



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0036236

(51)⁷ A61K 51/10; C07K 16/32; A61P 35/00; (13) B
A61K 103/40

-
- (21) 1-2018-03960 (22) 20/03/2017
(86) PCT/EP2017/056503 20/03/2017 (87) WO2017/162555 28/09/2017
(30) 16162123.0 24/03/2016 EP
(45) 25/07/2023 424 (43) 27/05/2019 374A
(73) 1. BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT (DE)
Müllerstr. 178, 13353 Berlin, Germany
2. BAYER AS (NO)
Drammensveien 288, N-0283 Oslo, Norway
(72) LINDEN, Lars (DE); CUTHBERTSON, Alan (GB).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PHỨC HỢP THORI HƯỚNG MÔ, PHỨC HỢP THORI HƯỚNG MÔ ĐƯỢC TẠO THÀNH HOẶC CÓ THỂ TẠO THÀNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY, ĐƯỢC PHẪM CHỨA PHỨC HỢP NÀY VÀ KIT LIÊN QUAN

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra phức hợp thori hướng mô, phương pháp này bao gồm:

a) tạo ra chất tạo chelat octadentat bao gồm bốn gốc hydroxypyridinon (HOPO), được thể ở vị trí N bằng nhóm methyl, và gốc kết hợp tận cùng bằng nhóm axit carboxylic;

b) kết hợp chất tạo chelat octadentat đã nêu với ít nhất một gốc hướng mô hướng đích HER2; và

c) cho chất tạo chelat hướng mô đã nêu tiếp xúc với dung dịch nước chứa một ion của ít nhất một chất đồng vị thori phát ra tia alpha.

Phức hợp thori hướng mô được tạo thành hoặc có thể tạo thành bằng phương pháp này, được phẩm chứa phức hợp này và kit liên quan cũng được đề xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế phức hệ chứa thori-227 với các phối tử octadentat nhất định được liên hợp với gốc hướng mô hướng đích kháng nguyên HER2. Sáng chế cũng đề cập đến phức hệ, và việc điều trị bệnh, đặc biệt là các bệnh khối u tân tạo, bao gồm bước sử dụng phức hệ này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc tiêu diệt tế bào đặc hiệu có thể là thiết yếu để điều trị thành công nhiều loại bệnh ở đối tượng động vật có vú. Ví dụ điển hình của nó là việc trị các bệnh ác tính như sarcoma và carcinoma. Tuy nhiên, sự loại bỏ chọn lọc các loại tế bào nhất định cũng có thể đóng vai trò chủ chốt trong điều trị các bệnh khác, đặc biệt là các bệnh tăng sản và khối u tân tạo.

Phương pháp điều trị chọn lọc phổ biến nhất hiện nay là phẫu thuật, hóa trị liệu và chiếu xạ bên ngoài bằng tia. Tuy nhiên, việc điều trị bằng nuclid phóng xạ hướng đích là một lĩnh vực đầy hứa hẹn và có triển vọng với khả năng phát ra bức xạ cực mạnh gây độc tế bào đặc biệt là đối với các loại tế bào có liên quan đến bệnh. Các dạng dược phẩm xạ trị phổ biến nhất hiện nay được phép sử dụng cho người sử dụng các nuclid phóng xạ phát ra tia beta và/hoặc gama. Tuy nhiên, người ta cũng quan tâm đến việc sử dụng các nuclid phóng xạ phát ra tia alpha trong trị liệu do chúng có khả năng tiêu diệt tế bào đặc hiệu hơn.

Khoảng bức xạ của các chất phát tia alpha điển hình trong môi trường sinh lý thường nhỏ hơn 100 micromet, chỉ tương đương với vài đường kính tế bào. Điều này khiến cho các nguồn này là đặc biệt thích hợp để điều trị khối u, kể cả khối u di căn, do chúng có khoảng cách xa để đến được các tế bào lân cận trong khối u nhưng nếu chúng được hướng đích tốt thì rất ít năng lượng được phát ra sẽ đi qua vượt xa hơn tế bào đích. Vì vậy, không cần phải mọi tế bào phải được hướng đích mà thương tổn đối

với mô khỏe mạnh xung quanh vẫn có thể được giảm thiểu (xem Feinendegen et al., Radiat Res 148:195-201 (1997)). Ngược lại, hạt beta có khoảng bức xạ 1 mm hoặc lớn hơn trong nước (xem Wilbur, kháng thể Immunocon Radiopharm 4: 85-96 (1991)).

Năng lượng của bức xạ hạt alpha cao so với năng lượng được mang bởi hạt beta, các tia gama và tia X, điển hình là 5-8 MeV, hoặc gấp từ 5 đến 10 lần năng lượng của hạt beta và 20 hoặc hơn 20 lần năng lượng của tia gama. Vì vậy, sự giữ lại một lượng lớn năng lượng qua một khoảng cách rất ngắn tạo cho bức xạ α khả năng truyền năng lượng tuyến tính (linear energy transfer LET) cao một cách khác thường, hiệu lực sinh học tương đối (relative biological efficacy - RBE) là cao và tỷ lệ tăng cường oxy (oxygen enhancement ratio - OER) là thấp so với bức xạ gama và beta (xem Hall, "Radiobiology for the radiologist", Fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, USA, 2000). Điều này giải thích tính độc tế bào bất thường của nuclit phóng xạ phát ra tia alpha và đồng thời đặt ra các yêu cầu nghiêm ngặt đối với việc hướng đích sinh học của các chất đồng vị này lên mức độ điều chỉnh và nghiên cứu sự phân bố nuclit phóng xạ phát ra tia alpha mà điều này là cần thiết để tránh các tác dụng phụ không mong muốn.

Cho đến nay, liên quan đến đơn sáng chế về trị liệu miễn dịch phóng xạ, chủ yếu tập trung vào ^{211}At , ^{213}Bi và ^{225}Ac và ba nuclit này được khảo sát trong các thử nghiệm trị liệu miễn dịch trong lâm sàng.

Vài nuclit phóng xạ đã được đề xuất là tồn tại trong thời gian ngắn, nghĩa là có thời gian bán rã ngắn hơn 12 giờ. Thời gian bán rã ngắn như vậy khiến cho việc sản xuất và tiêu thụ dược phẩm xạ trị dựa trên các nuclit phóng xạ này theo cách thương mại là khó khăn. Việc sử dụng một nuclit tồn tại trong một thời gian ngắn cũng làm gia tăng tỷ lệ của liều lượng phóng xạ mà nó sẽ được phát ra trong cơ thể trước khi đạt đến vị trí đích.

Năng lượng giạt lùi từ sự phát tia alpha trong nhiều trường hợp sẽ gây ra sự giải phóng các nuclit con từ vị trí phân rã của nuclit mẹ. Năng lượng giạt lùi này là đủ để phá vỡ nhiều nuclit con từ môi trường hóa học mà nó có thể chứa nuclit mẹ, chẳng hạn ở nơi mà nuclit mẹ được tạo phức bởi phối tử như chất tạo chelat. Điều này sẽ xảy ra ngay cả ở nơi mà nuclit con tương thích về mặt hóa học với, nghĩa là có khả năng

tạo phức bởi, cùng phối tử. Tương tự, ở nơi mà nuclit con là khí, đặc biệt là khí trơ như radon, hoặc không tương thích về mặt hóa học với phối tử, hiệu lực giải phóng này thậm chí sẽ lớn hơn. Khi nuclit con có thời gian bán rã lớn hơn vài giây, chúng có thể khuếch tán ngay lập tức vào hệ thống máu, không bị kiểm soát bởi tác nhân tạo phức mà nó chứa nuclit mẹ. Sau đó, các nuclit con có hoạt tính phóng xạ tự do này có thể gây ra tính độc toàn thân không mong muốn.

Việc sử dụng thori-227 ($T_{1/2} = 18,7$ ngày) trong điều kiện mà ở đó duy trì sự kiểm soát của chất đồng vị con ^{223}Ra đã được đề xuất vài năm trước đây (xem WO 01/60417 và WO 02/05859). Điều này xảy ra trong trường hợp một hệ mang được sử dụng cho phép nuclit con được giữ lại bởi một môi trường khép kín. Trong một trường hợp, nuclit phóng xạ được bố trí trong liposom và kích cỡ lớn của liposom (so với khoảng cách giặt lùi) giúp cho các nuclit con được giữ lại trong liposom này. Trong trường hợp thứ hai, phức hệ nhằm vào xương của nuclit phóng xạ được sử dụng mà nó kết hợp vào chất nền xương và vì vậy hạn chế sự giải phóng nuclit con. Đây là các phương pháp tiềm năng cực kỳ có lợi, nhưng việc sử dụng liposom trong một số trường hợp không được mong muốn và có nhiều bệnh về mô mềm trong đó nuclit phóng xạ không thể được bao quanh bởi chất nền đã được khoáng hóa để giữ lại các chất đồng vị con.

Gần đây, đã xác minh được rằng cơ thể động vật có vú có thể chịu được tính độc của nuclit con ^{223}Ra được giải phóng nhờ sự phân rã của ^{227}Th ở mức độ lớn hơn nhiều so với mức độ được dự báo từ các thử nghiệm trước đây đối với các nuclit tương đương. Khi không có mặt các biện pháp đặc hiệu để giữ lại các đồng vị radi con của thori-227 như đã nêu trên, thông tin sẵn có công khai liên quan đến tính độc của radi khiến cho không thể sử dụng thori-227 làm tác nhân trị liệu do liều lượng cần thiết để đạt được tác dụng trị liệu từ sự phân rã thori-227 sẽ tạo ra tính độc ở mức cao và liều lượng có thể gây chết người của bức xạ từ quá trình phân rã các đồng vị con radi, nghĩa là không có cửa sổ trị liệu.

WO 04/091668 mô tả phát hiện không mong muốn rằng cửa sổ điều trị trị liệu tồn tại trong đó lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của nuclit phóng xạ thori-227 hướng đích có thể được dùng cho đối tượng (điển hình là động vật có vú) mà không

tạo ra một lượng radi-223 đủ để gây ra tính độc ở tủy không thể chấp nhận được. Vì vậy, điều này có thể được sử dụng để điều trị và phòng ngừa tất cả các loại bệnh ở cả vị trí mô mềm và xương.

Dựa trên những tiến bộ trên đây, hiện nay có thể sử dụng các nuclit thori-227 phát ra tia alpha trong liệu pháp phóng xạ endonuclit mà không kèm theo tính độc ở tủy gây chết người do ^{223}Ra được tạo ra. Tuy nhiên, cửa sổ trị liệu này vẫn còn tương đối hẹp và trong nhiều trường hợp mong muốn cũng không sử dụng các đồng vị phóng xạ phát tia alpha cho đối tượng nhiều hơn mức hoàn toàn cần thiết. Vì vậy, việc khai thác hữu hiệu cửa sổ trị liệu mới này sẽ được tăng cường rõ rệt nếu nuclit thori-227 phát ra tia alpha có thể được tạo phức và hướng đích với độ tin cậy cao.

Do nuclit phóng xạ phân rã một cách liên tục, thời gian dùng để chuyên chở và đóng gói vật liệu từ lúc phân lập đến lúc sử dụng cho đối tượng là cực kỳ quan trọng. Cũng có giá trị đáng kể nếu nuclit thori phát ra tia alpha có thể được tạo phức, hướng đích và/hoặc sử dụng ở dạng mà được bào chế một cách nhanh chóng và thuận tiện, tốt hơn là chỉ đòi hỏi vài bước, khoảng thời gian ủ ngắn và/hoặc nhiệt độ không tác động đến đặc tính của thực thể đích theo cách không thuận nghịch. Ngoài ra, các quy trình có thể được tiến hành trong dung môi mà không cần loại bỏ trước khi sử dụng (về cơ bản là trong dung dịch nước) có lợi đáng kể ở chỗ tránh bước bay hơi dung môi hoặc bước thẩm tách.

Cũng có giá trị đáng kể nếu chế phẩm thuốc được đánh dấu thori có thể được phát triển mà chế phẩm này thể hiện độ ổn định gia tăng đáng kể. Điều này là quan trọng để đảm bảo rằng tiêu chuẩn chất lượng của sản phẩm thô được tuân thủ trong khi đồng thời cho phép tạo ra con đường hậu cần để phân phối các liều dùng đến bệnh nhân. Vì vậy, các chế phẩm với sự phân ly do phóng xạ tối thiểu trong khoảng thời gian từ 1-4 ngày là được ưu tiên.

Trước đây, đã nhận thấy rằng chất tạo chelat octadentat bao gồm các nhóm hydroxypyridinon thích hợp để kết hợp thori-227 phát tia alpha, để sau đó gắn với phân tử đích (WO2011098611). Chất tạo chelat octadentat đã được mô tả, bao gồm bốn nhóm 3,2- hydroxypyridinon được gắn với khung trên cơ sở amin bởi các nhóm liên kết, có một nhóm phản ứng riêng rẽ được sử dụng để liên hợp với phân tử hướng

đích. Cấu trúc được ưu tiên của sáng chế trước đây chứa các nhóm 3,2-hydroxypyridinon và sử dụng gốc isothioxyanat làm gốc kết hợp ưu tiên đối với hợp phần kháng thể như được chỉ ra trong hợp chất ALG-DD-NCS. Isothioxyanat được sử dụng rộng rãi để gắn một nhãn vào các protein thông qua các nhóm amin. Nhóm isothioxyanat này phản ứng với đầu tận cùng amino và các amin bậc nhất trong protein và được sử dụng để gắn nhãn nhiều protein bao gồm cả các kháng thể. Mặc dù liên kết thioure được tạo thành trong các thể liên hợp này là khá ổn định, đã báo cáo rằng thể liên hợp kháng thể được điều chế từ isothioxyanat phát huỳnh quang suy thoái theo thời gian. [Banks PR, Paquette DM., *Bioconjug Chem* (1995) 6:447-458]. Thioure được tạo thành bởi phản ứng của isothioxyanat phát huỳnh quang với các amin cũng dễ bị chuyển hóa thành guanidin trong điều kiện bazơ [Dubey I, Pratviel G, Meunier BJ *Journal: Bioconjug Chem* (1998) 9:627-632]. Do sự chu kỳ bán rã dài của thori-227 (18,7 ngày) kết hợp với thời gian bán rã sinh học dài của kháng thể đơn dòng, mong muốn sử dụng các gốc liên kết mạnh hơn để tạo ra thể liên hợp bền hơn về mặt hóa học cả *in vivo* và để bảo quản.

Sản phẩm đã biết có liên quan mật thiết nhất đến sự liên hợp của các phối tử hydroxypyridinon được công bố trong WO2013/167754 và bộc lộ phối tử có gốc hòa tan trong nước chứa nhóm chức hydroxyalkyl. Do khả năng phản ứng của các nhóm hydroxyl, sự hoạt hóa nhóm chelat này như este đã hoạt hóa là không thể do nhiều phản ứng cạnh tranh theo sau tạo ra hỗn hợp phức tạp gồm các sản phẩm thông qua các phản ứng este hóa. Vì vậy, các phối tử trong WO2013/167754 cần phải được kết hợp với protein hướng mô nhờ các gốc hóa học thay thế như isothioxyanat tạo ra thể liên hợp thioure kém bền như đã mô tả trên đây. Ngoài ra, WO2013167755 và WO2013167756 bộc lộ thể liên hợp hydroxyalkyl/ isothioxyanat được dùng cho các kháng thể hướng đích CD33 và CD22 tương ứng.

Họ HER của các tyrosin kinaza thụ thể là các chất trung gian quan trọng đối với sự sinh trưởng, biệt hóa và sống sót của tế bào. Họ thụ thể này bao gồm bốn thành phần khác nhau bao gồm thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGFR, ErbB1, hoặc HER1), HER2 (ErbB2 hoặc p185^{neu}), HER3 (ErbB3) và HER4 (ErbB4 hoặc tyro2).

Sự biểu hiện quá mức của HER2 (thường xuyên nhưng không đều do sự khuếch đại gen) đã được quan sát ở các caxinom bao gồm caxinom dạ dày, nội mạc tử cung, tuyến nước bọt, Jung, thận, ruột kết, tuyến giáp, tụy và bàng quang.

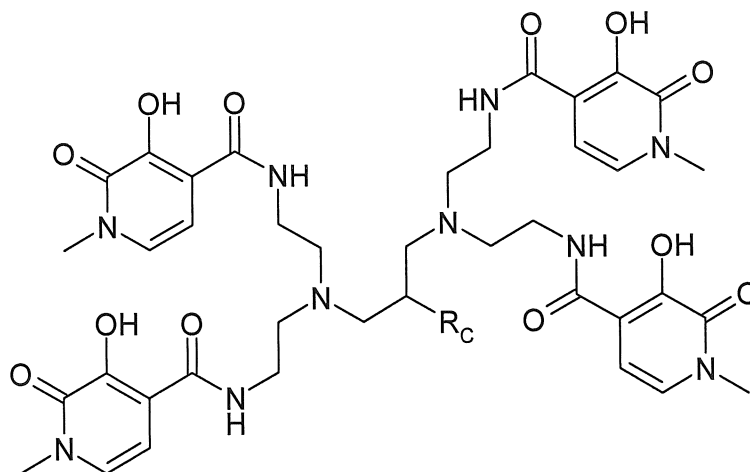
HER2 là đích của kháng thể đơn dòng trastuzumab. Trastuzumab nhận được sự phê chuẩn tiếp thị từ Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm ngày 25 tháng 9 năm 1998 để điều trị cho các bệnh nhân bị ung thư vú di căn, những người mà khối u của họ biểu hiện quá mức protein HER2. Phương pháp điều chế trastuzumab được bộc lộ trong WO92/22653.

Tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách tạo ra phức hợp hướng mô bằng cách kết hợp chất tạo chelat đặc hiệu với kháng thể đơn dòng kháng HER2 dùng làm gốc hướng đích, sau đó bổ sung ion thori phát ra tia alpha, phức hợp nhanh chóng được tạo ra, trong điều kiện êm dịu và nhờ gốc liên kết mà vẫn ổn định trong quá trình bảo quản và sử dụng phức hợp này.

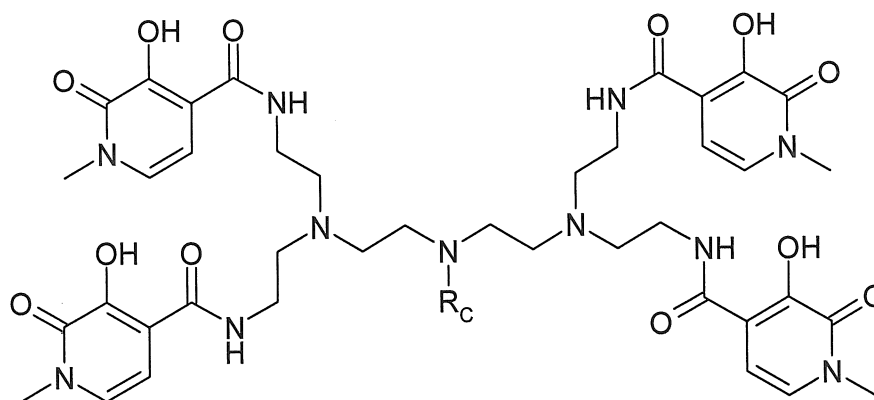
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra phức hợp thori hướng mô, phương pháp này bao gồm:

- a) tạo ra chất tạo chelat octadentat có công thức (I) hoặc (II):

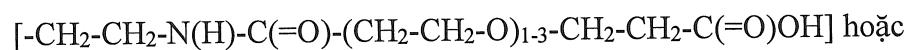
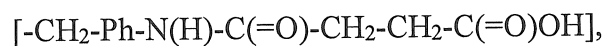


(I)



(II)

trong đó R_c là gốc liên kết có tận cùng là gốc axit carboxylic, như



$[-(CH_2)_{1-3}-Ph-N(H)-C(=O)-(CH_2)_{1-5}-C(=O)OH]$, trong đó Ph là nhóm phenylen, tốt hơn là nhóm para-phenylen;

- b) kết hợp chất tạo chelat octadentat đã nêu với gốc hướng mô bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1:

Chuỗi nhẹ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLL
IYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO. 1)

và một chuỗi peptit có trình tự tương tự hoặc giống hệt với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ 2 đến 6 sau đây:

Chuỗi nặng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 4)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREENYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 6)

nhờ đó tạo ra chất tạo chelat hướng mô; và

c) cho chất tạo chelat hướng mô đã nêu tiếp xúc với dung dịch nước chứa ion 4^+ của chất đồng vị thori phát ra tia alpha ^{227}Th .

Trong phức hệ này (và tốt hơn là trong tất cả các khía cạnh của sáng chế này) ion thori sẽ thường được tạo phức bởi phối tử chứa octadentat hydroxypyridinon, mà phối tử này sẽ gắn vào gốc hướng mô nhờ liên kết amit.

Diễn hình, phương pháp này sẽ là phương pháp tổng hợp octadentat chelat trên cơ sở 3,2-hydroxypyridinon bao gồm nhóm chức carboxylat dễ phản ứng mà có thể được hoạt hóa ở dạng este có hoạt tính (như *N*-hydroxysuccinimide este (NHS este)) nhờ phản ứng hoạt hóa *in situ* hoặc bằng cách tổng hợp và phân lập este mà bản thân nó có hoạt tính.

Este NHS thu được có thể được sử dụng trong bước tiếp hợp đơn giản để tạo ra phạm vi rộng lớn các dạng protein được cải biến chelat. Ngoài ra, các thể liên hợp kháng thể cực kỳ bền dễ dàng được đánh dấu bằng thori-227. Điều này có thể được thực hiện ở nhiệt độ môi trường hoặc gần với nhiệt độ môi trường, thường là với độ tinh khiết và hiệu suất hóa học phóng xạ cao.

Phương pháp theo sáng chế sẽ được thực hiện tốt hơn là trong dung dịch nước và theo một phương án có thể được thực hiện với sự không có mặt hoặc hầu như không có mặt (nhỏ hơn 1% thể tích) dung môi hữu cơ bất kỳ.

Phức hệ hướng mô theo sáng chế có thể được bào chế thành thuốc thích hợp để dùng cho đối tượng là người hoặc động vật không phải người.

Vì vậy, theo khía cạnh thứ hai sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra dược phẩm bao gồm bước tạo ra phức hợp hướng mô như đã mô tả trong bản mô tả này sau đó bổ sung ít nhất một chất mang và/hoặc tá dược được dùng. Chất mang và tá dược thích hợp bao gồm chất đệm, chất tạo chelat, chất ổn định và các hợp phần thích hợp khác đã biết trong lĩnh vực và được mô tả trong khía cạnh bất kỳ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phức hợp thori hướng mô. Phức hợp như vậy sẽ có các đặc điểm được mô tả trong toàn bộ bản mô tả này, đặc biệt là các đặc điểm ưu tiên được mô tả trong bản mô tả này. Phức hợp này có thể được tạo thành hoặc có thể tạo thành được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây. Các phương pháp như vậy có thể tạo ra theo cách đó ít nhất một phức hợp thori hướng mô như được mô tả trong khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm chứa phức hệ bất kỳ trong số các phức hệ được mô tả ở đây. Được phẩm này có thể được bào chế hoặc có thể bào chế được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây và có thể chứa ít nhất một chất đệm, chất ổn định và/hoặc tá dược. Việc lựa chọn chất đệm và chất ổn định sao cho chúng có thể cùng với nhau giúp bảo vệ phức hợp hướng mô khỏi sự phân ly do phóng xạ. Theo một phương án, sự phân ly do phóng xạ của phức hợp trong chế phẩm là tối thiểu thậm chí sau vài ngày sau khi sản xuất chế phẩm. Đây là một lợi thế quan trọng do nó giải quyết các vấn đề tiềm năng có liên quan đến chất lượng sản phẩm và dịch vụ hậu cần cung ứng thuốc mà đây là những yếu tố then chốt để cho phép và ứng dụng thực tế công nghệ này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, "hướng mô" được sử dụng ở đây để chỉ ra rằng bản thân chất được đề cập (đặc biệt là khi ở dạng phức hợp hướng mô như được mô tả ở đây), đóng vai trò định vị (và cụ thể là định vị phức hợp thori được liên hợp bất kỳ) tốt hơn là ở ít nhất một vị trí mô mà ở đó sự có mặt của nó (chẳng hạn để tạo ra sự phân rã phóng xạ) được mong muốn. Vì vậy, nhóm hoặc gốc hướng mô đóng vai trò tạo ra sự định vị tốt hơn ở ít nhất một vị trí mong muốn trong cơ thể của đối tượng sau khi dùng cho đối tượng đó so với nồng độ của phức hợp tương đương không chứa gốc hướng đích này.

Gốc hướng đích trong trường hợp này có tính đặc hiệu đối với HER2.

Các khía cạnh khác của sáng chế như được mô tả ở đây liên quan đến việc điều trị bệnh, cụ thể là để hướng đích có chọn lọc đến mô bệnh, cũng như liên quan đến

phức hệ, thể liên hợp, thuốc, chế phẩm, kit v.v. có thể sử dụng trong các phương pháp này. Theo tất cả các khía cạnh, mô bị bệnh có thể hiện diện ở một vị trí duy nhất trong cơ thể (chẳng hạn trong trường hợp khối u rắn cục bộ) hoặc có thể hiện diện ở nhiều vị trí (chẳng hạn ở nơi mà một số khớp bị tấn công trong chứng viêm khớp hoặc trong trường hợp bệnh ung thư di căn hoặc lan rộng).

Mô bị bệnh được hướng đích có thể ở vị trí mô mềm, ở vị trí mô đã bị vôi hóa hoặc ở nhiều vị trí mà có thể đều thuộc mô mềm, đều thuộc mô đã bị vôi hóa hoặc có thể chứa ít nhất một vị trí mô mềm và/hoặc ít nhất một vị trí mô đã bị vôi hóa. Theo một phương án, ít nhất một vị trí mô mềm được hướng đích. Các vị trí hướng đích và các vị trí là căn nguyên của bệnh có thể giống nhau, nhưng theo cách khác có thể khác nhau (như ở nơi mà các vị trí di căn được hướng đích đặc hiệu). Trong trường hợp có nhiều hơn một vị trí có liên quan, có thể bao gồm vị trí căn nguyên của bệnh hoặc có thể là nhiều vị trí thứ phát.

Thuật ngữ "mô mềm" được dùng trong sáng chế này để chỉ các mô mà không có chất nền "rắn" đã được khoáng hóa. Cụ thể, các mô mềm như được sử dụng ở đây có thể là mô bất kỳ mà không phải là mô xương. Do đó, "bệnh mô mềm" như được sử dụng trong sáng chế này dùng để chỉ bệnh xảy ra ở "mô mềm" như được sử dụng trong sáng chế này. Sáng chế đặc biệt thích hợp để điều trị các bệnh ung thư và "bệnh mô mềm", vì vậy bao hàm caxinom, sacom, u tủy, bệnh bạch cầu, u bạch huyết và các bệnh ung thư loại hỗn hợp xảy ra ở mô "mềm" bất kỳ (nghĩa là mô chưa bị khoáng hóa), cũng như là các bệnh không phải ung thư khác của mô này. "Bệnh mô mềm" ác tính bao gồm các khối u rắn xuất hiện trong mô mềm cũng như trong các khối u di căn và di căn vi thể. Thực vậy, bệnh mô mềm có thể bao gồm khối u rắn nguyên phát của mô mềm và ít nhất một khối u di căn của mô mềm trong cùng một bệnh nhân. Theo cách khác, "bệnh mô mềm" có thể chỉ bao gồm khối u nguyên phát hoặc chỉ bao gồm khối u di căn với khối u nguyên phát là bệnh thuộc xương.

Ví dụ về các khối u tân tạo thích hợp để điều trị bằng cách sử dụng tác nhân hướng đích thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì người-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 - HER2) theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ

dày, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom phổi không phải tế bào nhỏ (non-small-cell lung carcinomas - NSCLC), và bệnh ung thư tử cung.

Một đóng góp quan trọng vào thành công của sáng chế là thể liên hợp kháng thể này ổn định trong khoảng thời gian bảo quản chấp nhận được. Vì vậy, độ ổn định của cả thể liên hợp kháng thể không phóng xạ và sản phẩm thuốc cuối cùng đã gắn nhãn thori cần phải đáp ứng tiêu chí nghiêm ngặt được yêu cầu đối với sản xuất và phân phối sản phẩm dược phẩm xạ trị. Bất ngờ đã phát hiện ra rằng chế phẩm bao gồm phức hợp hướng mô được mô tả ở đây thể hiện độ ổn định vượt trội trong quá trình bảo quản. Độ ổn định này được tạo ra ngay cả ở nhiệt độ cao thường được sử dụng cho những nghiên cứu nhằm gia tăng độ ổn định.

Theo một phương án có thể áp dụng cho tất cả các khía cạnh thích hợp của sáng chế, phức hợp hướng mô có thể được hòa tan trong chất đệm thích hợp. Cụ thể là, đã phát hiện ra rằng việc sử dụng chất đệm xitrat tạo ra chế phẩm ổn định một cách đáng ngạc nhiên. Tốt hơn là, chất đệm xitrat này là chất đệm xitrat nằm trong khoảng 1-100 mM (pH 4-7), đặc biệt là nằm trong khoảng từ 10 đến 50 mM, tốt nhất là 20-40 mM.

Theo một phương án khác có thể áp dụng cho tất cả các khía cạnh thích hợp của sáng chế, phức hợp hướng mô có thể được hòa tan trong chất đệm thích hợp chứa axit p-aminobutyric (PABA). Tổ hợp được ưu tiên là chất đệm xitrat (tốt hơn là ở các nồng độ được mô tả ở đây) kết hợp với PABA. Nồng độ PABA được ưu tiên để dùng trong khía cạnh bất kỳ theo sáng chế, bao gồm tổ hợp với các chất khác nằm trong khoảng 0,005 đến 5 mg/ml, tốt hơn là 0,01 đến 1 mg/ml và tốt hơn nữa là 0,01 đến 1mg/ml. Nồng độ từ 0,1 đến 0,5 mg/ml được ưu tiên nhất.

Theo một phương án khác có thể áp dụng cho tất cả các khía cạnh thích hợp của sáng chế, phức hợp hướng mô có thể được hòa tan trong chất đệm thích hợp chứa axit etylendiamintetraaxetic (EDTA). Tổ hợp được ưu tiên là tổ hợp sử dụng EDTA với chất đệm xitrat. Tổ hợp được đặc biệt ưu tiên là tổ hợp sử dụng EDTA với chất đệm xitrat với sự có mặt của PABA. Tốt hơn là trong các tổ hợp này, xitrat, PABA và EDTA nếu thích hợp sẽ có mặt trong khoảng nồng độ và khoảng nồng độ được ưu tiên được chỉ ra trong sáng chế này. Nồng độ EDTA được ưu tiên để dùng trong khía cạnh

bất kỳ theo sáng chế, bao gồm kết hợp với các chất khác nằm trong khoảng từ 0,02 đến 200 mM, tốt hơn là 0,2 đến 20 mM và tốt nhất là từ 0,05 đến 8 mM.

Theo một phương án khác có thể áp dụng cho tất cả các khía cạnh thích hợp của sáng chế, phức hợp hướng mô có thể được hòa tan trong chất đệm thích hợp chứa ít nhất một polysorbat (este của axit béo với sorbitan được ghép PEG). Polysorbat được ưu tiên bao gồm Polysorbate 80 (Polyoxyetylen (20) sorbitan monooleat), Polysorbate 60 (Polyoxyetylen (20) sorbitan monostearat), Polysorbate 40 (Polyoxyetylen (20) sorbitan monopalmitat), Polysorbate 80 (Polyoxyetylen (20) sorbitan monolaurat) và hỗn hợp của chúng. Polysorbate 80 (P80) là polysorbat được ưu tiên nhất. Nồng độ polysorbat được ưu tiên (đặc biệt là đối với các polysorbat được ưu tiên như đã chỉ ra trong sáng chế này) để dùng trong khía cạnh bất kỳ theo sáng chế, bao gồm kết hợp với các chất khác, nằm trong khoảng từ 0,001 đến 10% w/v, tốt hơn là 0,01 đến 1% w/v và tốt nhất là 0,02 đến 0,5 w/v.

Mặc dù PABA đã được mô tả trước đây là chất ổn định phóng xạ (xem US4880615 A), quan sát thấy ảnh hưởng tích cực của PABA trong sáng chế ở thể liên hợp không phóng xạ trong quá trình bảo quản. Tác dụng làm ổn định này khi không có sự phân ly do phóng xạ tạo ra lợi ích đặc biệt bất ngờ do sự tổng hợp chất tạo chelat hướng mô sẽ thường xảy ra một cách đáng kể trước khi tiếp xúc với ion thori. Vì vậy, chất tạo chelat hướng mô có thể được tạo ra trong khoảng thời gian từ 1 giờ đến 3 năm trước khi tiếp xúc với ion thori và sẽ tốt hơn là được bảo quản bằng cách tiếp xúc với PABA trong ít nhất một phần của khoảng thời gian này. Điều đó có nghĩa là, các bước a) và b) theo sáng chế có thể xảy ra từ 1 giờ đến 3 năm trước bước c) và giữa các bước b) và c), chất tạo chelat hướng mô có thể được bảo quản bằng cách tiếp xúc với PABA, đặc biệt là trong chất đệm, như chất đệm xitrat và tùy ý với EDTA và/hoặc polysorbat. Tất cả các nguyên liệu tốt hơn là thuộc loại và có nồng độ như được chỉ ra trong sáng chế này. Vì vậy, PABA là hợp phần được đặc biệt ưu tiên của chế phẩm theo sáng chế và có thể tạo ra độ ổn định trong thời gian dài cho chất tạo chelat hướng mô và/hoặc phức hợp thori hướng mô.

