лікуванні остеолітичного захворювання кісток у пацієнтів з множинною мієломою, можуть бути вибрані з групи, що складається з анти-DKK-1 антитіла BHQ-880, що сприяє активності остеобластів, які утворюють кістки.

Анти-RANKL антитіло деносумаб знижує активність остеобластів, які руйнують кісткову тканину.

Таким чином, в одному варіанті здійснення винаходу антитілом є деносумаб, та захворювання є остеопорозом.

Антиген ангіогенезу VEGF може представляти собою анти-VEGF антитіло бевацизумаб, що запобігає росту нових кровоносних судин в ракових клітинах.

Таким чином, в одному варіанті здійснення винаходу ангіогенез в ракових клітинах є специфічним, антигеном є VEGF, та антитілом є бевацизумаб.

В межах обсягу винаходу передбачається застосування міченого радіоактивним ізотопом антитіла щодо одного із зазначених вище мієломних антигенів, щоб індукувати підвищуючу регуляцію антигену.

Фармацевтичні композиції

Антитіла, сформульовані в фармацевтичні композиції, як правило, застосовують в лікуванні захворювань.

Такі композиції є оптимізованими щодо параметрів, таких як фізіологічна толерантність та термін придатності.



Таким чином, в одному варіанті здійснення винаходу передбачається радіоімунокон'югат, сформульований як фармацевтична композиція.

Варіант здійснення винаходу стосується фармацевтичної композиції, як описано вище, яка додатково містить один або більше додаткових терапевтичних агентів.

5 В іншому варіанті здійснення винаходу зазначений один або більше додаткових терапевтичних агентів вибирають з агентів, які індукують апоптоз.

Як правило, важливим елементом фармацевтичної композиції є буферний розчин, який в значній мірі підтримує хімічну цілісність радіоімунокон'югату, та, який є фізіологічно прийнятним для інфузійного введення пацієнтам.

10 В одному варіанті здійснення винаходу фармацевтична композиція містить один або більше фармацевтично прийнятних носіїв та/або ад'ювантів.

Прийнятні фармацевтичні носії включають, але не обмежуються цим, нетоксичні буфери, наповнювачі, ізотонічні розчини, тощо. Більш конкретно, фармацевтичним носієм може бути, але не обмежується цим, фізіологічний розчин (0,9 %), наполовину фізіологічний розчин, лактат Рінгера, 5 % декстроза, 3,3 % декстроза /0,3 % сольовий розчин. Фізіологічно прийнятний носій може містити радіолітичний стабілізатор, наприклад, аскорбінову кислоту, який захищає цілісність радіофармацевтичного препарату під час зберігання та транспортування.

Один з варіантів здійснення винаходу включає фармацевтичну композицію за представленим винаходом та один або більше додаткових антитіл або радіоімунокон'югатів.

20 Спосіб лікування

Терапевтичне застосування радіоімунокон'югату відповідно до винаходу може бути для лікування проти злоякісних клітин, які експресують антиген, як описано в даному документі, включаючи, але не обмежуючись цим, В-клітинні злоякісні пухлини, вибрані з групи, що складається з В-клітинної неходжкінської лімфоми, В-клітинного хронічного лімфоцитарного лейкозу, волосатоклітинного лейкозу, лімфоплазмоцитарної лімфоми, гострого лімфобластного лейкозу та множинної мієломи.

Інші застосування могли представляти собою лікування аутоімунних захворювань та лікування ефектів, пов'язаних з трансплантацією.

Таким чином, один аспект винаходу стосується способу підвищуючої регуляції антигенної експресії, який включає введення радіоімунокон'югата особі, для якої підвищуючи регульована антигенна експресія буде корисною.

Один варіант здійснення винаходу стосується способу лікування В-клітинної злоякісної пухлини, або захворювання або розладу імунної системи, в якому CD20 є мішенню, та радіоімунокон'югат є здатним до підвищуючої регуляції експресії антигену CD20.

35 В переважному варіанті здійснення винаходу радіоімунокон'югат, здатний до підвищуючої регуляції експресії антигену CD20, є беталутином, та ритуксимаб або його варіант є спрямованими на CD20.

Один аспект винаходу стосується комбінованого лікування В-клітинної злоякісної пухлини, або захворювання або розладу імунної системи, застосовуючи беталутин, з подальшим ритуксимабом, обінутузумабом або подібним CD20 терапевтичним антитілом.

В одному варіанті здійснення винаходу людина страждає від В-клітинної злоякісної пухлини, або захворювання або розладу імунної системи.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається застосування комбінованої терапії, де радіоімунокон'югат слідує одночасно з або після лікування терапією антитілами, терапією імунокон'югатом або їх комбінацією.

45 Терапія може здійснюватись або як монотерапія, або в комбінації з іншими видами терапії, переважно стандартними лікуваннями. Такі інші терапії можуть представляти собою попереднє лікування, хірургію, хімотерапію (включаючи доксорубіцин, вінбластин та гемцитабін), імунотерапію, терапію антитілами, фотодинамічну терапію, інгібітор протеасом (включаючи бортезоміб), інгібітори гістондеацетилази (включаючи вориностат та субероіланілід гідроксамової кислоти), вітамін D3 та аналоги вітаміну D3, інгібітори контрольних точок клітинного циклу (включаючи UCN-01 та 2-(4-(4-хлорфенокси)феніл)-1Н-бензімідазол-5-карбоксамід), радіосенсибілізатори гіпоксичних клітин (включаючи метронідазол та мізонідазол), радіосенсибілізатори індукторів апоптозу (включаючи візаферин А), радіо імунотерапію або комбінацію з двох або більше з них.

Під "введенням" мають на увазі внутрішньовенну інфузію або внутрішньовенну ін'єкцію. Більш конкретно, радіоімунокон'югат за винаходом може вводиться безпосередньо у вену з допомогою периферійної канюлі, з'єднаної з крапельницею, що запобігає повітряній емболії та дозволяє оцінити швидкість потоку в організм пацієнта.

60 В одному варіанті здійснення радіоімунокон'югат може вводиться в повторювальній манері.

В іншому варіанті здійснення радіоімунокон'югат з наступним моноклональним антитілом (або імунокон'югатом) обидва можуть вводитись в повторювальній манері.

В іншому варіанті здійснення винаходу радіоімунокон'югат може вводитись в повторювальній манері, але з різними радіонуклідами, наприклад, бета-радіоімуноterapia може бути з наступною альфа-радіоімунотерапією або навпаки.

Один з аспектів винаходу стосується застосування радіоімунокон'югата за представленим винаходом в лікуванні В-клітинних злоякісних новоутворень.

Варіант здійснення винаходу стосується застосування радіоімунокон'югата за представленим винаходом, який вводиться в комбінації з або на додаток до іншої терапії.