Việc sử dụng chất đệm xitrat như được mô tả ở đây tạo ra lợi ích bất ngờ khác đối với độ ổn định của phức hợp thori hướng mô trong chế phẩm theo sáng chế. Nghiên

cứu bức xạ về ảnh hưởng của dung dịch đệm đến sự tạo thành hydro peroxit được thực hiện bởi các tác giả sáng chế với các kết quả bất ngờ. Hydro peroxit được biết là tạo thành nhờ sự phân ly nước do phóng xạ và góp phần vào sự cải biến hóa học của thể liên hợp protein trong dung dịch. Vì vậy, sự tạo thành hydro peroxit có tác dụng không mong muốn đến độ tinh khiết và độ ổn định của sản phẩm. Fig. 2 thể hiện nhận xét đáng ngạc nhiên rằng đo được các mức hydro peroxit trong dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể HOPO theo sáng chế đã được chiếu xạ với Co-60 (10 kGy) trong chất đệm xitrat thấp hơn so với tất cả các chất đệm thử nghiệm khác. Vì vậy, tốt hơn là chế phẩm theo sáng chế sẽ chứa chất đệm xitrat như được mô tả ở đây.

Tác giả sáng chế đã xác minh được phát hiện đáng ngạc nhiên nữa có liên quan đến tác dụng phối hợp của các hợp phần nhất định trong chế phẩm theo sáng chế. Điều này cũng có liên quan đến độ ổn định của thể liên hợp đánh dấu phóng xạ. Đã nhận thấy là xitrat là chất đệm hữu hiệu nhất, bất ngờ đã phát hiện ra rằng tác dụng này còn được gia tăng hơn nữa bằng cách bổ sung PABA.

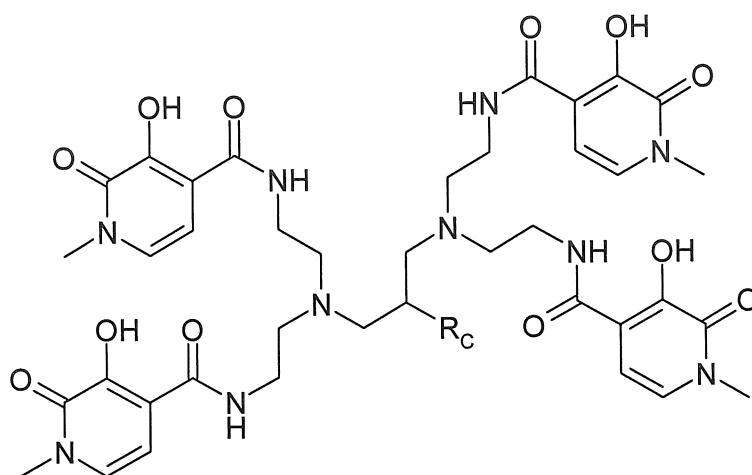
Hợp phần chủ chốt của phương pháp, phức hệ và chế phẩm theo sáng chế là gốc tạo chelat octadentat. Công trình có liên quan mật thiết nhất trước đây về sự tạo phức của các ion thori với phối tử hydroxypyridinon được công bố là WO2011/098611 và bộc lộ sự tạo ra một cách tương đối dễ dàng các ion thori được tạo phức hợp với phối tử octadentat chứa HOPO.

Các chất tạo chelat đã biết trước đây đối với thori cũng bao gồm các chất tạo chelat polyaminopolyaxit bao gồm bộ khung polyazaalkan mạch thẳng, mạch vòng hoặc mạch nhánh với các nhóm axit (chẳng hạn carboxyalkyl) được gắn ở các nguyên tử nitơ trên bộ khung. Ví dụ về chất tạo chelat bao gồm các dẫn xuất DOTA như axit p-isothioxyanatobenzyl-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic (p-SCN-Bz-DOTA) và dẫn xuất DTPA như axit p-isothioxyanatobenzyl-dietylentriaminpentaaxetic (p-SCN-Bz-DTPA), chất đầu tiên là chất tạo chelat mạch vòng, chất thứ hai là chất tạo chelat mạch thẳng.

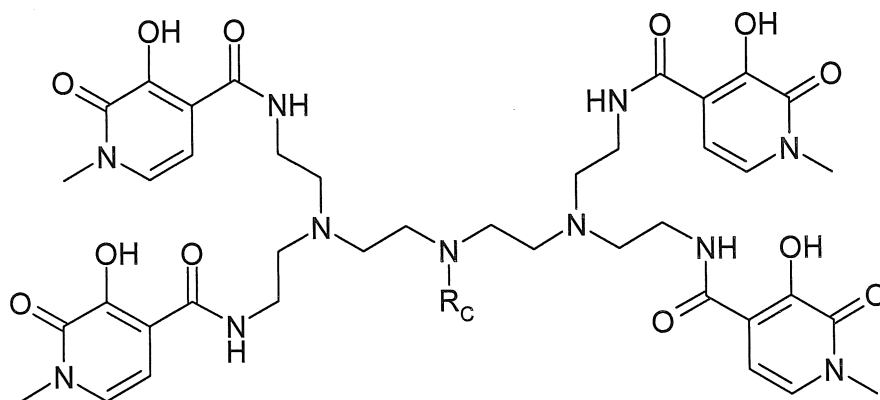
Dẫn xuất của axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic đã được nêu làm ví dụ trước đây, nhưng các phương pháp tiêu chuẩn không dễ dàng được sử dụng để tạo chelat thori với các dẫn xuất DOTA. Việc gia nhiệt dẫn xuất DOTA với

kim loại tạo chelat một cách hiệu quả, nhưng thường với hiệu suất thấp. Có xu hướng ít nhất một phần phối tử biến tính theo cách không thuận nghịch trong toàn bộ quá trình. Ngoài ra, do tính nhạy cảm tương đối cao của nó đối với sự biến tính không thuận nghịch, thường cần tránh sự tiếp xúc của gốc đích cho đến khi tất cả các bước gia nhiệt hoàn tất. Điều này bổ sung một bước hóa học phụ (với tất cả các bước xử lý và tách cần thiết) mà bước này phải được tiến hành trong khoảng thời gian phân rã của đồng vị thori phát ra tia alpha. Hiển nhiên, tốt hơn là không xử lý vật liệu phát tia alpha theo cách này hoặc tạo ra chất thải tương ứng ở mức độ lớn hơn cần thiết. Ngoài ra, toàn bộ thời gian dùng để chuẩn bị thể liên hợp này sẽ làm tổn một tỷ lệ thori mà sẽ phân rã trong giai đoạn chuẩn bị này.

Trong tất cả các khía cạnh, một khía cạnh chính của sáng chế là việc sử dụng chất tạo chelat octadentat có công thức (I) hoặc (II):

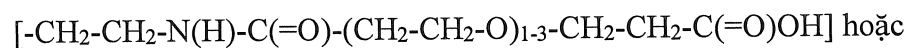
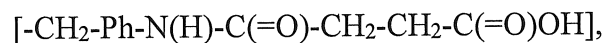


(I)



(II)

trong đó R_c là gốc liên kết có tận cùng là gốc axit carboxylic, như



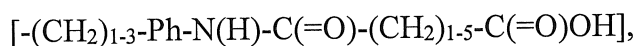
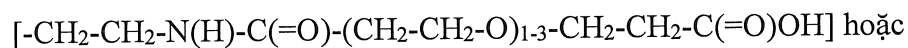
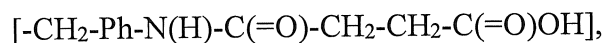
$[-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{Ph}-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{1-5}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}]$, trong đó Ph là nhóm phenylen, tốt hơn là nhóm para-phenylen.

Theo một số tài liệu trước đây, như WO2013/167756, WO2013/167755 và WO2013/167754, nhóm methyl gắn với nguyên tử N của gốc 3,2-HOPO chủ yếu là nhóm hòa tan như hydroxy hoặc hydroxyalkyl (chẳng hạn -CH₂OH, -CH₂-CH₂OH, -CH₂-CH₂-CH₂OH v.v.). Điều này có một số lợi ích ở chỗ độ hòa tan cao hơn, nhưng các chất tạo chelat như vậy khó gắn với gốc hướng đích bằng cách sử dụng liên kết amit.

Gốc tạo chelat thích hợp có thể được tạo thành bằng phương pháp đã biết, bao gồm các phương pháp được mô tả trong US 5,624,901 (chẳng hạn các ví dụ 1 và 2) và WO2008/063721 (cả hai tài liệu này đều được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

R_C là gốc kết hợp. Các gốc thích hợp bao gồm các nhóm hydrocarbonyl như các nhóm alkyl hoặc akenyl có tận cùng là nhóm axit carboxylic. Tác giả sáng chế đã xác minh được rằng việc sử dụng gốc liên kết axit carboxylic để tạo ra amit, như bằng phương pháp theo sáng chế, sẽ tạo ra thể liên hợp bền hơn giữa chất tạo chelat và gốc hướng mô.

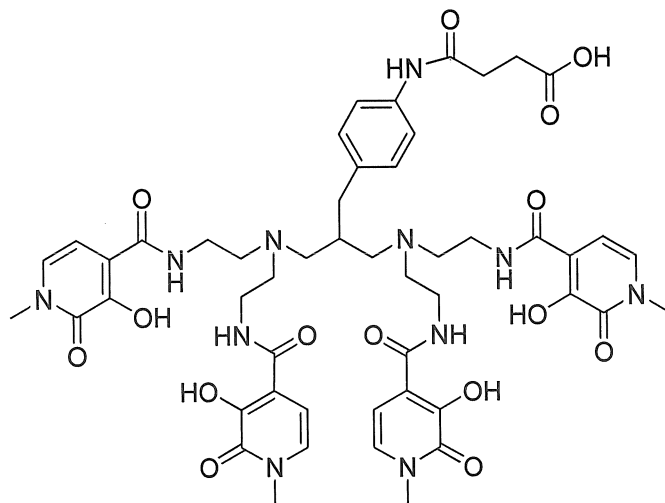
Theo một phương án được ưu tiên nhất theo sáng chế, gốc kết hợp (R_C) liên kết phối tử octadentat với gốc hướng đích được lựa chọn từ



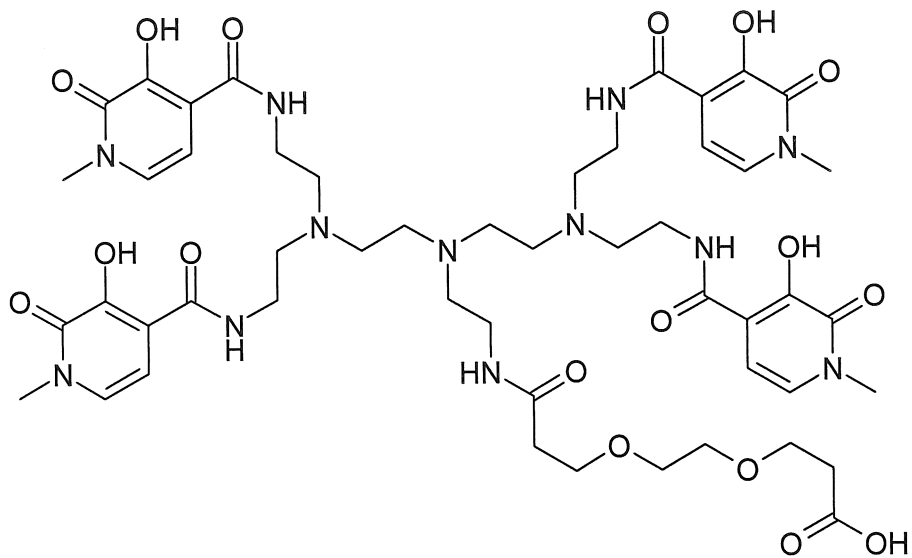
trong đó Ph là nhóm phenylen, tốt hơn là nhóm para-phenylen.

Theo một phương án được ưu tiên, R_C là $[-(CH_2)_{1-3}-Ph-N(H)-C(=O)-(CH_2)_{1-5}-C(=O)OH]$. Theo một phương án được ưu tiên hơn, R_C là $[-(CH_2)-para\text{-phenylen-}N(H)-C(=O)-(CH_2)_2-C(=O)OH]$.

Chất tạo chelat octadentat được đặc biệt ưu tiên bao gồm các chất tạo chelat octadentat có công thức (III) và (IV) dưới đây:



(III)



(IV)

Việc tổng hợp hợp chất (III) được mô tả dưới đây và tuân theo quy trình tổng hợp được mô tả dưới đây.

Bước a) của phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện theo con đường tổng hợp thích hợp bất kỳ. Một số ví dụ cụ thể về các phương pháp tổng hợp được nêu trong các ví dụ sau đây. Các phương pháp như vậy đề xuất các ví dụ cụ thể, nhưng phương pháp tổng hợp được minh họa trong đó cũng sẽ có thể dùng được trong ngữ cảnh chung bởi chuyên gia trong lĩnh vực. Vì vậy, các phương pháp được minh họa trong phần ví dụ đó cũng được dự định cũng như việc bộc lộ chung có thể áp dụng cho tất cả các khía cạnh và các phương án của sáng chế trong bối cảnh cho phép.

Tốt hơn là phức hệ gồm thori phát ra tia alpha và phối tử octadentat trong tất cả các khía cạnh theo sáng chế được tạo thành hoặc có thể được tạo thành mà không cần gia nhiệt trên 60°C (chẳng hạn không cần gia nhiệt trên 50°C), tốt hơn là không cần gia nhiệt trên 38°C và tốt nhất là không cần gia nhiệt trên 25°C (như trong khoảng 20 đến 38°C). Khoảng điển hình có thể là, ví dụ 15 đến 50 °C hoặc 20 đến 40°C. Phản ứng tạo phức (phần c)) trong các phương pháp theo sáng chế) có thể được thực hiện trong khoảng thời gian hợp lý bất kỳ nhưng sẽ tốt hơn là trong khoảng thời gian từ 1 đến 120 phút, tốt hơn là từ 1 đến 60 phút, và tốt hơn nữa là từ 5 đến 30 phút.

Cũng tốt hơn nữa là thể liên hợp của gốc hướng đích và phối tử octadentat được điều chế trước khi bổ sung ion đồng vị thori phát ra tia alpha $^{227}\text{Th}^{4+}$. Vì vậy, các sản phẩm theo sáng chế tốt hơn là được tạo thành hoặc có thể được tạo thành bằng cách tạo phức của đồng vị thori phát ra tia alpha (ion $^{227}\text{Th}^{4+}$) bằng thể liên hợp giữa phối tử octadentat và gốc hướng mô (chất tạo chelat hướng mô).

Các loại hợp chất hướng đích khác nhau có thể được liên kết với thori (chẳng hạn thori-227) thông qua chất tạo chelat octadentat (bao gồm một gốc kết hợp như được mô tả ở đây).

Thông thường, như được sử dụng ở đây, gốc hướng đích sẽ là “peptit” hoặc “protein”, là các cấu trúc được hình thành chủ yếu từ bộ khung amit giữa các hợp phần axit amin có hoặc không có các đặc điểm cấu trúc bậc hai và bậc ba.

Theo sáng chế, ^{227}Th có thể được tạo phức bởi các tác nhân tạo phức hướng đích được nối hoặc có thể nối với gốc hướng mô bởi liên kết amit như được mô tả ở đây.

Diễn hình, gốc hướng đích sẽ có phân tử lượng từ 100 g/mol đến vài triệu g/mol (đặc biệt là từ 100 g/mol đến 1 million g/mol), và sẽ tốt hơn là có ái lực trực tiếp đối với thụ thể có liên quan đến bệnh, và/hoặc sẽ bao gồm các chất gắn kết thích hợp được sử dụng trước (chẳng hạn biotin hoặc avidin) gắn với phân tử mà được hướng đến bệnh trước khi sử dụng ^{227}Th .

Liên kết đặc hiệu (gốc hướng mô) theo sáng chế được chọn để hướng đích kháng nguyên HER2.

Gốc hướng mô theo sáng chế bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1:

Chuỗi nhẹ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLL
IYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO. 1)

và một chuỗi peptit có trình tự tương tự hoặc giống hệt với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ 2 đến 6 sau đây:

Chuỗi nặng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 4)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
 YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREENYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 6)

Theo một phương án được ưu tiên, gốc hướng mô bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1:

Chuỗi nhẹ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLL
 IYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPT
 FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK

VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO. 1)

và một chuỗi peptit có trình tự tương tự hoặc giống hệt với trình tự 2:

Chuỗi năng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 2).

Tính đồng nhất/tính tương tự đáng kể về mặt trình tự có thể được hiểu như là có mức tương tự/mức đồng nhất về mặt trình tự ít nhất là 80% với các trình tự hoàn thiện và/hoặc ít nhất 90% với các vùng gắn kết đặc hiệu (các vùng này được in đậm trong các trình tự nêu trên và tùy ý các phần của chúng được gạch chân). Mức tương tự hoặc tốt hơn nữa là mức đồng nhất về mặt trình tự được ưu tiên có thể là ít nhất 92%, 95%, 97%, 98% hoặc 99% đối với các vùng in đậm và tốt hơn là đối với toàn bộ trình tự. Mức tương tự và/hoặc mức đồng nhất về mặt trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình "BestFit" của gói phần mềm Genetics Computer Group Version 10 từ trường đại học University of Wisconsin. Chương trình này sử dụng thuật toán nội bộ của Smith và Waterman với các giá trị mặc định: Điểm phạt tạo khoảng trống=8, Điểm phạt kéo dài khoảng trống=2, Điểm khớp trung bình =2,912, điểm không khớp trung bình 2,003.

Theo một phương án được ưu tiên, gốc hướng mô bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1, và một chuỗi peptit có mức tương tự về trình tự là 98 % hoặc lớn hơn hoặc giống hệt với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ 2 đến 6.