В одному з варіантів здійснення винаходу інші терапії вибирають з попереднього лікування, хіміотерапії, терапії моноклональними антитілами, хірургії, променевої терапії та/або фотодинамічної терапії.

В іншому варіанті здійснення винаходу інші терапії представляють собою трансплантацію кісткового мозку або трансплантацію та/або терапію стовбуровими клітинами.

В одному з варіантів здійснення винаходу дозування антитіла становить 1-1000 мг на пацієнта, більш переважно 5-50 мг на пацієнта, та  $^{177}\text{Lu}$  становить в кількості 1-200 МБк/кг, більш переважно 10-100 МБк/кг маси тіла.

Комбінована терапія

Як зазначалося вище, радіоімунокон'югат можуть застосовувати в комбінації з іншими видами терапії.

Таким чином, в наступному варіанті здійснення винаходу передбачається застосування в комбінованій терапії, де радіоімунокон'югат слідує одночасно або після лікування з терапією антитілами, терапією імунокон'югатом або їх комбінацією.

В іншому варіанті здійснення винаходу передбачається підвищуючи регульований антиген CD20, та підвищена регуляція є з подальшою анти-CD20 терапією антитілами з ритуксимабом в одному введенні або в схемах повторюваних введень.

Таким чином, можливим є застосування представлених радіоімунокон'югатів, щоб підвищуючи регулювати інші антигени, ніж антиген мішені радіоімунокон'югатів.

Таким чином, в ще іншому варіанті здійснення винаходу передбачається одночасна або після лікувальна спрямована взаємодія іншого антигену, ніж радіоімунокон'югат.

Схема введення може бути в одноразовому введенні, де радіоімунокон'югати підвищуючи регулюють та експресують один або більше антигенів, які потім спрямовуються на одиничну дозу або декілька доз антиген-специфічної терапії.

Така терапія може представляти собою моноклональне антитіло, таке як ритуксимаб або HH1, в залежності від антигену у фокусі.

Терапія може повторюватися в циклічній схемі, де введення радіоімунокон'югатів та моноклональних антитіл повторюється один раз, двічі або декілька разів.

Перевага такого введення полягає в тому, що клітина-мішень може бути оброблена однаковими або різними антитілами в кожному циклі, що забезпечує те, що антиген з найвищою експресією знаходиться в фокусі.

Стратегія, в якій декілька антигенів перебувають у фокусі, обмежує ризик експресійного дрейфу антигенів, що експресуються на поверхні клітин-мішеней.

Слід зазначити, що варіанти здійснення та ознаки, описані в контексті одного з аспектів винаходу, також застосовуються до інших аспектів винаходу.

Всі патентні та не патентні посилання, цитовані в представленій заявці, є включеними в даний документ у вигляді посилання у всій своїй повноті.

Винахід зараз буде описано більш детально в наступних не обмежуючих прикладах.

Приклади

Приклад 1 - Лікування беталутином ( $^{177}\text{Lu}$ -тетраксетан-тетуломаб, або  $^{177}\text{Lu}$ -HH1) та вплив на експресію антигену

Матеріали & способи:

Введення мітки в антитіла

Введення мітки в антитіло HH-1 з p-SCN-Bn-DOTA та  $^{177}\text{Lu}$  виконували за наступними стандартними процедурами, описаними в Dahle et al. (2013) та Repetto-Llamazares et al. (2013). Радіохімічну чистоту (RCP) радіоімунокон'югата (RIC) оцінювали, застосовуючи миттєву тонкошарову хроматографію. Якщо RCP був нижче 95 %, кон'югат чистили, застосовуючи колонки Econo-Pac 10 DG (Bio-rad Laboratories, California, USA). RCP був вище, ніж 97 % для всіх RIC, які використовували в експериментах. Специфічна активність беталутину становила 92 МБк/кг з концентрацією антитіла 178 мкг/мл. Імунореактивні фракції (IRF) з RIC оцінювали, застосовуючи клітини лімфоми Рамоса та Дауді та однокочовий аналіз. Застосовували

концентрацію клітин 75 мільйонів клітин/мл. Клітини, інкубовані з холодним тетуломабом, застосовували, щоб оцінити неспецифічне зв'язування. Блоковані та неблоковані клітини інкубували протягом 1,5 год. з 40 нг/мл радіоімунокон'югата. Додану активність вимірювали, застосовуючи калібрований гамма детектор (Cobra II автоматичний гамма детектор, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA). Клітини після цього промивали три рази PBS з 0,5 % BSA та зв'язану активність вимірювали в гамма-лічильнику. IRF оцінювали відніманням від неспецифічного зв'язування, вимірюючи, застосовуючи блоковані зразки, зв'язаної активності неблокованих зразків. IRF становив 52 +/- 3 в клітинах Дауді та 75 +/- 1 в клітинах Рамоса.

Введення мітки ритуксимаба з Alexa 647 здійснювали, застосовуючи відповідний набір для введення мітки протеїну Alexa Fluor (Molecular Probes, Life Technologies) відповідно до процедури, передбаченої виробником.

#### Обробка клітин

На день 0, клітини Дауді розбавляли до 1 мільйона клітин/мл, застосовуючи RPMI 1640 доповнений 10 % FBS. Клітини потім розділяли на аліквоти у дві колби для клітинних культур, кожна з яких містила 6 мл. Одна з колб отримала приблизно 4,6 МБк <sup>177</sup>Lu-тетраксетан-тетуломаба (10 мкг/мл) тоді як інша не отримала ніякої обробки. Обидві колби інкубували протягом 24 год., промивали та знову суспендували в свіжому середовищі до концентрації 0,5 мільйонів клітин/мл. Доза поглиненого випромінювання на середовище оброблених клітин становила приблизно 1,1 гр. Як оброблені, так і контрольні клітини потім розділяли на аліквоти в колби для клітинних культур, які відповідали кожній точці часу, який вимірювали. Кожна колба з клітинами містила приблизно 5 мл суспензії клітин. Свіже середовище не додавали до клітин до кінця експеримента через 72 год. після обробки.

#### Вимірювання проточної цитометрії

В кожен момент часу контрольні клітини, де фарбована 0,4 мкг/мл ДНК пляма Hoechst33342 (H33342) протягом 20 хвилин при 37 °C. Потім, контрольні та оброблені клітини промивали та змішували. Клітини інкубували протягом 20 хвилин з холодним тетуломабом для того, щоб наситити всі CD37 сайти. Потім клітини промивали PBS, та анти-CD20 антитіло ритуксимаб, кон'югований з Alexa647, та вторинне кроляче анти-мишаче антитіло (кон'юговане з фікоеритрином (PE) (DakoCytomation) додавали до розчину. Після інкубування на кризі протягом 30 хвилин зразки промивали та вимірювали, застосовуючи проточну цитометрію. Зростання антигенної експресії (CD37 або CD20) розраховували як різницю в інтенсивності вимірювань (у %) між контрольними та обробленими клітинами. Контрольні та оброблені клітини розрізняли за пропусканням блакитної флуоресценції від барвника H3342 в контрольних клітинах" ДНК. Підвищену регуляцію CD20 оцінювали протягом 0, 18, 24, 48 та 72 годин. CD37 оцінювали через 24 та 48 годин. Для контролю, що кроляче анти-мишачий Ab не впливав на вимірювання CD20, фарбування анти-мишачим Ab та без нього виконували через 24 год. та 48 год.

#### Результати:

Відбувалось підвищення CD20 експресії приблизно на 130 % в порівнянні з необробленим контролем для більшості точок часу (Фігура 1). Відбувалось підвищення CD37 експресії приблизно на 60 % (Фігура 1). Не відбувалось ніякої взаємодії між ритуксимабом та кролячим анти-мишачим антитілом, оскільки підвищення CD20 експресії в зразках кролячим антитілом та без нього було подібним.

#### Висновок:

CD20 та CD37 антигени підвищуюче регулювались після того, як клітини обробили <sup>177</sup>Lu-тетраксетан-тетуломабом. Підвищення було приблизно постійним для всіх точок часу, та становило приблизно 130 % для CD20, та воно підвищувались з 30 до 60 % для CD37 між 48 та 72 год. після обробки.

#### Приклад 2

##### Вступ

Для того, щоб оцінити, чи ефект від <sup>177</sup>Lu-тетуломаба був обумовлений специфічним опроміненням клітин, клітини Дауді інкубували з беталутином протягом 1 год.

##### Матеріали та способи

##### Введення мітки в антитіла

Процедура, яку застосовували для введення мітки антитіл та розрахунку IRF, раніше обговорювалась в прикладі 1. Специфічна активність <sup>177</sup>Lu-тетуломаба становила 212 МБк/мг та концентрація Ab становила 0,5 мг/мл. IRF становив 72 +/- 2 %, та його вимірювали в клітинах Рамоса.

#### Обробка клітин

Процедура, за якою слід було обробляти клітини, була аналогічна процедурі, описаній в прикладі 1. Дві різні обробки оцінювали в даному прикладі. Одна обробка включала інкубування клітин протягом 24 годин, аналогічно до тієї, яка була зроблена в прикладі 1. Інша обробка включала інкубування клітин протягом 1 години. Контрольні клітини одержували для кожної з обробок, як описано в прикладі 1. Однакову кількість активності додавали до обох обробок (4,6 МБк, однакова активність, як надано в прикладі 1). Кожен з 2 по 5 день клітини розділяли та додавали свіже середовище, таким чином, що концентрація клітин становила від 0,5 до 1 мільйону клітини/мл після розбавлення.

Вимірювання проточної цитометрії.

Фарбування клітин та вимірювання підвищеної регуляції антигену в оброблених клітинах в порівнянні з контрольними клітинами проводили, застосовуючи таку саму процедуру як описано в прикладі 1. Вимірювання проводили в точках часу від 0 до 14 днів.

Результати

Доза для середовища клітин, які інкубували протягом 1 год., становила приблизно 0,05 Гр, тоді як доза для клітин, які інкубували протягом 24 годин становила приблизно 1,1 Гр. Клітини, які інкубували протягом 1 год. мали 45,5 % підвищення CD20 та 3,8 % підвищення CD37 через 48 год. після опромінення та 48,8 % та 15,1 %, відповідно, через 144 год. після опромінення, показуючи, що специфічне опромінення клітин від радіоімунокон'югату було важливим компонентом ефекту зокрема, для антигену CD20 (фігура 2). Вважається, що підвищена регуляція антигенів знижується від 0 після 14 днів.

Приклад 3

Вступ

Для того, щоб дослідити чи була підвищена регуляція антигенів загальною ознакою лімфоми, замість специфічного ефекту клітинної лінії, клітини Дауді досліджували разом з трьома іншими клітинними лініями лімфоми, Раджи, Рамоса та Rec-1.

Матеріали та способи

Введення мітки в антитіла

Процедура, яку застосовували для введення мітки антитіл та розрахунку IRF, раніше обговорювалась в прикладі 1. Специфічна активність  $^{177}\text{Lu}$ -тетуломабу становила 212 МБк/мг та концентрація Ab становила 0,5 мг/мл. IRF становив  $72 \pm 2\%$ , та його вимірювали в клітинах Рамоса.

Обробка клітин

Процедура, за якою слід було обробляти клітини, була аналогічною процедурі, описаній в прикладі 1. Клітини інкубували протягом 1 години. Контрольні клітини одержували для кожної з ліній клітин, як описано в прикладі 1. Однакову кількість активності додавали до ліній клітин (4,6 МБк, така сама активність, як надана в прикладі 1). Доза для середовища клітин становила приблизно 0,05 Гр. Кожні 2-5 днів клітини розділяли, та додавали свіже середовище, таким чином, що концентрація клітин становила від 0,5 до 1 мільйона клітини/мл після розбавлення.

Вимірювання проточної цитометрії

Фарбування клітин та вимірювання підвищеної регуляції антигену в оброблених клітинах в порівнянні з контрольними клітинами проводили, застосовуючи таку саму процедуру, як описано в прикладі 1. Вимірювання проводили в точках часу від 0 до 7 днів.

Результати

Вважається, що підвищена регуляція антигенів є загальною для клітин неходжкінської лімфоми. Підвищення CD20 спостерігалось в усіх клітинних лініях, тоді як, підвищення експресії CD37 спостерігалось в 3 з 4 клітинних ліній (таблиця 1). В кінцевому опроміненні  $^{177}\text{Lu}$ -тетуломабом, радіоімунокон'югат спричиняє підвищення CD20 та CD37, та вважається, що це є загальною ознакою В-клітинних лімфом.

Приклад 4. Вплив на антигенну експресію від специфічного CD20 з  $^{177}\text{Lu}$ -ритуксимабом.

Вступ

Для того, щоб дослідити, чи був ефект загальною ознакою радіоімунокон'югатів, замість специфічного ефекту беталутину (тобто,  $^{177}\text{Lu}$ -НН-1 або  $^{177}\text{Lu}$ -тетуломаба), клітини Дауді та Раджи обробляли  $^{177}\text{Lu}$ -ритуксимабом.

Матеріали та способи

Введення мітки антитіл

Процедуру, яку застосовували для введення мітки ритуксимаба та розрахунку IRF раніше обговорювали в прикладі 1. специфічна активність  $^{177}\text{Lu}$ -ритуксимаба становила 165 МБк/мг, та концентрація Ab становила 0,2 мг/мл. IRF становив  $60 \pm 2\%$ , та його вимірювали в клітинах Рамоса.