Theo một phương án được ưu tiên hơn, gốc hướng mô bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1, và một chuỗi peptit có mức tương tự về trình tự là 99 % hoặc lớn hơn hoặc giống hệt với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ 2 đến 6.

Theo một phương án được ưu tiên khác, gốc hướng mô bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1, và một chuỗi peptit có mức tương tự về trình tự là 98 % hoặc lớn hơn hoặc giống hệt với trình tự 2.

Theo một phương án được ưu tiên hơn, gốc hướng mô bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1, và một chuỗi peptit có mức tương tự về trình tự là 99 % hoặc lớn hơn hoặc giống hệt với trình tự 2.

Gốc hướng mô theo sáng chế là biến thể của trastuzumab:

SEQ ID NO. 1 và 2: trastuzumab không chứa lysin ở đầu tận cùng C

SEQ ID NO. 1 và 3: trastuzumab không chứa lysin ở đầu tận cùng C và các đột biến E359D, M361L trên chuỗi nặng

SEQ ID NO. 1 và 4: trastuzumab không chứa lysin ở đầu tận cùng C và các đột biến N300A, E359D, M361L trên chuỗi nặng

SEQ ID NO. 1 và 5: trastuzumab không chứa lysin ở đầu tận cùng C và các đột biến N300Q, E359D, M361L trên chuỗi nặng

SEQ ID NO. 1 và 6: trastuzumab không chứa lysin ở đầu tận cùng C và các đột biến Q298N, E359D, M361L trên chuỗi nặng

Kháng thể kháng HER2 theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách biểu hiện tái tổ hợp trình tự axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc các phần của nó trong tế bào chủ. Để biểu hiện tái tổ hợp kháng thể, phần gắn kết kháng nguyên, hoặc biến thể của nó, tế bào chủ có thể được chuyển nhiễm với một hoặc nhiều vector biểu hiện tái tổ hợp mang các đoạn ADN mã hóa các chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng

hoặc các phần của nó sao cho các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng này được biểu hiện trong tế bào chủ. Phương pháp ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn được sử dụng để điều chế và/hoặc thu nhận các axit nucleic mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, kết hợp các axit nucleic này vào vectơ biểu hiện tái tổ hợp và đưa các vectơ này vào tế bào chủ, chẳng hạn như các phương pháp được mô tả trong tài liệu: Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) và trong patent Mỹ số 4,816,397 bởi Boss và đồng tác giả.

Ngoài ra, các trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của các chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể được chuyển hóa, ví dụ, thành các trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi kháng thể với chiều dài đầy đủ, các đoạn Fab, hoặc thành scFv. Đoạn ADN mã hóa VL hoặc VH có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được, (sao cho các trình tự axit amin được mã hóa bởi hai đoạn ADN là thuộc cấu trúc) với một đoạn ADN khác mã hóa, ví dụ, vùng hằng định trên kháng thể hoặc đoạn liên kết linh hoạt. Các trình tự của các vùng hằng định thuộc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người là đã biết trong lĩnh vực (xem Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 chẳng hạn) và các đoạn ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng phương pháp khuếch đại PCR tiêu chuẩn.

Để tạo ra trình tự polynucleotit mã hóa scFv, các axit nucleic mã hóa VH và VL có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được với một đoạn khác mã hóa đoạn liên kết linh hoạt sao cho các trình tự VH và VL có thể được biểu hiện ở dạng protein chuỗi đơn kế tiếp, với các vùng VL và VH được nối bởi đoạn liên kết linh hoạt (xem Bird et al. (1988) *Science* 242 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554 chẳng hạn).

Để biểu hiện các kháng thể, đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc biến thể của nó, các phương pháp ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn có thể được sử dụng (xem, ví dụ, Goeddel; *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). Ví dụ, ADN mã hóa polypeptit mong muốn có thể

được cài vào vectơ biểu hiện, vectơ này sau đó được chuyển nhiễm vào tế bào chủ thích hợp. Tế bào chủ thích hợp là tế bào không nhân và tế bào có nhân điển hình. Ví dụ về tế bào chủ không nhân là vi khuẩn chẳng hạn, ví dụ về tế bào chủ có nhân điển hình là nấm men, côn trùng và tế bào hoặc tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, ADN mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được cài xen vào các vectơ riêng rẽ. Theo các phương án khác, ADN mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được cài xen vào cùng một vectơ. Cần hiểu rằng việc thiết kế vectơ biểu hiện, bao gồm việc lựa chọn các trình tự điều hòa chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố như việc lựa chọn tế bào chủ, mức độ biểu hiện protein mong muốn và sự biểu hiện này là biểu hiện mặc định hoặc biểu hiện cảm ứng.

Các vectơ biểu hiện thông dụng để dùng cho vi khuẩn được xây dựng bằng cách cài xen trình tự ADN mã hóa protein mong muốn cùng với các tín hiệu khởi đầu và kết thúc dịch mã thích hợp trong pha đọc có thể hoạt động được với trình tự khởi đầu chức năng. Vectơ này sẽ bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu chọn lọc kiểu hình và một điểm khởi đầu sao chép để đảm bảo sự duy trì vectơ và, nếu muốn, tạo ra sự khuếch đại trong vật chủ. Vật chủ không nhân thích hợp để biến nạp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* và các loài khác nhau thuộc giống *Pseudomonas*, *Streptomyces*, và *Staphylococcus*.

Các vectơ vi khuẩn có thể là, ví dụ, trên cơ sở thể thực khuẩn, plasmid hoặc phagemit. Các vectơ này có thể chứa gen đánh dấu chọn lọc và điểm khởi đầu sao chép ở vi khuẩn có nguồn gốc từ các plasmid sẵn có trên thị trường thường chứa các yếu tố của vectơ tạo dòng đã biết pBR322 (ATCC 37017). Sau khi biến nạp chủng vật chủ thích hợp và cho chủng vật chủ này phát triển đến mật độ tế bào thích hợp, gen khởi đầu đã lựa chọn được ức chế lại/cảm ứng bằng các phương pháp thích hợp (chẳng hạn, cảm ứng bằng cách thay đổi nhiệt độ hoặc cảm ứng hóa học) và các tế bào được nuôi cấy trong một khoảng thời gian nữa. Các tế bào thường được thu nhận bằng cách ly tâm, phá vỡ bằng phương pháp vật lý hoặc hóa học, và chất chiết thô thu được được giữ lại để tinh chế tiếp.

Trong hệ vi khuẩn, một số vectơ biểu hiện có thể được lựa chọn một cách thuận lợi tùy thuộc vào mục đích dự định đối với protein được biểu hiện. Ví dụ, khi một

lượng lớn protein như vậy được sản xuất, để tạo ra các kháng thể hoặc để sàng lọc thư viện peptit, ví dụ, các vectơ hướng đến sự biểu hiện của các sản phẩm protein dung hợp ở mức cao mà dễ dàng được tinh chế có thể là thích hợp.

Kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc biến thể của nó bao gồm các sản phẩm được tinh chế trong tự nhiên, các sản phẩm của quá trình tổng hợp hóa học, và các sản phẩm được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp từ vật chủ không nhân, bao gồm, ví dụ, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* và các loài khác nhau thuộc giống *Pseudomonas*, *Streptomyces*, và *Staphylococcus*, tốt hơn là từ tế bào *E. coli*.

Các trình tự điều hòa dùng để biểu hiện tế bào chủ động vật có vú bao gồm các yếu tố virus mà nhằm biểu hiện protein ở mức độ cao trong tế bào động vật có vú, như trình tự khởi đầu và/hoặc trình tự tăng cường có nguồn gốc từ cytomegalovirus (CMV) (như CMV trình tự khởi đầu/tăng cường), Simian Virus 40 (SV40) (như trình tự khởi đầu/tăng cường SV40), adenovirus, (chẳng hạn, trình tự khởi đầu muộn chủ yếu adenovirus (adenovirus major late promoter - AdMLP)) và polyoma. Sự biểu hiện của kháng thể có thể là mặc định hoặc điều hòa (chẳng hạn cảm ứng bằng cách bổ sung hoặc loại bỏ các chất cảm ứng phân tử nhỏ như Tetracyclin kết hợp với hệ thống Tet). Để mô tả kỹ hơn về các yếu tố điều hòa virus, và trình tự của nó, xem tài liệu U.S. 5,168,062 của Stinski, U.S. 4,510,245 của Bell và đồng tác giả và U.S. 4,968,615 của Schaffner và đồng tác giả chẳng hạn. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp cũng có thể bao gồm các điểm khởi đầu sao chép và gen đánh dấu chọn lọc (xem U.S. 4,399,216, 4,634,665 và U.S. 5,179,017 chẳng hạn). Gen đánh dấu chọn lọc thích hợp bao gồm các gen có tính kháng đối với các thuốc như G418, puromycin, hygromycin, blasticidin, zeocin/bleomycin hoặc methotrexate hoặc gen đánh dấu chọn lọc mà lợi dụng dinh dưỡng thụ động như Glutamine Synthetase (Bebbington et al., Biotechnology (N Y). 1992 Feb;10(2):169-75), trên tế bào chủ mà vectơ này được đưa vào. Ví dụ, gen dihydrofolate reductase (DHFR) có tính kháng methotrexate, gen neo có tính kháng G418, gen bsd từ *Aspergillus terreus* có tính kháng blasticidin, puromycin N-acetyltransferase có tính kháng puromycin, sản phẩm gen Sh ble có tính kháng zeocin, và gen kháng hygromycin ở *E. coli* (hyg hoặc hph) có tính kháng hygromycin. Gen đánh

dấu chọn lọc như DHFR hoặc Glutamin Synthetaza cũng có thể sử dụng cho kyxxt huật khuếch đại kết hợp với MTX và MSX.

Sự chuyển nhiễm vector biểu hiện vào tế bào chủ có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn như điện chuyển (điện di), chuyển gen vào nhân tế bào, kết tủa canxi-phosphat, chuyển nhiễm vào liposom, chuyển nhiễm trên cơ sở polycation như chuyển nhiễm trên cơ sở polyetylenimin (PEI) và chuyển nhiễm DEAE-dextran.

Tế bào chủ động vật có vú thích hợp để biểu hiện kháng thể, đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc biến thể của nó được đề cập trong bản mô tả bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO cells) như CHO-K1, CHO-S, CHO-K1SV [bao gồm các tế bào dhfr-CHO, được mô tả trong tài liệu: Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 and Urlaub et al., Cell. 1983 Jun;33(2):405-12, được sử dụng với gen đánh dấu chọn lọc DHFR, chẳng hạn như được mô tả trong tài liệu: R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621; và các tế bào bất hoạt khác được nêu làm ví dụ trong tài liệu: Fan et al., Biotechnol Bioeng. 2012 Apr;109(4):1007-15], các tế bào u tủy NS0, tế bào COS, tế bào HEK293, tế bào HKB11, tế bào BHK21, tế bào CAP, tế bào EB66, và tế bào SP2.

Sự biểu hiện cũng có thể là tạm thời hoặc bán ổn định trong các hệ biểu hiện như HEK293, HEK293T, HEK293-EBNA, HEK293E, HEK293-6E, HEK293-Freestyle, HKB11, Expi293F, 293EBNALT75, CHO Freestyle, CHO-S, CHO-K1, CHO-K1SV, CHOEBNALT85, CHOS-XE, CHO-3E7 hoặc tế bào CAP-T (chẳng hạn Durocher et al., Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):E9).

Theo một số phương án, vector biểu hiện được thiết kế sao cho protein được biểu hiện được tiết vào môi trường nuôi cấy trong đó tế bào chủ phát triển. Kháng thể, đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc biến thể của nó có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp tinh chế protein tiêu chuẩn.

Kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc biến thể của nó có thể được thu hồi và được tinh chế từ dịch nuôi cấy tế bào tái tổ hợp bằng

các phương pháp đã biết bao gồm, nhưng không giới hạn ở kết tủa bằng amoni sulfat hoặc etanol, chiết bằng axit, sắc ký Protein A, sắc ký Protein G, sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký phospho-xenuloza, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực, sắc ký hydroxylapatit, sắc ký kiểu kết hợp và sắc ký lectin. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (“High performance liquid chromatography - HPLC”) cũng có thể được dùng để tinh chế. Xem, chẳng hạn, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, hoặc *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), e.g., Chapters 1, 4, 6, 8, 9, 10, toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc biến thể của nó bao gồm các sản phẩm được tinh chế trong tự nhiên, các sản phẩm của quá trình tổng hợp hóa học, và các sản phẩm được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp từ vật chủ có nhân điển hình, bao gồm, ví dụ, nấm men, thực vật bậc cao, côn trùng và tế bào động vật có vú. Tùy thuộc vào vật chủ được dùng trong quy trình sản xuất tái tổ hợp, kháng thể theo sáng chế có thể được glycosyl hóa hoặc có thể không được glycosyl hóa. Các phương pháp như vậy được mô tả trong nhiều sổ tay thí nghiệm tiêu chuẩn, như Sambrook, nêu ở trên, các Phần 17.37-17.42; Ausubel, nêu ở trên, các chương 10, 12, 13, 16, 18 và 20.

Trong các phương án được ưu tiên, kháng thể được tinh chế (1) đến lớn hơn 95% khối lượng kháng thể như được xác định bởi phương pháp Lowry, quang phổ UV-Vis hoặc bằng phương pháp điện di trên gel SDS-Capillary (ví dụ trên thiết bị Caliper LabChip GXII, GX 90 hoặc Biorad Bioanalyzer) chẳng hạn, và theo các phương án được ưu tiên hơn nhiều hơn 99% khối lượng, (2) đến mức độ đủ để thu được ít nhất 15 gốc của trình tự axit amin bên trong hoặc đầu tận cùng N, hoặc (3) đến độ đồng nhất bởi SDS-PAGE trong các điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng thuốc nhuộm xanh da trời Coomassie hoặc, tốt hơn là, thuốc nhuộm bạc. Kháng thể xuất hiện trong tự nhiên được phân lập bao gồm kháng thể ở vị trí bình thường trong tế bào tái tổ hợp khi ít nhất một thành phần trong môi trường tự nhiên của kháng thể này không có mặt. Tuy nhiên, thông thường kháng thể được phân lập sẽ được tạo ra bằng ít nhất một bước tinh chế.

Đối với hợp phần thori phát ra tia alpha, gần đây đã phát hiện ra rằng ^{227}Th có thể được dùng với lượng mà vừa hữu hiệu để trị liệu và vừa không tạo ra tính độc không dung nạp được ở tủy xương. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tính không độc với tủy xương chấp nhận được" được sử dụng để chỉ ra rằng, quan trọng nhất là, lượng radi-223 được tạo ra bởi sự phân rã đồng vị phóng xạ thori-227 được sử dụng thường không đủ để gây hại trực tiếp cho đối tượng. Tuy nhiên, người có kinh nghiệm biết rõ rằng lượng gây tổn hại tủy xương (và có thể là phản ứng gây hại) mà sẽ là tác dụng phụ chấp nhận được của việc điều trị sẽ thay đổi đáng kể theo loại bệnh được điều trị, mục tiêu của phác đồ điều trị, và tiên lượng bệnh của đối tượng. Mặc dù đối tượng được ưu tiên theo sáng chế là người, các động vật có vú khác, đặc biệt là các động vật bầu bạn như chó, sẽ có lợi từ việc sử dụng theo sáng chế và mức độ tổn hại tủy xương chấp nhận được cũng có thể tương ứng với loài của đối tượng. Mức độ tổn hại tủy xương có thể chấp nhận được trong điều trị các bệnh ác tính sẽ thường lớn hơn các bệnh không phải ác tính. Phương pháp xác định mức gây độc tủy xương đã biết rõ là phương pháp đếm tế bào bạch cầu trung tính và, trong sáng chế này, lượng ^{223}Ra không gây độc tủy xương có thể chấp nhận được sẽ thường là lượng được điều chỉnh sao cho phần trung tính ở điểm thấp nhất của nó (nadir) không nhỏ hơn 10% số đếm trước khi điều trị. Tốt hơn là, lượng ^{223}Ra không gây độc tủy xương có thể chấp nhận được sẽ là lượng mà phần tế bào trung tính ít nhất là 20% ở mức thấp nhất nadir và tốt hơn nữa là ít nhất là 30%. Phần tế bào trung tính ở mức thấp nhất nadir ít nhất là 40% là được ưu tiên nhất.

Ngoài ra, các hợp chất chứa ^{227}Th phóng xạ có thể được sử dụng trong phác đồ liều cao trong đó tính độc tủy xương của ^{223}Ra được tạo ra sẽ thường không thể chấp nhận được khi phương pháp hỗ trợ tế bào gốc hoặc phương pháp thu hồi tương đương được bao hàm. Trong các trường hợp như vậy, số đếm tế bào trung tính có thể được giảm đến dưới 10% ở mức thấp nhất nadir và cá biệt sẽ giảm tới 5% hoặc nếu cần dưới 5%, miễn là có các biện pháp phòng ngừa thích hợp và việc hỗ trợ tế bào gốc tiếp theo được đưa ra. Các kỹ thuật này đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Thori-227 tương đối dễ sản xuất và có thể được điều chế gián tiếp từ ^{226}Ra được chiếu xạ nơ-tron, mà nó sẽ chứa nuclit mẹ của ^{227}Th , nghĩa là ^{227}Ac ($T_{1/2} = 22$

năm). Actini-227 có thể được tách khá dễ dàng từ đích ^{226}Ra và được sử dụng làm nguồn sản xuất ^{227}Th . Quy trình này có thể được định quy mô ở quy mô công nghiệp nếu cần, và vì vậy tránh được vấn đề về mặt cung cấp được nhận thấy với hầu hết các chất phát tia alpha khác được xem như là thích hợp đối với phương pháp trị liệu phóng xạ hướng đích phân tử.