Введення мітки тетуломаба з Alexa 488 здійснювали, застосовуючи відповідний набір для введення мітки протеїну Alexa Fluor (Molecular Probes, Life Technologies) відповідно до процедури, передбаченої виробником.

#### Обробка клітин

Процедура, за якою слід було обробляти клітини, була аналогічною процедурі, яку описано в прикладі 1. Клітини інкубували протягом 1 години або 24 годин. Застосовували клітини лімфоми Дауді та Раджи. Контрольні клітини одержували для кожної з ліній клітин, як описано в прикладі 1. Однакову кількість активності додавали до ліній клітин (4,6 МБк, така сама активність, як надано в прикладі 1). Доза для середовища клітин становила приблизно 0,05 Гр. Кожні 2-5 днів клітини розділяли та додавали свіже середовище, таким чином, що концентрація клітин становила від 0,5 до 1 мільйона клітин/мл після розбавлення.

#### Вимірювання проточної цитометрії

Фарбування клітин та вимірювання підвищеної регуляції антигену в оброблених клітинах в порівнянні з контрольними клітинами проводили, застосовуючи таку саму процедуру, як описано в прикладі 1. Вимірювання проводили в точках часу від 0 до 7 днів. Дано, що  $^{177}\text{Lu}$ -ритуксимаб зв'язується з CD20, та, що таке саме антитіло використовували для вимірювання інтенсивності флуоресценції, знайдені результати дають мінімальне значення для підвищеної регуляції CD20. Підвищену регуляцію CD37 оцінювали, застосовуючи як вторинний (кролячий анти-мишачий), так і прямий Ab (тетуломаб зв'язаний з Alexa488).

#### Результати

Підвищена регуляція CD20 та CD37 спостерігалось також, коли клітини обробляють  $^{177}\text{Lu}$ -ритуксимабом (таблиця 2). Таким чином, підвищена регуляція антигенів не є специфічним ефектом  $^{177}\text{Lu}$ -тетуломабу.

#### Приклад 5.

##### Вступ

Для підтвердження того, що радіоімунотерапія буде підвищувати зв'язування антитіла з клітинами в іншому аналізі, дві клітинні лінії Дауді (неходжкінської лімфоми) та JMV-3 (В-клітинного лейкозу) обробили  $^{177}\text{Lu}$ -НН-1 (анти-CD37) та потім вимірювали зв'язування  $^{125}\text{I}$ -міченого ритуксимабу (анти-CD20).

##### Способи:

$^{125}\text{I}$ -ритуксимаб одержували, застосовуючи йодогенні пробірки (Pierce). Йодогенну пробірку промивали 1 мл тріс-буфером та потім додавали 100 мкл тріс-буфера (pH 7,5), та додавали  $^{125}\text{I}$  йод. Розчин обережно збовтували в пробірці декілька разів протягом періоду 6 хвилин, після того, як деякі або всі з  $^{125}\text{I}$  розчину додавали в віалу, як правило, зі 100 мкл тріс з 50-200 мкг ОІ-3 антитіла.

Застосовуючи випадкове збовтування віали, реакція проходила за 7 хвилин. Після чого додавали 50 мкл І-тирозину (насичений) в тріс, та взаємодіяли щонайменше протягом 5 хвилин перед тим, як розчин чистили, застосовуючи Sephadex G-25 PD-10 (GE Health) гель-фільтраційну колонку.

Приблизно 70 % активності будуть елююватись в фракціях з високою молекулярною масою, та збирали та використовували в експериментах щодо клітинного зв'язування.

Антитіло НН-1 спочатку мітили p-SCN-Bn-DOTA, розчиненим в 0,005M HCl. Молярне співвідношення p-SCN-Bn-DOTA до антитіла становило 6:1. pH реакції регулювали до  $8,5 \pm 0,2$ , застосовуючи карбонатний буфер. Після 45 хвилин інкубування при  $37^\circ\text{C}$  реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 0,2 M розчину гліцину/мг Ab. Для видалення вільного хелатуючого агента кон'юговане антитіло промивали розбавленням кон'югатом антитіла 1:10 з 0,9 % NaCl та підвищували концентрацію центрифугуванням з AMICON-30 центрифужними пробірками (Millipore, Cork, Ireland). Процедuru повторювали 4-5 разів. Перед введенням мітки 220 МБк  $^{177}\text{Lu}$  (Perkin Elmer, Boston, Ma, USA), pH 1 мг кон'югата антитіла регулювали до  $5,3 \pm 0,3$ , застосовуючи 0,25 M амонійно-ацетатний буфер. Реакцію інкубували протягом 15 хвилин при  $37^\circ\text{C}$ .

Радіохімічну чистоту (RCP) радіоімунокон'югата (RIC) оцінювали, застосовуючи миттєву тонкошарову хроматографію (МТШХ). RCP становив 95,5 %. Імунореактивні фракції (IRFs) RIC вимірювали, застосовуючи клітини Рамос ( $^{177}\text{Lu}$ -НН1) або Дауді ( $^{125}\text{I}$ -Ритуксимаб) лімфоми та однокотковий аналіз. Застосовували концентрацію клітин приблизно 50 мільйонів клітин/мл. Дві пробірки не були блоковані, та 2 пробірки були попередньо оброблені 10 мкг НН-1, після чого до них додавали 2 нг  $^{177}\text{Lu}$ -НН1 та струшували протягом 1,5 годин. Після цього пробірки рахували, застосовуючи гамма-лічильник, щоб визначити застосовану активність, промивали та центрифугували три рази, 0,5 мл DPBS/BSA перед тим, як пробірки рахували щодо клітинної зв'язаної активності. Клітинну зв'язану активність корегували щодо неспецифічного зв'язування

віднімання підрахунків від блокованих пробірок. IRF, тобто, специфічно зв'язана в порівнянні з загальною застосованою, становила 78 % ( $^{177}\text{Lu}$ -HH1) та 71 % ( $^{125}\text{I}$ -ритуксимаб). В колби з клітинними культурами (25 см<sup>2</sup>, Corning), які містять 5 мл RPMI 1640, доповненого 10 % FBS та з 1 мільйоном клітин на мл, додавали або 2,5 МБк  $^{177}\text{Lu}$ -Bn-DOTA-HH-1 ( $^{177}\text{Lu}$ -HH-1), Bn-DOTA-HH-1 (DOTA-HH-1, контрольна група 1) або буфер для формуляції, тобто, такий самий розчин, як дві інші обробки, за винятком RIC або кон'югата антитіла (контрольна група 2) в 16,7 мкл (мікролітрах). Через один день відбирали 2 мл, та додавали 3 мл свіжого середовища (розбавлення в 1,7 разів), через три дні додавали 3 мл середовища (розбавлення в 1,5 разів), через п'ять днів відбирали 4 мл, та додавали 3 мл свіжого середовища (розбавлення в 1,8 разів), через вісім днів відбирали 6 мл, та додавали 5 мл свіжого середовища (розбавлення в 2,7 разів), через одинадцять днів відбирали 7 мл, та додавали 4 мл свіжого середовища (розбавлення в 5 разів). Це було зроблено, щоб поповнити середовище для росту та стимулювати зниження концентрації, за яким спостерігали з часом *in vivo* з RIC.