Thori-227 có thể được dùng với lượng đủ để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn mà không tạo ra quá nhiều radi-223 để gây ra sự ức chế tủy xương một cách quá mức. Mong muốn duy trì đồng vị con trong vùng hướng đích sao cho các tác dụng trị liệu khác có thể được bắt nguồn từ sự phân rã của chúng. Tuy nhiên, không cần duy trì sự kiểm soát của các sản phẩm phân rã thori để có tác dụng trị liệu hữu ích mà không gây ra tính độc tủy xương ở mức không chấp nhận được.

Giả sử tác dụng tiêu diệt tế bào khối u sẽ chủ yếu đến từ thori-227 và không phải đến từ đồng vị con của nó, liều lượng trị liệu có khả năng của đồng vị này có thể được thiết lập bằng cách so sánh với các chất phát tia alpha khác. Ví dụ, đối với astatin-211, liều lượng trị liệu ở động vật thường là 2-10 MBq trên một kg. Bằng cách hiệu chỉnh chu kỳ bán rã và năng lượng, liều lượng tương ứng đối với thori-227 cần phải ít nhất là 36-200 kBq trên một kg thể trọng. Điều này sẽ đặt ra một giới hạn dưới đối với lượng ^{227}Th mà có thể được dùng một cách hữu ích với mong muốn tạo ra tác dụng trị liệu. Tính toán này thừa nhận sự duy trì astatin và thori ở mức có thể so sánh được. Tuy nhiên, rõ ràng là chu kỳ bán rã 18,7 ngày của thori sẽ có thể dẫn tới việc loại bỏ đồng vị này nhiều hơn trước khi nó bị phân rã. Vì vậy, liều lượng đã tính toán được này thường cần được xem như là lượng hữu hiệu tối thiểu. Liều trị liệu được biểu thị đối với ^{227}Th được giữ lại hoàn toàn (nghĩa là ^{227}Th mà không bị loại bỏ khỏi cơ thể) sẽ thường ít nhất là 18 hoặc 25 kBq/kg, tốt hơn là ít nhất 36 kBq/kg và tốt hơn nữa là ít nhất 75 kBq/kg, ví dụ 100 kBq/kg hoặc lớn hơn. Lượng thori lớn hơn sẽ được mong đợi để có tác dụng trị liệu lớn hơn nhưng có thể không được dùng nếu xảy ra tác dụng phụ không thể chấp nhận được. Tương tự, nếu thori được dùng ở dạng có thời gian bán rã sinh học ngắn (nghĩa là thời gian bán rã trước khi loại bỏ khỏi cơ thể vẫn mang thori), thì lượng đồng vị phóng xạ lớn hơn sẽ được đòi hỏi với cùng tác dụng trị liệu do rất nhiều thori sẽ bị loại bỏ trước khi nó phân rã. Tuy nhiên, sẽ có sự suy giảm về

lượng radi-223 được tạo ra. Lượng thori-227 nêu trên được sử dụng khi đồng vị này được giữ lại hoàn toàn có thể có liên quan rõ rệt đến các liều lượng tương đương với thời gian bán rã sinh học ngắn hơn. Những kết quả tính toán như vậy là đã biết trong lĩnh vực và được nêu trong WO 04/091668 (chẳng hạn trong phần văn bản trong các ví dụ 1 và 2).

Nếu một hợp chất được đánh dấu phóng xạ giải phóng ra các nuclit con, điều quan trọng là biết được hậu quả tất yếu, nếu có thể, của nuclit con phóng xạ bất kỳ. Với ^{227}Th , sản phẩm con chính là ^{223}Ra , đang được đánh giá lâm sàng do các đặc tính nhằm vào xương của nó. Radi-223 làm sạch máu rất nhanh và nó cô đặc trong bộ xương hoặc được tiết ra qua đường ruột và dạ dày (xem tài liệu: Larsen, J Nucl Med 43(5, Phụ lục): 1,80E2002). Vì vậy, radi-223 được giải phóng *in vivo* từ ^{227}Th có thể không ảnh hưởng đến các mô mềm khỏe mạnh ở mức độ lớn. Trong nghiên cứu bởi Müller trong Int. J. Radiat. Biol. 20:233-243 (1971) về sự phân phối của ^{227}Th dưới dạng muối xitrat hòa tan, đã nhận ra rằng ^{223}Ra được tạo ra từ ^{227}Th trong các mô mềm dễ dàng được phân bố lại vào xương hoặc được tiết ra. Vì vậy, tính độc đã biết của radi phát tia alpha, đặc biệt là đối với tủy xương, là một vấn đề đối với liều lượng thori.

Trên thực tế, đã thiết lập lần đầu tiên trong WO 04/091668 rằng liều lượng ít nhất là 200 kBq/kg ^{223}Ra có thể được dùng và được dung nạp trong đối tượng là người. Dữ liệu này được thể hiện trong công bố nêu trên. Vì vậy, một cách khá bất ngờ, có thể nhận thấy rằng, tồn tại cửa sổ trị liệu trong đó lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của ^{227}Th (như lớn hơn 36 kBq/kg) có thể được dùng cho đối tượng là động vật có vú mà không mong đợi rằng đối tượng này sẽ có nguy cơ nguy hiểm không chấp nhận được hoặc thậm chí là tính độc tủy xương gây chết người. Tuy nhiên, điều cực kỳ quan trọng là việc sử dụng cửa sổ trị liệu này một cách tốt nhất được thực hiện và vì vậy một điều thiết yếu là thori phóng xạ được tạo phức nhanh chóng và hiệu quả, và có ái lực rất cao sao cho tỷ lệ lớn nhất có thể có của liều lượng này được phân phối đến vị trí đích.

Lượng ^{223}Ra được tạo ra từ dược phẩm chứa ^{227}Th sẽ tùy thuộc vào thời gian bán rã sinh học của hợp chất được đánh dấu phóng xạ. Tình huống lý tưởng là sử dụng phức hợp với sự hấp thụ nhanh chóng vào khối u, bao gồm sự tiếp nhận vào tế bào

khối u, sự lưu lại chắc chắn trong khối u và thời gian bán rã sinh học ngắn trong các mô bình thường. Tuy nhiên, phức hệ với thời gian bán rã sinh học ngắn hơn thời gian bán rã sinh học lý tưởng có thể là hữu hiệu miễn là liều lượng ^{223}Ra được duy trì thuộc khoảng có thể dung nạp. Lượng radi-223 được tạo ra *in vivo* sẽ tùy thuộc vào lượng thori được sử dụng và thời gian lưu sinh học của phức thorium. Lượng radi-223 được tạo ra trong trường hợp bất kỳ có thể dễ dàng được tính toán bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Lượng ^{227}Th tối đa có thể sử dụng sẽ được xác định bởi lượng radi được tạo ra *in vivo* và cần nhỏ hơn lượng mà sẽ tạo ra mức tác dụng phụ không thể chấp nhận được, cụ thể là tính độc đối với tủy xương. Lượng này thường sẽ nhỏ hơn 300kBq/kg, đặc biệt là nhỏ hơn 200 kBq/kg và tốt hơn nữa là nhỏ hơn 170 kBq/kg (chẳng hạn nhỏ hơn 130 kBq/kg). Liều lượng hữu hiệu tối thiểu sẽ được xác định bởi tính độc tế bào của thori, tính nhạy cảm của mô bị bệnh đối với sự chiếu xạ alpha được tạo ra và mức độ mà thori được kết hợp, giữ lại và phân phối một cách hữu hiệu bởi phức hợp hướng đích (trong trường hợp này là sự tổ hợp của phối tử và gốc hướng đích).

Trong phương pháp theo sáng chế, phức hợp thori mong muốn được dùng ở liều lượng thori-227 là 18 đến 400 kBq/kg thể trọng, tốt hơn là 36 đến 200 kBq/kg, (như 50 đến 200 kBq/kg) tốt hơn nữa là 75 đến 170 kBq/kg, đặc biệt là 100 đến 130 kBq/kg. Tương ứng, liều duy nhất có thể bao gồm liều bất kỳ trong số các khoảng này nhân với thể trọng thích hợp, như 30 đến 150 Kg, tốt hơn là 40 đến 100 Kg (chẳng hạn khoảng từ 540 kBq đến 4000 KBq trên một liều, v.v.). Ngoài ra, mong muốn liều lượng thori, chất tạo phức và đường dùng sẽ đảm bảo liều lượng radi-223 được tạo ra *in vivo* nhỏ hơn 300 kBq/kg, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 200 kBq/kg, cũng tốt hơn nữa là nhỏ hơn 150 kBq/kg, đặc biệt là nhỏ hơn 100 kBq/kg. Mặt khác, điều này sẽ tạo ra mức phơi nhiễm với ^{223}Ra được xác định bằng cách nhân các khoảng này với thể trọng bất kỳ trong số các thể trọng đã chỉ ra. Mức liều dùng nêu trên tốt hơn là liều được giữ lại hoàn toàn của ^{227}Th nhưng có thể là liều được sử dụng có tính đến việc một số ^{227}Th sẽ được thanh thải khỏi cơ thể trước khi nó phân rã.

Khi thời gian bán rã sinh học của phức hợp ^{227}Th là ngắn so với thời gian bán rã vật lý (chẳng hạn nhỏ hơn 7 ngày, đặc biệt là nhỏ hơn 3 ngày) có thể cần đến liều

được sử dụng lớn hơn đáng kể để tạo ra liều được giữ lại tương đương. Vì vậy, ví dụ, liều được giữ lại hoàn toàn của 150 kBq/kg tương đương với phức hợp với chu kỳ bán rã 5 ngày được sử dụng ở liều lượng 711 kBq/kg. Liều dùng tương đương đối với các liều được giữ lại thích hợp bất kỳ có thể được tính từ tốc độ thanh thải sinh học của phức hợp bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực.

Do việc phân rã của một hạt nhân ^{227}Th tạo ra một nguyên tử ^{223}Ra , thời gian lưu và hoạt tính trị liệu của ^{227}Th sẽ có liên quan trực tiếp đến liều lượng ^{223}Ra chịu được bởi bệnh nhân. Lượng ^{223}Ra được tạo ra trong tình huống cụ thể bất kỳ có thể được tính toán bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ở đối tượng là động vật có vú (như được mô tả ở đây), phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng đã nêu sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của ít nhất một phức hợp thori hướng mô như được mô tả ở đây.

Đương nhiên là mong muốn giảm mức phơi nhiễm của đối tượng với chất đồng vị con ^{223}Ra đến mức tối thiểu, trừ khi các đặc tính của chất đồng vị này được sử dụng một cách hữu hiệu. Cụ thể, lượng radi-223 được tạo ra *in vivo* thường sẽ lớn hơn 40 kBq/kg, chẳng hạn lớn hơn 60 kBq/Kg. Trong một số trường hợp, cần thiết để ^{223}Ra được tạo ra *in vivo* lớn hơn 80 kBq/kg, chẳng hạn lớn hơn 100 hoặc 115 kBq/kg.

Thể liên hợp được gắn nhãn thori-227 trong các dung dịch chất mang thích hợp có thể be được dùng trong tĩnh mạch, trong khoang (chẳng hạn trong màng bụng), dưới da, qua đường miệng hoặc dùng tại chỗ, dưới dạng dùng một lần hoặc chế độ liều dùng phân đoạn. Tốt hơn là, phức hệ được liên hợp với gốc hướng đích sẽ được dùng ở dạng dung dịch bằng cách dùng ngoài đường tiêu hóa (chẳng hạn qua da), đặc biệt là dùng trong tĩnh mạch hoặc dùng trong khoang. Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế sẽ được bào chế trong dung dịch vô trùng để dùng ngoài đường tiêu hóa.

Thori-227 trong phương pháp và sản phẩm theo sáng chế có thể được dùng một mình hoặc kết hợp với phương thức điều trị khác bao gồm phẫu thuật, điều trị chiếu xạ tia bên ngoài, hóa trị liệu, các nuclit phóng xạ khác, hoặc điều chỉnh nhiệt độ mô v.v.. Điều này có thể tạo ra một phương án được ưu tiên khác nữa của phương pháp

theo sáng chế và do đó chế phẩm/thuốc có thể bao gồm ít nhất một chất có hoạt tính trị liệu khác nữa như một chất phóng xạ khác hoặc một chất hóa trị liệu khác.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, đối tượng cũng được đưa đi điều trị tế bào mầm và/hoặc phương pháp trị liệu hỗ trợ khác để làm giảm tác dụng gây độc tủy xương gây ra bởi radi-223.

Các phân tử được gắn nhãn thori (chẳng hạn thori-227) theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh ung thư hoặc không phải ung thư bằng cách hướng đến các thụ thể có liên quan đến bệnh. Thông thường, việc sử dụng ^{227}Th làm thuốc trong điều trị phóng xạ miễn dịch sẽ dựa trên việc liên kết ^{227}Th với kháng thể, đoạn kháng thể, hoặc cấu trúc của kháng thể hoặc đoạn kháng thể bởi một chất tạo chelat để điều trị các bệnh ung thư hoặc không phải ung thư. Việc sử dụng ^{227}Th trong các phương pháp và dược phẩm theo sáng chế là đặc biệt thích hợp để điều trị bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, caxinom phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC), và bệnh ung thư tử cung.

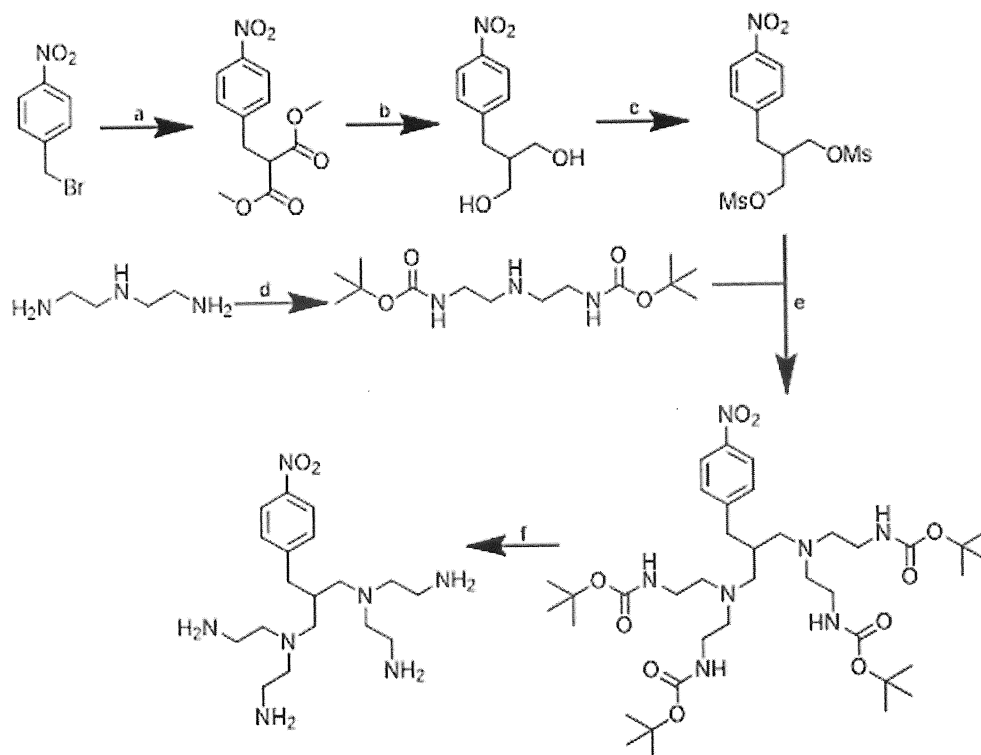
Theo một phương án khác nữa của sáng chế, bệnh nhân bị bệnh cả ở mô mềm và xương có thể được điều trị cả bằng ^{227}Th và bằng ^{223}Ra được tạo ra in vivo bằng thori đã được sử dụng. Theo khía cạnh được đặc biệt có lợi này, hợp phần trị liệu bổ sung cho phương pháp điều trị này có nguồn gốc từ lượng không gây độc tủy xương có thể chấp nhận được của ^{223}Ra bằng cách hướng đến bệnh thuộc bộ xương. Trong phương pháp trị liệu này, ^{227}Th thường được sử dụng để điều trị bệnh ung thư nguyên phát và/hoặc di căn của mô mềm bằng cách hướng một cách thích hợp đến nó và ^{223}Ra được tạo ra từ sự phân rã ^{227}Th được dùng để điều trị bệnh thuộc xương có liên quan trong cùng một đối tượng. Bệnh thuộc xương như vậy có thể là các bệnh di căn đối với bộ xương gây ra do bệnh ung thư mô mềm nguyên phát, hoặc có thể là bệnh nguyên phát trong đó việc điều trị mô mềm là để chống lại bệnh ung thư di căn. Đôi khi các bệnh mô mềm và bệnh ở xương có thể không có liên quan đến nhau (chẳng hạn việc điều trị bổ sung bệnh ở xương ở bệnh nhân bị mắc bệnh mô mềm gây thấp khớp).