Через 3,5 дні клітинні суспензії відбирали, та вимірювали концентрацію та життєздатність клітин, застосовуючи автоматизований лічильник клітин Countess (Invitrogen), та 0,5 мл додавали до реакційної пробірки, центрифугували та клітину пелету знову суспендували в 200 мкл DPBS (Gibco) з 0,5 % BSA (VWR). В дві пробірки в  $^{177}\text{Lu}$ -HH-1 групі додавали 0,8 мкг, тобто приблизно 1,6 мкг/мл  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба в 10 мкл DPBS/BSA та в дві пробірки додавали тільки DPBS (для корекції підрахунку інтерференції від  $^{177}\text{Lu}$  в  $^{125}\text{I}$  вікні). В дві пробірки в контрольній групі 1 та 2 додавали 0,8 мкг, тобто приблизно 1,6 мкг/мл  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба в 10 мкл DPBS/BSA та 10 мкл DPBS/BSA буфера. Пробірки інкубували протягом 1,5 годин та після цього двічі промивали та центрифугували перед тим, як рахували в  $^{125}\text{I}$  вікні гамма-лічильника Cobra II Autogamma (Packard). Підрахунок в  $^{177}\text{Lu}$ -HH-1 групі корегували для перехідних підрахунків від  $^{177}\text{Lu}$  до в  $^{125}\text{I}$  вікні, застосовуючи вимірювання з двох пробірок, в які не додавали  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаб.

#### Результати

Зв'язану активність клітин регулювали щодо кількості клітин та  $^{177}\text{Lu}$  інтерференції в  $^{125}\text{I}$  вікні, та порівняння між RIC обробленими та необробленими контролями 1 (антитіло кон'югат за винятком  $^{177}\text{Lu}$ ) та 2 (буферний розчин RIC) представлено в таблиці 3. Показано, що клітини, які було оброблено RIC, мали підвищене зв'язування з  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба в усіх точках часу аж до та включаючи 15 днів після початку терапії з  $^{177}\text{Lu}$ -HH1.

#### Висновок

Як показано в таблиці 3 як клітини В-клітинної лімфоми, так і клітини В-клітинного лейкозу, показали підвищене зв'язування  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба після  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 опромінення. Це вказує на те, що радіоімуноterapia може бути корисною, як індукційна терапия у пацієнтів, які перенесли терапію моноклональними антитілами, наприклад, лікування ритуксимабом проти лімфоми та лейкозу.

#### Приклад 6. Оцінка неспецифічного зв'язування.

##### Передумови:

Для того, щоб перевірити, що підвищене зв'язування антиген-специфічного антитіла з клітинами, яке піддається радіоімуноterapiї, не було викликано підвищеним неспецифічним зв'язуванням з клітинами, з якими виконували експеримент, застосовуючи блокування антигену.

##### Експериментальна:

Клітини Дауді, приблизно 1 мільйон на мл в колбах для культивування 25 см<sup>2</sup>, піддавали дії або неміченого HH1 антитіла (контроль 1), буфера для формулювання (контроль) або 0,1 МБк/мл або 0,5 МБк/мл  $^{177}\text{Lu}$ -HH-1 протягом трьох днів. Через один день концентрацію знижували до 50 % додаванням свіжого середовища. На третій день клітинні суспензії відбирали та використовували для аналізу зв'язування, та обробляли як в прикладі 4, з дублюванням пробірок з трьох груп, що одержували  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаб. В додаткових повторях кожної групи обробляли неміченим ритуксимабом (100 мкг/мл) протягом півгодини, щоб блокувати антиген CD20. Для корекції  $^{177}\text{Lu}$  у  $^{125}\text{I}$  вікні повтори з двох радіоактивних груп застосовували без доданого  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба, та обробляли, та промивали за тим самим способом, як досліджувані пробірки з  $^{125}\text{I}$ -ритуксимабом. Після додавання  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба, досліджувані пробірки інкубували протягом двох годин та зчитували щодо викликаної активності. Використовували автоматичний гамма-лічильник Cobra II (Packard Instruments Company Inc, Downers Grove, IL, USA). Після цього, досліджувані пробірки двічі промивали DPBS/0,5 % BSA та двічі центрифугували та зчитували клітинну зв'язану активність. Дані корегували щодо гамма надлишку у вікні  $^{177}\text{Lu}$  I від  $^{177}\text{Lu}$  в оброблених клітинах.

##### Результати:

При порівнянні загального індексу активності на клітину в блокованих проти неблокованих пробірок результати були наступними: 0,1 та 0,5 МБк/мл групи, 0,8 % та 1,1 % неспецифічні зв'язування; контроль 1 та контроль 2, 1,3 % та 1,1 % неспецифічні зв'язування.

Висновок:

Блокування антигену було однаково ефективним на оброблених і не оброблених клітинах. Таким чином, підвищене зв'язування з радіоімунокон'югатом оброблених клітин не було викликане неспецифічним зв'язуванням та, таким чином, повинно бути викликане підвищеною експресією антигену.

Приклад 7: Обробка беталутином ( $^{177}\text{Lu}$ -тетраксетан-тетуломабом, або  $^{177}\text{Lu}$ -НН1) та вплив на антигенну експресію CD20 in-vivo

Даний приклад перевіряє, що ефект підвищеної регуляції антигену від  $^{177}\text{Lu}$ -НН1 також спостерігається in-vivo. Біорозподілення та пухлинне поглинання в голих мишей, що несуть підшкірні Рамос ксенотрансплантати вимірювали через 3 дні після обробки беталутином або з контрольною ін'єкцією холодного НН1.

Спосіб:

Введення мітки тетуломаба з  $^{177}\text{Lu}$

Хелатуючий агент p-SCN-Bn-DOTA (DOTA) розчиняли в 0,005 М HCl, додавали до антитіла в співвідношенні 6:1, та регулювали pH до приблизно 8,5, застосовуючи карбонатний буфер. Після 45 хвилин інкубування при 37 °C реакцію зупиняли додаванням 50 мкл на мг Ab 0,2 М розчину гліцину. Для того, щоб видалити вільну DOTA, кон'юговане антитіло промивали, застосовуючи AMICON-30 центрифужні пробірки (Millipore, Cork, Ireland), 4-5 разів 0,9 % розчином NaCl. Перед введенням мітки з  $^{177}\text{Lu}$  pH регулювали до  $5,3 \pm 0,3$ , застосовуючи 0,25 М амонійно-ацетатний буфер. Приблизно 150 МБк  $^{177}\text{Lu}$  (Perkin Elmer, Boston, Ma, USA) додавали до 0,5 мг DOTA-Ab, та інкубували протягом 20 хвилин при 37 °C. Специфічна активність становила 250 МБк/мг. Радіохімічну чистоту (RCP) кон'югата оцінювали, застосовуючи миттєву тонкошарову хроматографію. Якщо RCP був нижче 95 % кон'югат чистили, застосовуючи Econo-Pac 10 DG колонки (Bio-rad Laboratories, California, USA).

Введення мітки ритуксимаба з  $^{125}\text{I}$

Ритуксимаб мітили  $^{125}\text{I}$  опосередкованим йодуванням, застосовуючи йодогенні попередньо покриті пробірки йодування (Pierce, Rockford, IL) відповідно до опису виробника. Після завершення реакції з L-тирозином, реакційну суміш елюювали, застосовуючи колонку Sephadex G-25 PD-10, щоб видалити низькомолекулярні сполуки. Специфічна активність кінцевого продукту становила 12 МБк/мг.

Імунореактивна фракція  $^{177}\text{Lu}$ -НН1 та  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба

Одиничні клітинні суспензії Рамос клітин лімфоми росли в RPMI 1640 середовищі (PAA, Linz, Austria), доповненому 10 % інактивованому нагріванням FCS (PAA), 1 % L-глутаміну (PAA) та 1 % пеніциліну-стрептоміцину (PAA) в вологій атмосфері з 95 % повітря/5 %  $\text{CO}_2$ . Імунореактивність радіоімунокон'югатів вимірювали, застосовуючи одноточковий, модифікований спосіб Ліндмо. Концентрація клітин, які використовували, становила 75 мільйон клітин/мл. Імунореактивність кон'югатів становила 60 % та 82 %.

Тварини

Використовували інституційно розмножені "голі" самки мишей Foxn1nu, які мали вік приблизно 8-9 тижнів та мали масу тіла приблизно 22 г на початку експерименту. Тварин утримували в умовах вільних від патогенів, та був вільний доступ до їжі та води. Всі процедури та експерименти за участю тварин в даному дослідженні були схвалені National Animal Research Authority та здійснювались відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних, що використовуються в наукових цілях (European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Scientific Purposes). Мишам вводили ін'єкції підшкірно в обидва боки 50 мкл розчину пюре тканини пухлини лімфоми Рамоса, злегка розбавленої приблизно 300 мкл NaCl на кожний мл розчину пюре пухлини.

Експерименти щодо біорозподільного поглинання

Біорозподілення  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба та  $^{177}\text{Lu}$ -НН1 визначали на "голих" мишах Foxn1nu з Рамос ксенотрансплантатами з діаметрами від 5 до 14 мм на початок дослідження. Препарати вводили ін'єкційно у хвостову вену 100 мкл розчину кожній тварині. Дозування приблизно 350 МБк/кг беталутин, еквівалентне дозуванню протеїну 2,3 мг/кг ( $^{177}\text{Lu}$ -НН-1 зберігався до застосування, тому специфічна активність була меншою) вводили 5 мишам (оброблені миші). Контрольна група складалася з 7 мишей, яким ін'єкційно вводили таке саме дозування протеїну, холодний НН1 як оброблені миші (2,3 мг/кг). Через два дні після ін'єкції беталутин або холодного НН1, всім мишам ін'єкційно вводили 3 мг/кг  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба. Через три дні після ін'єкції  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба мишей піддали евтаназії зміщенням шийних хребців та проводили

розтин. Визначали масу кожного зразка тканини, та кількість  $^{177}\text{Lu}$  і  $^{125}\text{I}$  вимірювали, застосовуючи калібрований гамма детектор (Cobra II автоматичний гамма детектор, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA). Зразки введеного розчину застосовували як еталонні в процедурах вимірювання. Розкладені кореговані відсотки ін'єкційної дози на грам тканини (%ID/g) розраховували для кожної точки часу. Активність в органах вимірювали, застосовуючи подвійне вікно, налаштуваннями були,  $^{177}\text{Lu}$  та  $^{125}\text{I}$  активності вимірювали одночасно. Фонові пробірки з або тільки  $^{177}\text{Lu}$ , або тільки  $^{125}\text{I}$  застосовували, щоб оцінити область переходу з вікон. Область переходу з  $^{125}\text{I}$  вікна в  $^{177}\text{Lu}$  вікно становила приблизно 0,006 % та вважалась незначною. З іншого боку, область переходу з  $^{177}\text{Lu}$  вікна в  $^{125}\text{I}$  вікно становила приблизно 10 %, та всі дані було скориговано відповідним чином. Крім того зразки залишилися розкладатись протягом 10 тижнів (приблизно 10  $^{177}\text{Lu}$  періоди напіврозпаду) та знову рахували, щоб підтвердити ефективність поправок.

Результати:

Фігура 6 показує біорозподілення  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба через 3 дні після ін'єкції  $^{125}\text{I}$ -ритуксимаба. Мишам ін'єкційно вводили за 5 днів раніше, або 350 МБк/кг беталутину (оброблені), або холодного НН1 (контрольні). Поглинання в нормальних органах було аналогічним в обох групах ( $p>0,05$ ), тоді як, поглинання в пухлині було приблизно в 3 рази вищим у оброблених мишей ( $p=3,19 \cdot 10^{-10}$ ). Сер. %ID/g в пухлині у контрольних мишей становив  $1,3 \pm 0,2$ , тоді як, він становив  $3,6 \pm 0,7$  у оброблених мишей.

Висновки:

Обробка беталутином підвищувала поглинання пухлиною в 3 рази, тоді як, поглинання зберігалось постійним в нормальних органах в порівнянні з мишами, обробленими холодним НН1. Дані результати разом з даними, показаними в попередніх прикладах вказують на те, що обробка беталутином підвищуючи регулює CD20 антиген *in vivo*, та це призводить до значно підвищеного поглинання пухлиною.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування В-клітинної злоякісності, вибраної з групи, що складається з неходжкінської лімфоми та хронічної лімфоцитарної лейкемії, де експресією CD20 підвищено, і де:

- підвищена експресія йде за терапією антитілами до CD20, що застосовують одним або повторюваним режимом введення, де лікування включає призначення комбінації:

а) радіоімунокон'югата, що включає:

- моноклональне антитіло НН1, спрямоване на CD37,
- хелатний лінкер,
- радіонуклід, який є  $^{177}\text{Lu}$ , і

б) антитіло до CD20, вибраного з групи, що складається з ритуксимабу, вельтузумабу, офатумумабу, афутузумабу, токситумумабу, редитуксу та ібритумумабу.