Ví dụ về một số quy trình tổng hợp được đưa ra dưới đây. Các bước được chỉ ra trong các quy trình tổng hợp này sẽ có thể áp dụng cho nhiều phương án theo sáng

chế. Ví dụ, bước a) có thể tiến hành nhờ hợp chất trung gian AGC0021 được chỉ ra dưới đây trong nhiều hoặc tất cả các phương án được mô tả ở đây.

Tổng hợp hợp chất trung gian chính AGC0020

N,N,N',N'-tetrakis(2-aminoethyl)-2-(4-nitrobenzyl)propan-1,3-diamin

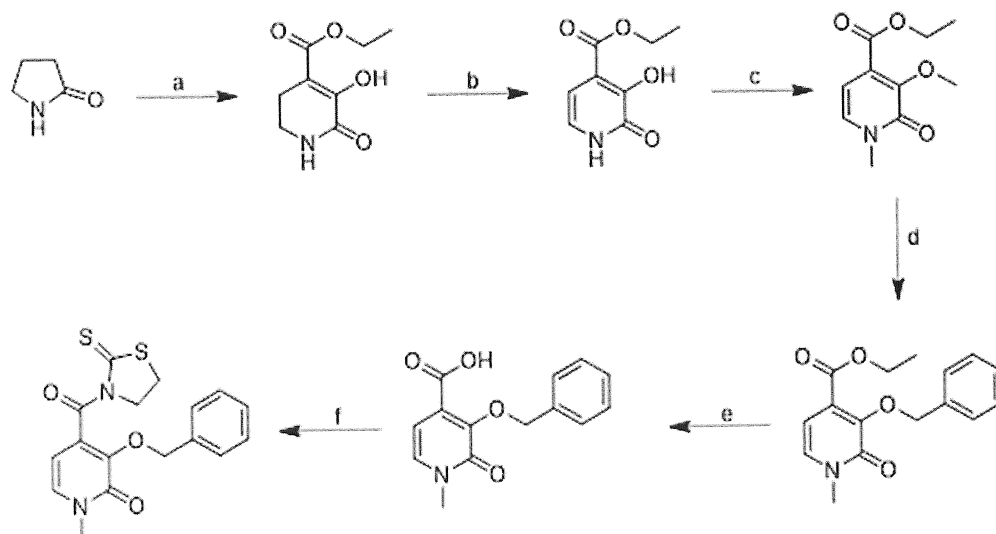


a) Dimethylmalonat, natri hydrit, THF, b) DIBAL-H, THF, c) MsCl, NEt₃, CH₂Cl₂.

d) Imidazol, Boc₂O, CH₂Cl₂, toluen, e) DIPEA, axetonitril, f) MeOH, nước, AcCl

Tổng hợp hợp chất trung gian chính AGC0021

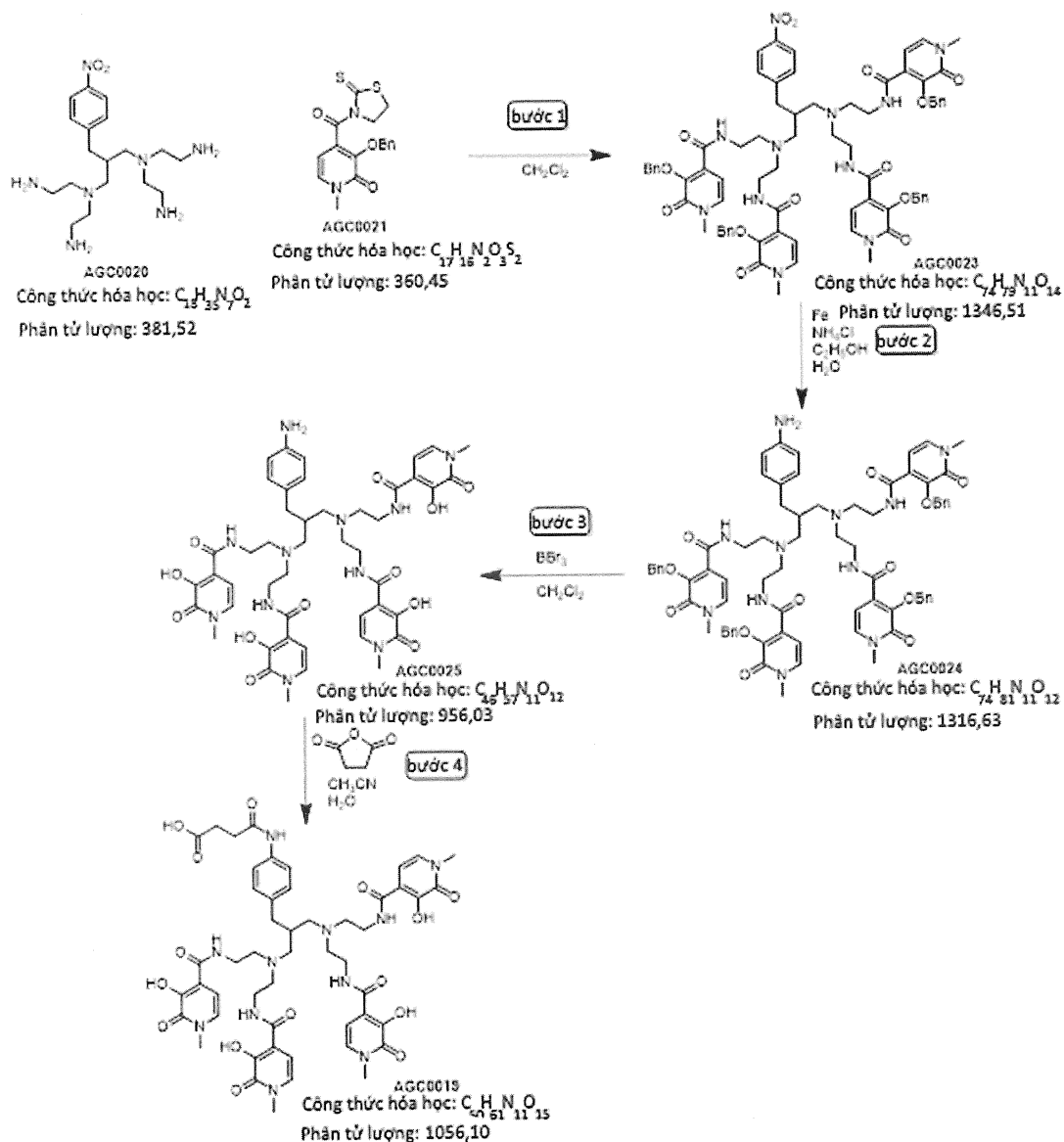
3-(benzyloxy)-1-metyl-4-[(2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)cacbonyl]pyridin-2(1H)-on



a) Diethylxalat, kali etoxit, toluen, EtOH, b) Pd/C, p-xylene, c) MeI, K₂CO₃, DMSO, acetone, d) i) BBr₃, DCM, ii) BnBr, K₂CO₃, KI, acetone, e) NaOH, nước, MeOH, f) , DCC, DMAP, DCM

Tổng hợp chelat của hợp chất có công thức (VIII)

Axit 4-[[4-(3-[bis(2-[[[(3-hydroxy-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)carbonyl]amino}ethyl)amino]-2-[[bis(2-[[[(3-hydroxy-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)carbonyl]amino}ethyl)amino]methyl]propyl)phenyl]-amino}-4-oxobutanoic



Trong phương pháp điều chế phức hệ theo sáng chế, tốt hơn là phản ứng kết hợp giữa chất tạo chelat octadentat và gốc hướng mô được thực hiện trong dung dịch nước. Điều này có một số lợi ích. Thứ nhất là, nó loại bỏ gánh nặng đối với nhà sản xuất trong việc loại bỏ dung môi xuống dưới mức chấp nhận được và chứng nhận việc loại bỏ này. Thứ hai là, nó làm giảm chất thải và quan trọng nhất là nó thúc đẩy sản xuất nhanh hơn nhwof việc tránh được bước phân tách hoặc loại bỏ. Trong ngữ cảnh được phát minh theo sáng chế, quan trọng là việc tổng hợp được thực hiện càng nhanh càng tốt do đồng vị phóng xạ sẽ bị phân rã ở mọi thời điểm và thời gian dùng để điều chế làm lãng phí vật liệu có giá trị và đưa vào các đồng vị con nhiễm tạp.

Dung dịch nước thích hợp bao gồm nước tinh khiết và chất đệm như chất đệm bất kỳ trong số nhiều chất đệm đã được biết rõ trong lĩnh vực. Chất đệm axetat, xitrat, phosphat (chẳng hạn PBS) và sulphonat (như MES) là các ví dụ điển hình về các chất đệm chứa nước đã được biết rõ.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm bước tạo ra dung dịch nước thứ nhất chứa phối tử chứa octadentat hydroxypyridinon (như được mô tả trong toàn bộ bản mô tả ở đây) và dung dịch nước thứ hai gồm gốc hướng mô (như được mô tả trong toàn bộ bản mô tả ở đây) và cho dung dịch nước thứ nhất và thứ hai này tiếp xúc với nhau.

Các gốc kết hợp thích hợp được thảo luận cụ thể trên đây và tất cả các nhóm và gốc được thảo luận ở đây dưới dạng các nhóm kết hợp và/hoặc nhóm liên kết có thể được sử dụng một cách thích hợp để kết hợp gốc hướng đích với phối tử. Một số nhóm kết hợp được ưu tiên bao gồm các nhóm kết hợp amit, este, ete và amin. Este và amit có thể được tạo ra một cách thuận lợi bằng cách tạo ra nhóm este đã được hoạt hóa từ axit carboxylic. Axit carboxylic như vậy có thể có mặt trong gốc hướng đích, gốc kết hợp và/hoặc gốc phối tử và sẽ thường phản ứng với rượu hoặc amin để tạo thành este hoặc amit. Các phương pháp như vậy là đã được biết rõ trong lĩnh vực và có thể sử dụng các chất phản ứng hoạt hóa đã được biết rõ bao gồm N-hydroxy maleimit, carbodiimit và/hoặc chất phản ứng hoạt hóa azodicarboxylat như DCC, DIC, EDC, DEAD, DIAD v.v..

Theo một phương án được ưu tiên, chất tạo chelat octadentat chứa bốn gốc hydroxypyridinon, được thế ở vị trí N bằng nhóm metyl alkyl, và gốc kết hợp tận cùng bằng nhóm axit carboxylic có thể được hoạt hóa bằng cách sử dụng ít nhất một chất phản ứng kết hợp (như chất phản ứng bất kỳ trong số các chất phản ứng được mô tả ở đây) và một chất hoạt hóa như N-hydroxysuccinimit (NHS) nhờ đó tạo ra este NHS của chất tạo chelat octadentat. Este đã được hoạt hóa này (chẳng hạn NHS) có thể được tách hoặc được sử dụng mà không cần tách để kết hợp với gốc hướng mô bất kỳ có nhóm amin tự do (như trên mạch bên lysin). Các este đã hoạt hóa khác là đã biết trong lĩnh vực và có thể là este bất kỳ của nhóm dimer hữu hiệu, như nhóm florinat, tosylat, mesylat, iodu, v.v. Tuy nhiên, các este NHS là được ưu tiên.

Phản ứng kết hợp tốt hơn là được thực hiện trong một khoảng thời gian tương đối ngắn và ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Thông thường, khoảng thời gian đối với phản ứng kết hợp gồm 1 bước hoặc 2 bước sẽ nằm trong khoảng từ 1 đến 240 phút, tốt hơn là 5 đến 120 phút, tốt hơn nữa là 10 đến 60 phút. Nhiệt độ điển hình đối với phản ứng kết hợp sẽ nằm trong khoảng từ 0 đến 90 °C, tốt hơn là từ 15 đến 50 °C, tốt hơn nữa là từ 20 đến 40 °C. Khoảng 25 °C hoặc khoảng 38 °C là thích hợp.

Việc kết hợp chất tạo chelat octadentat với gốc hướng đích thường sẽ được thực hiện trong điều kiện không gây ảnh hưởng bất lợi (hoặc ít nhất là không gây ảnh hưởng không thể đảo ngược được) đến khả năng liên kết của gốc hướng đích. Do các chất gắn kết thường là các gốc trên cơ sở peptit hoặc protein, điều này đòi hỏi các điều kiện tương đối êm dịu để tránh biến tính hoặc mất cấu trúc bậc hai/bậc ba. Các điều kiện chứa nước (như được mô tả ở đây trong tất cả các trường hợp) sẽ được ưu tiên, và nó sẽ được mong muốn để tránh sự cực đại của độ pH và/hoặc phản ứng oxy hóa khử. Vì vậy bước b) có thể được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 10, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 9 và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4,5 đến 8. Các điều kiện mà trung hòa về mặt oxy hóa khử, hoặc khử rất nhẹ để tránh oxy hóa trong không khí có thể được mong muốn.

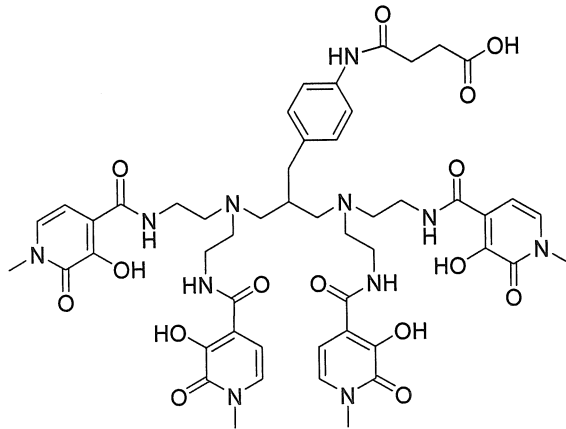
Chất tạo chelat hướng mô được ưu tiên có thể được sử dụng cho tất cả các khía cạnh của sáng chế là AGC0018 như được mô tả trong bản mô tả này. Phức hệ gồm AGC0018 với các ion ^{227}Th tạo thành một phương án được ưu tiên của phức hệ theo sáng chế và các chế phẩm, ứng dụng và phương pháp, v.v. tương ứng. Các phương án được ưu tiên khác có thể được sử dụng trong tất cả các khía cạnh của sáng chế bao gồm phức hệ ^{227}Th của AGC0019 được liên hợp với các gốc hướng mô (như được mô tả ở đây) bao gồm các kháng thể đơn dòng có ái lực gắn kết với HER2.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa bằng các ví dụ không giới hạn sau đây. Tất cả các hợp chất được nêu làm ví dụ trong phần ví dụ tạo thành các phương án được ưu tiên của sáng chế (bao gồm các hợp chất trung gian và các tiền chất được ưu tiên) và có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp theo khía cạnh bất kỳ mà ở đó ngữ cảnh cho phép.

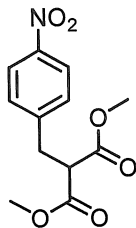
Ví dụ 1

Tổng hợp hợp chất có công thức (III)



Ví dụ 1.1

Tổng hợp dimetyl 2-(4-nitrobenzyl) malonat



Natri hydrua (60% thể phân tán, 11,55 g, 289 mmol) được tạo huyền phù trong 450 mL tetrahydrofuran (THF) ở 0 °C. Dimetyl malonat (40,0 mL, 350 mmol) được bổ sung nhỏ giọt trong khoảng 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở 0 °C. 4-Nitrobenzyl bromua (50,0 g, 231 mmol) được hòa tan trong 150 mL THF được bổ sung nhỏ giọt trong khoảng 30 phút ở 0 °C, sau đó là hai giờ ở nhiệt độ môi trường.

500 mL etyl axetat (EtOAc) và 250 mL NH_4Cl (dung dịch nước, bão hòa) được bổ sung trước khi dung dịch được lọc. Các pha được tách. Pha nước được chiết bằng 2*250 mL EtOAc. Kết hợp pha hữu cơ, rửa bằng 250 mL nước muối, làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm.

Bổ sung 300 mL heptan và 300 mL metyl tert-butyl ete (MTBE) vào phần còn lại và gia nhiệt đến 60°C. Lọc dung dịch thu được. Để dịch lọc trong tủ lạnh qua đêm

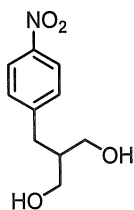
và lọc. Rửa bánh lọc bằng 200 mL heptan và làm khô trong điều kiện áp suất giảm, thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng nhờ.

Hiệu suất: 42,03 g, 157,3 mmol, 68%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 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).

Ví dụ 1.2

Tổng hợp 2-(4-Nitrobenzyl)propan-1,3-diol



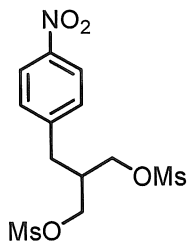
Hòa tan dimetyl 2-(4-nitrobenzyl) malonat (28,0 g, 104,8mmol) trong 560 mL THF ở 0°C . Bổ sung nhỏ giọt diisobutyl nhôm hydrua (DIBAL-H) (1M trong hexan, 420 mL, 420 mmol) ở 0°C trong khoảng 30 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong hai giờ ở 0°C .

Bổ sung nhỏ giọt 20 mL nước vào hỗn hợp phản ứng ở 0°C . Bổ sung nhỏ giọt 20 mL NaOH (dung dịch nước, 15%) vào hỗn hợp phản ứng ở 0°C , sau đó bổ sung nhỏ giọt 20 mL nước vào hỗn hợp phản ứng. Khuấy hỗn hợp ở 0°C trong 20 phút trước khi bổ sung khoảng 150g MgSO_4 . Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi lọc nó trên phễu Büchner. Rửa bánh lọc bằng 500 mL CH_3CN . Lấy bánh lọc ra và khuấy với 800 mL EtOAc và 200 mL MeOH trong khoảng 30 phút trước khi lọc dung dịch. Kết hợp dịch lọc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm.

DFC trên silic oxit bằng cách sử dụng gradient EtOAc trong heptan, sau đó bằng gradient MeOH trong EtOAc thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hiệu suất: 15,38 g, 72,8 mmol, 69%.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 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).

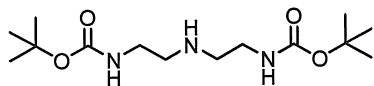
Ví dụ 1.3**Tổng hợp 2-(4-Nitrobenzyl)propan-1,3-diyl dimetansulfonat**

Hòa tan 2-(4-nitrobenzyl)propan-1,3-diol (15,3 g, 72,4 mmol) trong 150 mL CH_2Cl_2 ở 0°C . Bổ sung triethylamin (23 mL, 165 mmol), sau đó bổ sung nhỏ giọt metansulfonyl clorua (12 mL, 155 mmol) trong khoảng 15 phút, sau đó khuấy ở nhiệt độ môi trường trong một giờ.

Bổ sung 500 mL CH_2Cl_2 , và rửa hỗn hợp bằng 2*250 mL NaHCO_3 (dung dịch nước, bão hòa), 125 mL HCl (dung dịch nước, 0,1 M) và 250 mL nước muối. Làm khô pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 , lọc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm, thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu cam.

Hiệu suất: 25,80 g, 70,2 mmol, 97 %.

$^1\text{H-NMR}$ (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).

Ví dụ 1.4**Tổng hợp di-tert-butyl(azanediylbis(etan-2,1-diyl))dicarbamat**

Tạo huyền phù chứa imidazol (78,3g, 1,15 mol) trong 500 mL CH_2Cl_2 ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung từng phần di-tert-butyl dicacbonat (Boc_2O) (262,0 g, 1,2 mol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa hỗn hợp

phản ứng bằng 3*750 mL nước, làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và loại bỏ các chất bay hơi trong điều kiện áp suất giảm.

Hòa tan phần còn lại trong 250 mL toluen và bổ sung diethyltriamin (59,5 mL, 550 mmol) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong hai giờ ở 60 °C.

Bổ sung 1 L CH_2Cl_2 , và rửa pha hữu cơ bằng 2*250 mL nước. Làm khô pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 , lọc và làm giảm thể tích trong điều kiện áp suất giảm.

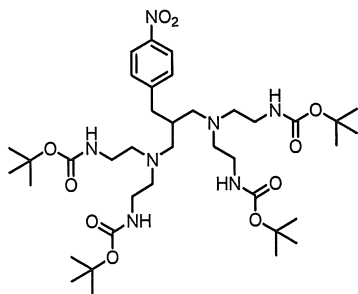
DFC trên oxit silic bằng cách sử dụng gradient gồm metanol (MeOH) trong CH_2Cl_2 với triethylamin thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn không màu.

Hiệu suất: 102 g, 336 mmol, 61 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1,41(s, 18H), 1,58(bs, 1H), 2,66-2,77(m, 4H), 3,13-3,26(m, 4H), 4,96(bs, 2H).

Ví dụ 1.5

Tổng hợp tetra-tert-butyl (((2-(4-nitrobenzyl)propan-1,3-diyl)bis(azantriyl))tetrakis(etan-2,1-diyl))tetracarbammat



Hòa tan 2-(4-nitrobenzyl)propan-1,3-diyl dimetansulfonat (26,0 g, 71 mmol) và di-tert-butyl(azandiylbis(etan-2,1-diyl))dicarbamat (76,0 g, 250 mmol) trong 700 mL axetonitril. Bổ sung N,N'-diisopropyletylamin (43 mL, 250 mmol) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 4 ngày ở điều kiện hồi lưu.

Loại bỏ các chất bay hơi trong điều kiện áp suất giảm.

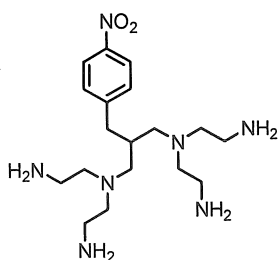
DFC trên silic oxit bằng cách sử dụng gradient EtOAc trong heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng bột rắn màu vàng nhạt.

Hiệu suất: 27,2 g, 34,8 mmol, 49 %.

$^1\text{H-NMR}$ (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).

Ví dụ 1.6

Tổng hợp $\text{N}^1, \text{N}^{1'}\text{-(2-(4-nitrobenzyl)propan-1,3-diyl)bis(N}^1\text{-(2-aminoethyl)etan-1,2-diamin)}$, AGC0020



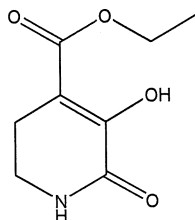
Hòa tan tetra-tert-butyl (((2-(4-nitrobenzyl)propan-1,3-diyl)bis(azanetriyl))tetrakis(etan-2,1-diyl))tetracarbammat (29,0 g, 37,1 mmol) trong 950mL MeOH và 50 mL nước. Bổ sung nhỏ giọt axetyl clorua (50 mL, 0,7 mol) vào trong khoảng 20 phút ở 30°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm.

Loại bỏ các chất bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và hòa tan phần còn lại trong 250 mL nước. Bổ sung 500 mL CH_2Cl_2 vào, sau đó bổ sung 175 mL NaOH (dung dịch nước, 5M, được bão hòa với NaCl). Tách riêng các pha, và chiết pha nước bằng 4*250mL CH_2Cl_2 . Kết hợp các pha hữu cơ, làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm, thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng dầu màu nâu đỏ nhớt.

Hiệu suất: 11,20 g, 29,3 mmol, 79 %. Độ tinh khiết (HPLC Fig. 9): 99,3%;

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): 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).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): 37,9, 38,5, 39,9, 58,0, 58,7, 123,7, 130,0, 146,5, 149,5

Ví dụ 1.7**Tổng hợp ethyl 5-hydroxy-6-oxo-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-carboxylat**

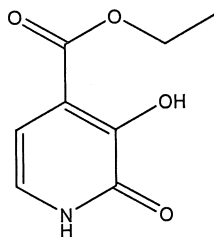
Hòa tan 2-pyrrolidinon (76 mL, 1 mol) và diethyl oxalat (140 mL, 1,03 mol) trong 1 L toluen ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung kali etoxit (EtOK) (24% trong EtOH, 415 mL, 1,06 mol) vào, và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 90°C.

Bổ sung từng phần 200 mL EtOH trong giờ đầu tiên của phản ứng do sự đặc lại của hỗn hợp phản ứng. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm và làm nguội đến nhiệt độ trong phòng. Bổ sung từ từ 210 mL HCl (5M, dung dịch nước) trong khi khuấy.

Bổ sung 200 mL nước muối và 200 mL toluen vào, và tách riêng các pha.

Chiết pha nước bằng 2x400 mL CHCl₃. Làm khô các pha hữu cơ kết hợp (Na₂SO₄), lọc và làm giảm thể tích trong chân không. Kết tinh lại phần còn lại từ EtOAc, thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hiệu suất: 132,7g, 0,72 mol, 72%.

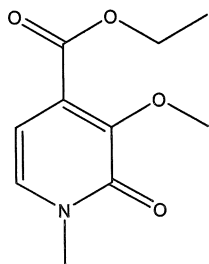
Ví dụ 1.8**Tổng hợp ethyl 3-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylat**

Hòa tan {ethyl 5-hydroxy-6-oxo-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-carboxylat} (23,00 g, 124,2 mmol) trong 150 mL p-xylene và bổ sung paladi trên cacbon (10%, 5,75 g). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ hồi lưu qua đêm. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 300 mL MeOH và lọc qua đệm Celite® thấp. Rửa đệm bằng 300 mL MeOH. Loại bỏ dung môi trong chân không, thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu nâu đỏ nhạt.

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

Ví dụ 1.9

Tổng hợp ethyl 3-metoxi-1-metyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylat



Hòa tan {ethyl 3-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylat} (119,2 g, 0,65 mol) trong 600 mL dimetyl sulfoxit (DMSO) và 1,8 L axeton ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung K₂CO₃ (179,7 g, 1,3 mol) vào. Bổ sung nhỏ giọt metyl iodua (MeI) (162 mL, 321 mmol) đã được hòa tan trong 600 mL axeton trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

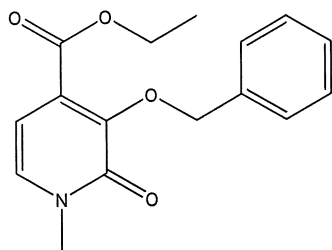
Khuấy hỗn hợp phản ứng trong hai giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng trước khi bổ sung MeI (162 mL, 2,6 mol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ hồi lưu qua đêm. Làm giảm thể tích hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm và bổ sung 2,5 L EtOAc vào.

Lọc hỗn hợp và làm giảm thể tích trong điều kiện áp suất giảm. Tinh chế bằng sắc ký nhanh kèm theo làm khô (sắc ký nhanh kèm theo làm khô - DFC) trên SiO₂ bằng cách sử dụng gradient EtOAc trong heptan thu được hợp chất nêu ở đề mục này.

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

Ví dụ 1.10

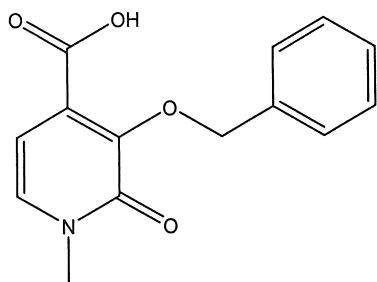
Tổng hợp ethyl 3-(benzyloxy)-1-metyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylat



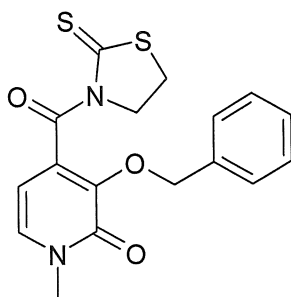
Hòa tan {ethyl 3-metoxyl-1-metyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylat} (5,93 g, 28,1 mmol) trong 80 mL diclormetan (DCM) ở -78°C và bổ sung nhỏ giọt BBr₃ (5,3 mL, 56,2 mmol) trong 20 mL DCM vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 1 giờ ở -78°C trước khi gia nhiệt phản ứng đến 0°C. Dập tắt phản ứng bằng cách bổ sung nhỏ giọt 25 mL tert-butyl metyl ete (tert-BuOMe) và 25 mL MeOH. Loại bỏ các chất bay hơi trong điều kiện chân không. Hòa tan phần còn lại trong 90 mL DCM và 10 mL MeOH và lọc qua đệm SiO₂ thấp. Rửa đệm bằng 200 mL MeOH 10% trong DCM. Loại bỏ các chất bay hơi trong điều kiện chân không. Hòa tan phần còn lại trong 400 mL axeton. Bổ sung K₂CO₃ (11,65 g, 84,3 mmol), KI (1,39 g, 8,4 mmol) và benzyl bromua (BnBr) (9,2 mL, 84,3 mmol) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ hồi lưu qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 200 mL EtOAc và rửa bằng 3x50 mL nước và 50 mL nước muối. Pha nước kết hợp được chiết bằng 2x50 mL EtOAc. Làm khô các pha hữu cơ kết hợp (Na₂SO₄), lọc và loại bỏ các chất bay hơi trong chân không và tinh chế bằng sắc ký nhanh kèm theo làm khô trên SiO₂ sử dụng EtOAc (40 – 70%) trong heptan làm chất rửa giải để thu được hợp chất nêu ở đề mục này.

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

Ví dụ 1.11

Tổng hợp axit 3-(benzyloxy)-1-metyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylic

Hòa tan {etyl 3-(benzyloxy)-1-metyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylat} (27,90 g, 97,1 mmol) trong 250 mL MeOH và bổ sung 60 mL NaOH (5M, dung dịch nước) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trước khi cô đặc hỗn hợp phản ứng đến khoảng 1/3 trong điều kiện chân không. Pha loãng phần còn lại bằng 150 mL nước và axit hóa đến độ pH 2 bằng cách sử dụng hydro clorua (HCl) (5M, dung dịch nước). Lọc kết tủa và làm khô trong chân không, thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn không màu. Hiệu suất: 22,52g, 86,9 mmol, 89%.

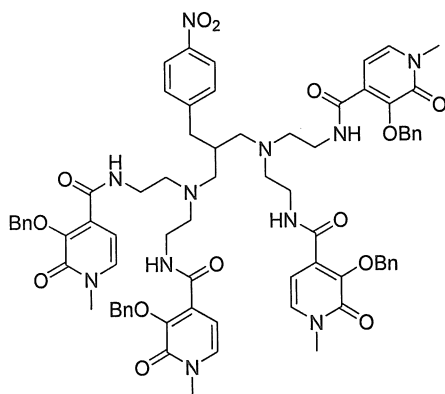
Ví dụ 1.12**Tổng hợp 3-(benzyloxy)-1-metyl-4-(2-thioxothiazolidin-3-cacbonyl)pyridin-2(1H)-on (AGC0021)**

Hòa tan {axit 3-(benzyloxy)-1-metyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-4-carboxylic} (3,84 g, 14,8 mmol), 4-dimethylaminopyridin (DMAP) (196 mg, 1,6 mmol) và 2-thiazolin-2-thiol (1,94 g, 16,3 mmol) trong 50 mL DCM. Bổ sung N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (3,36g, 16,3 mmol) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Lọc hỗn hợp phản ứng, rửa chất rắn bằng DCM và làm giảm thể tích dịch

lọc trong điều kiện chân không. Kết tinh lại chất rắn màu vàng thu được từ isopropanol/DCM, thu được AGC0021. Hiệu suất: 4,65 g, 12,9 mmol, 87 %. MS(ESI, pos): 383[M+Na]⁺, 743[2M+Na]⁺

Ví dụ 1.13

Tổng hợp hợp chất AGC0023



AGC0023

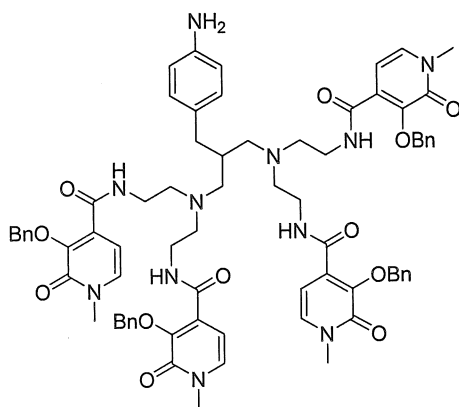
Hòa tan AGC0020 (8,98 g; 23,5 mmol) trong CH₂Cl₂ (600 mL). Bổ sung AGC0021 (37,43 g; 103,8 mmol) vào. Khuấy phản ứng trong 20 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm.

DFC trên SiO₂ bằng cách sử dụng gradient gồm metanol trong hỗn hợp gồm EtOAc và CH₂Cl₂ ở tỷ lệ 1:1 thu được AGC0023 ở dạng bột rắn.

Hiệu suất trung bình: 26,95 g, 20,0 mmol, 85 %.

Ví dụ 1.14

Tổng hợp hợp chất AGC0024



AGC0024

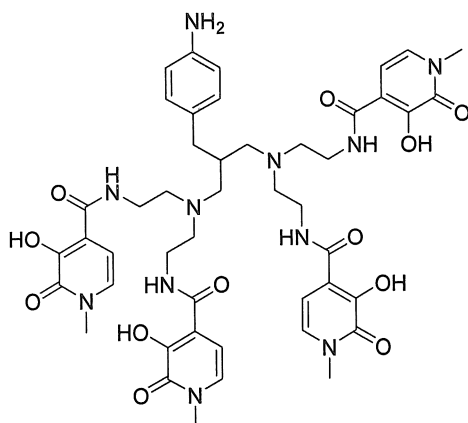
Hòa tan AGC0023 (26,95 g; 20,0 mmol) trong etanol (EtOH) (675 mL). Bổ sung sắt (20,76 g; 0,37 mol) và NH_4Cl (26,99 g; 0,50 mol) vào, sau đó bổ sung nước (67 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 70 °C trong hai giờ. Bổ sung thêm sắt (6,75 g; 121 mmol) vào, và khuấy hỗn hợp phản ứng trong một giờ ở 74°C. Bổ sung thêm sắt (6,76 g; 121 mmol) vào, và khuấy hỗn hợp phản ứng trong một giờ ở 74°C. Làm nguội hỗn hợp phản ứng trước khi làm giảm thể tích hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm.

DFC trên SiO_2 bằng cách sử dụng gradient gồm metanol trong CH_2Cl_2 thu được AGC0024 ở dạng bột rắn.