2. Спосіб лікування за п. 1, в якому радіоактивно мічене моноклональне антитіло вибирають із групи, яка складається з НН1, химерного НН1, гуманізованого НН1, chHH1.1 або chHH1.3.

3. Спосіб лікування за будь-яким з пп. 1-2, в якому лінкер є хелатним лінкером, вибраним із групи, що складається з p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-ефіру, p-SCN-Bn-DTPA та CHX-A"-DTPA.

4. Спосіб лікування за будь-яким з пп. 1-3, в якому радіоімунокон'югат складено як фармацевтичну композицію.

5. Спосіб лікування за п. 4, в якому фармацевтична композиція містить один або більше фармацевтично прийнятних носіїв або ад'ювантів.

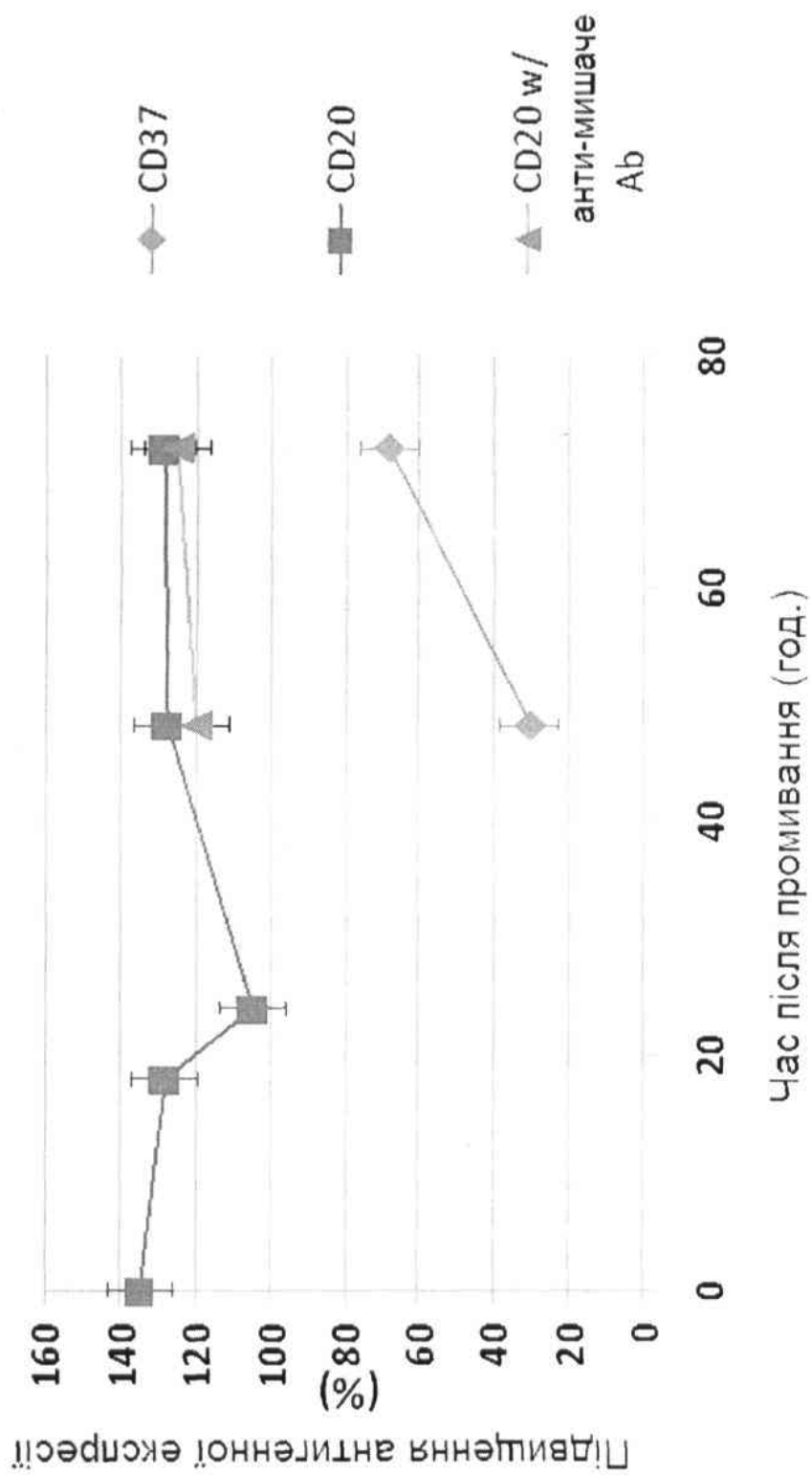
6. Спосіб лікування за будь-яким з пп. 1-5, де призначення здійснюють шляхом внутрішньовенного введення або внутрішньовенної ін'єкції.

7. Спосіб лікування за будь-яким з пп. 1-6, де дозування становить 10-100 МБк/кг маси тіла.

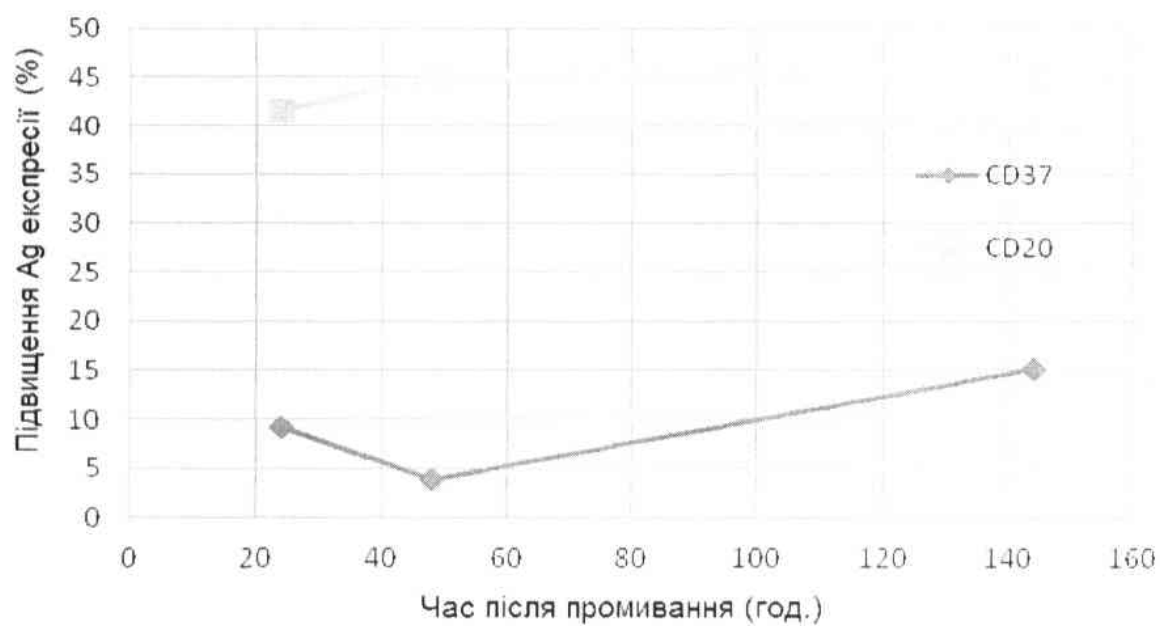
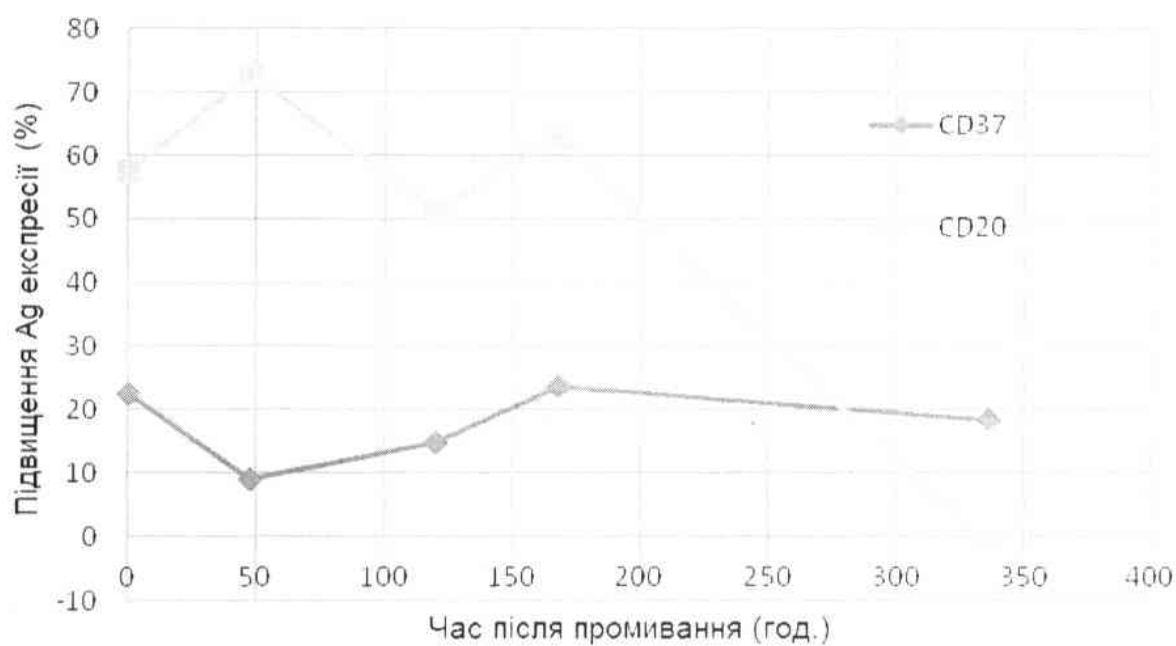
8. Спосіб лікування за будь-яким з пп. 1-7, в якому антитіло проти CD20 призначають принаймні від одного дня до 15 днів після антитіла проти CD37.



% Підвищення середніх значень після 24 год. беталутину



Фіг. 1

**Дауді 1 год. беталутин****Дауді 24 год. беталутин**

Фіг. 2

Таблиця 1

Клітинна лінія	Час після завершення обробки	% підвищення антигенної експресії	
		CD20	CD37
Дауді	48 год	45,1	3,8
	144 год	48,8	15,1
Раджи	48 год	18,6	21,0
Рамос	168 год	15,0	66,0
Рес-1	48 год	16,7	0

Фіг. 3

Таблиця 2

Клітинна лінія	Час інкубування	Час після завершення обробки	% підвищення антигенної експресії CD20      CD37	
Дауді	1 год	144 год	5,9	22,0
	24 год	48 год	51,8	37,1
Раджи	1 год	168 год	63,4	49,3

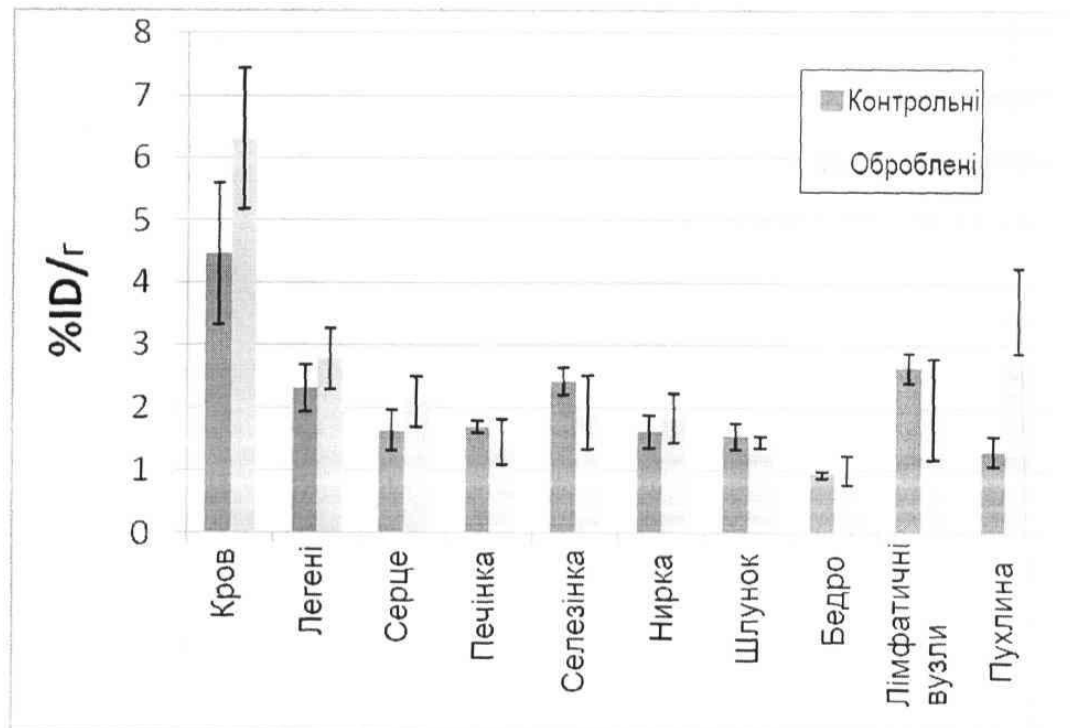
Фіг. 4

Таблиця 3

Клітинна лінія	<sup>177</sup> Lu-НН1 проти DOTA-НН1 (%)				<sup>177</sup> Lu-НН-1 проти буфера для формуляції (%)			
	4 дні	8 днів	11 днів	15 днів	4 дні	8 днів	11 днів	15 днів
Дауді	60	42	3	нв	46	27	7	4
JMV-3	45	79	52	33	48	99	48	9

нв- не визначалось.

Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601