Hiệu suất 18,64 g, 14,2 mmol, 71 %.

Ví dụ 1.15

Tổng hợp hợp chất AGC0025

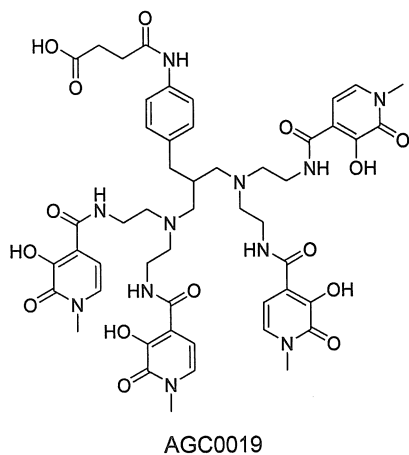


AGC0025

Hòa tan AGC0024 (18,64 g; 14,2 mmol) trong CH₂Cl₂ (750 mL) và làm lạnh đến 0°C. Bổ sung BBr₃ (50 g; 0,20 mol) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 75 phút. Dập tắt phản ứng bằng cách bổ sung từ từ metanol (MeOH) (130 mL) vào đồng thời khuấy ở 0°C. Loại bỏ các chất bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung HCl (1,25M trong EtOH, 320 mL) vào phần còn lại. Tiếp theo, xoay bình thót cổ bằng cách sử dụng thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở áp suất khí quyển và nhiệt độ môi trường trong 15 phút trước khi loại bỏ các chất bay hơi trong điều kiện áp suất giảm.

DFC trên silic oxit C₁₈ không được gắn mũ ở cuối bằng cách sử dụng gradient gồm axetonitril (ACN) trong nước tạo ra AGC0025 ở dạng chất rắn trong suốt màu cam nhạt.

Hiệu suất 13,27 g, 13,9 mmol, 98 %.

Ví dụ 1.16**Tổng hợp hợp chất AGC0019**

Hòa tan AGC0025 (10,63 g; 11,1 mmol) trong ACN (204 mL) và nước (61 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung anhydrit suxinic (2,17 g; 21,7 mmol) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng trong hai giờ. Làm giảm thể tích hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm. DFC trên silic oxit C₁₈ không được gắn mũ ở cuối bằng cách sử dụng gradient gồm ACN trong nước, thu được chất rắn trong suốt màu xanh lá cây.

Hòa tan chất rắn này trong MeOH (62 mL) và nước (10,6 mL) ở 40°C. Bổ sung nhỏ giọt dung dịch này vào EtOAc (750 mL) trong điều kiện siêu âm. Lọc kết tủa, rửa bằng EtOAc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm, thu được AGC0019 ở dạng chất rắn màu trắng nhờ nhuộm vết xanh lá cây.

Hiệu suất: 9,20 g, 8,7 mmol, 78 %. H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆).

Ví dụ 2**Tách thori-227 tinh khiết**

Tách Thori-227 từ nguồn sản xuất actini-227. Actini-227 được sản xuất nhờ bức xạ nơ-tron nhiệt của Radi-226 sau đó nhờ sự phân rã Radi-227 (t_{1/2}=42,2 m) thành Actini-227. Thori-227 được giữ lại một cách chọn lọc từ hỗn hợp phân rã Actini-227 trong dung dịch HNO₃ 8 M bằng sắc ký trao đổi anion. Sử dụng cột có đường kính trong là 2 mm, chiều dài 30 mm, chứa 70 mg nhựa AG[®]1-X8 (cỡ 200–400, dạng

nitrat). Sau khi Actini-227, Radi-223 và các đồng vị con được rửa giải từ cột, chiết Thori-227 từ cột bằng dung dịch HCl 12M. Làm bay hơi đến khô dung dịch rửa giải chứa Thori-227 và tái tạo huyền phù phần còn lại trong dung dịch HCl 0,01M trước bước đánh dấu.

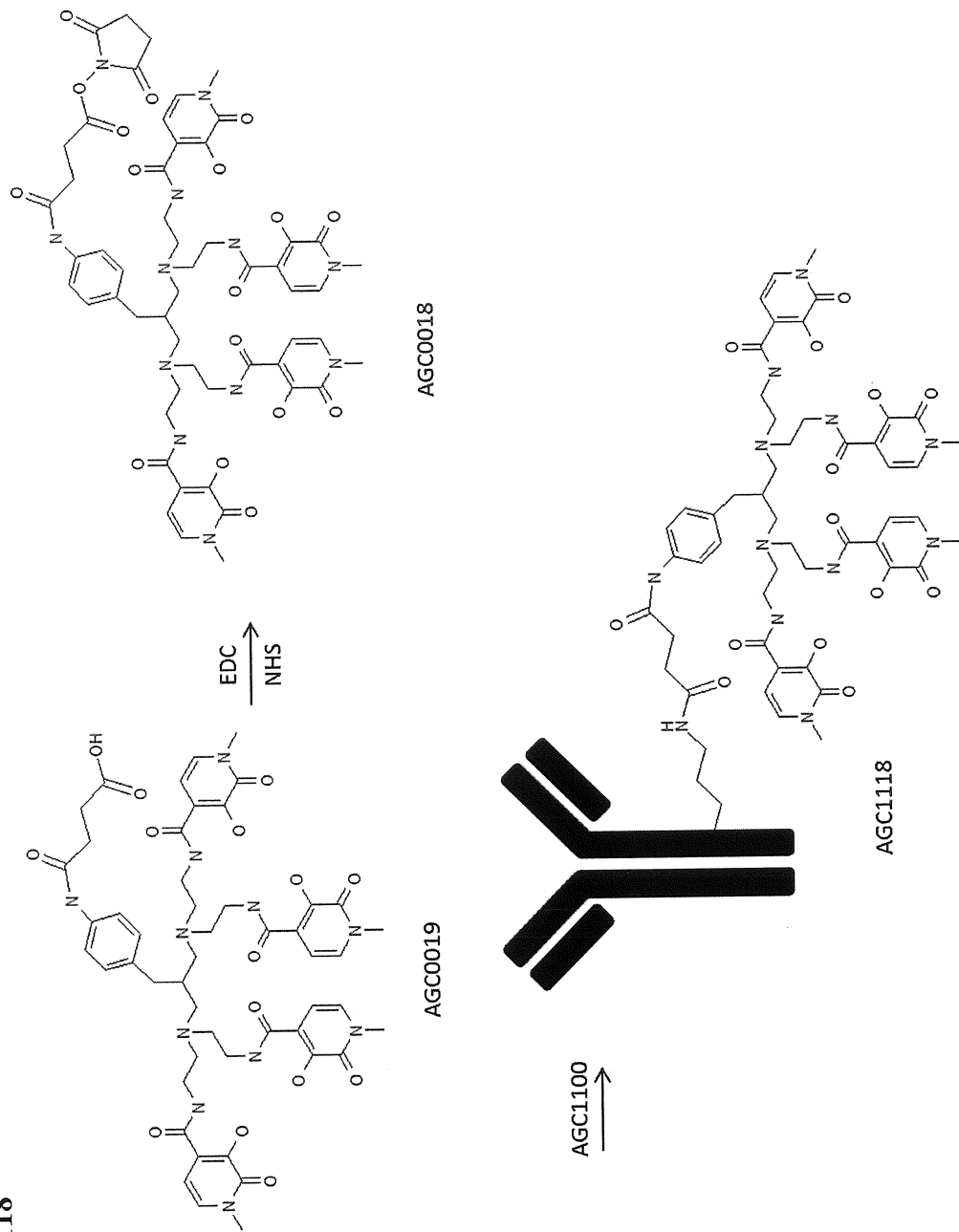
Ví dụ 3

Ví dụ 3.1

Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng HER2 (AGC1100)

Trình tự ADN chứa các trình tự axit amin đối với IgG theo sáng chế được tổng hợp ở Geneart/Life Technologies (Regensburg, Germany) và được tạo dòng vào vector biểu hiện thích hợp. Tất cả các gen được tối ưu hóa codon để biểu hiện CHO. IgG được biểu hiện tạm thời ở các tế bào HEK293 6E bằng cách sử dụng hệ biểu hiện bởi NRC Canada (Durocher et al., Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):E9) hoặc sau khi chuyển nhiễm ổn định tế bào CHO-K1. Tinh chế kháng thể nhờ sắc ký ái lực Protein A và sau đó nhờ sắc ký loại trừ theo kích thước như được mô tả trước đây (Hristodorov et al., Mol Biotechnol (2013) 53:326–335).

Ví dụ 3.2 Kết hợp mAb AGC1100 với chất tạo chelat AGC0019 (hợp chất có công thức (VIII)) để thu được thể liên hợp AGC1118



Trước khi liên hợp, bổ sung dung dịch đệm phosphat có độ pH 7,5 vào dung dịch kháng thể (AGC1100) để gia tăng khả năng đệm của dung dịch. Lượng AGC1100 (mAb) trong bình phản ứng được xác định.

Bổ sung 11% dung dịch đệm phosphat 1M có độ pH 7,4 vào trastuzumab trong PBS.

Chất tạo chelat AGC0019 được hòa tan trong hỗn hợp DMA : dung dịch đệm MES 0,1M ở tỷ lệ 1:1, độ pH 5,4. Hòa tan NHS và EDC trong dung dịch đệm MES 0,1M có độ pH 5,4.

Điều chế dung dịch chứa chất tạo chelat / N-hydroxysuxinimit (NHS) / 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimite (EDC) với tỷ lệ phân tử gam 1 / 1 / 3 để hoạt hóa chất tạo chelat.

Để liên hợp với kháng thể, tỷ lệ phân tử gam của chất tạo chelat đã hoạt hóa và mAb là 8/8/25/1 (chất tạo chelat/NHS/EDC/mAb). Sau 20-40 phút, phản ứng liên hợp được dừng bằng 12% thể tích axit xitric 0,3M để điều chỉnh độ pH đến 5,5.

Tinh chế và trao đổi dung dịch đệm của thể liên hợp AGC0118 vào 30 mM Citrate pH 5,5, 154 mM NaCl được thực hiện bằng cách lọc qua gel trên cột Superdex 200 (GE Healthcare) được gắn với hệ ÄKTA (GE Healthcare). Nồng độ protein ở bước sóng hấp thụ 280 nm được đo trước khi sản phẩm được điều chế với dung dịch đệm (để thu được 2,5 mg/mL AGC0118 trong 30 mM xitrat, 154mM NaCl, 2mM EDTA, 2mg/mL pABA, pH 5,5). Cuối cùng, lọc dung dịch qua thiết bị lọc cỡ 0,2 µm vào các chai vô trùng trước khi bảo quản.

Ví dụ 3.3

Điều chế liên ^{227}Th -AGC0118 để tiêm

Việc đánh dấu được thực hiện như đã mô tả trước đây:

Lọ chứa 20 MBq mangan thori-227 clorua được hòa tan trong 2 ml dung dịch HNO₃ 8M và để yên trong 15 phút trước khi rút dung dịch để đưa vào cột trao đổi anion để loại bỏ radi-223 mà được tạo thành qua thời gian. Cột được rửa bằng 3 ml HNO₃ 8M và 1 ml nước trước khi pha loãng thori-227 bằng 3 ml HCl 3M. Hoạt tính

của thori-227 sau khi đã rửa giải được xác định và liều 10 MBq được chuyển vào một lọ thủy tinh rộng có dung tích 10 ml. Tiếp theo, axit được làm bay hơi bằng cách sử dụng bơm chân không và đưa lọ vào buồng gia nhiệt (được đặt ở 120°C) trong 30-60 phút. Sau khi đạt tới nhiệt độ trong phòng, 6 ml thể liên hợp AGC0118 2,5 mg/ml được bổ sung để đánh dấu phóng xạ. Lọ được trộn nhẹ nhàng và để yên trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, dung dịch được lọc vào lọ vô trùng và rút mẫu ra để phân tích iTLC nhằm xác định RCP trước khi sử dụng.

Ví dụ 3.4

Tính độc tế bào của ^{227}Th -AGC0118 đối với SKOV-3 với hoạt tính tổng khác nhau

Tính độc tế bào được kiểm tra đối với các liều lượng ^{227}Th -AGC0118 khác nhau bằng cách thay đổi hoạt tính tổng được bổ sung vào các lỗ trong khoảng thời gian ủ là 4 giờ. Tế bào SKOV-3 được cấy ở mật độ 10000 tế bào trên một lỗ trong đĩa 96 lỗ một ngày trước khi thí nghiệm. Dãy tổng hoạt tính 5, 10, 20 và 40 kBq/ml của ^{227}Th -AGC0118 đã được tạo chelat, ở hoạt tính đặc hiệu 20 kBq/ μg , được bổ sung vào các tế bào ở ngày 1. ^{227}Th -AGC0118 không gắn kết còn lại được loại bỏ bằng pipet đa kênh, sau đó bằng cách rửa tế bào một lần bằng môi trường và tiếp theo là môi trường nuôi cấy sạch, sau khi kết thúc thời gian ủ. Các tế bào SKOV-3 được nuôi cấy trong môi trường Mc-Coy với 10 % FBS và 1 % Penicillin/Streptomycin. Môi trường không chứa huyết thanh thay cho môi trường nuôi cấy trong suốt quá trình ủ với ^{227}Th -AGC0118. Ở ngày thứ tư, thử nghiệm nhấp nháy xác định khả năng sống sót của tế bào CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) được sử dụng để xác định khả năng sống sót của tế bào. Xem Fig. 6.

Ví dụ 4

So sánh độ ổn định của thể liên hợp được liên kết amit và isothioxyanat

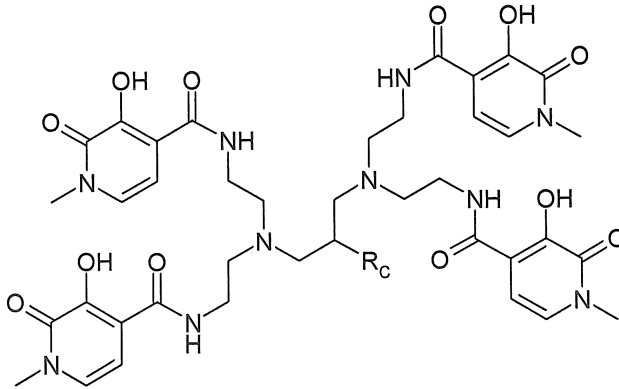
AGC1118 và thể liên hợp tương ứng có gốc kết hợp isothioxyanat (AGC1115) được bảo quản trong dung dịch nước ở 40 °C trong 11 ngày. Các mẫu được lấy mẫu định kỳ.

Có thể nhận thấy rằng không thấy sự giảm nồng độ thể liên hợp ở mức có thể xác định được đối với thể liên hợp được liên kết với amit. Ngược lại, thể liên hợp isothioxyanat giảm.

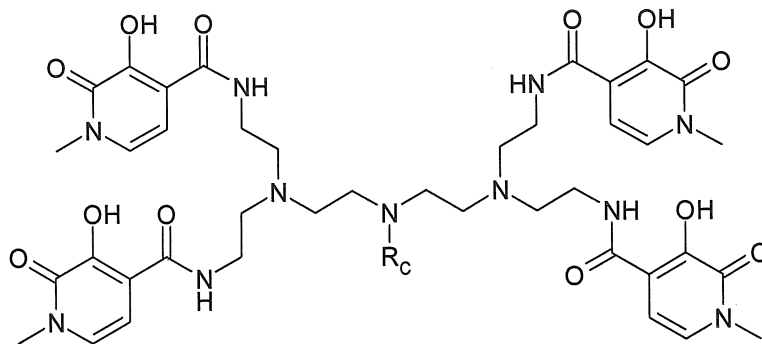
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra phức hợp thori hướng mô, phương pháp này bao gồm:

a) tạo ra chất tạo chelat octadentat có công thức (I) hoặc (II):

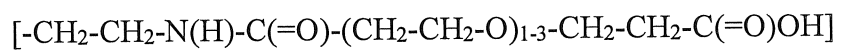
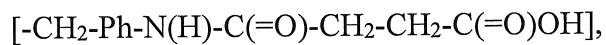


(I)

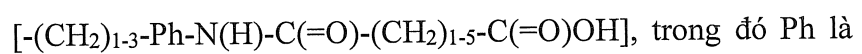


(II)

trong đó R_C là gốc liên kết có tận cùng là gốc axit carboxylic, như



hoặc



trong đó Ph là nhóm phenylen, tốt hơn là nhóm para-phenylen,

- b) kết hợp chất tạo chelat octadentat đã nêu với gốc hướng mô bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1:

Chuỗi nhẹ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKA
PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QHYYTTPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO. 1)

và một chuỗi peptit có mức tương đồng/giống hệt về mặt trình tự ít nhất là 80% với trình tự đầy đủ của trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ 2 đến 6 sau đây:

Chuỗi nặng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK
GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSVNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREEQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK
GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK
 GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
 RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 4)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK
 GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
 RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK
GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREENYQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 6)

nhờ đó tạo ra chất tạo chelat hướng mô; và

c) cho chất tạo chelat hướng mô đã nêu tiếp xúc với dung dịch nước chứa ion 4^+ của chất đồng vị thori phát ra tia alpha ^{227}Th .

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước b) được tiến hành trong dung dịch nước.
3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước b) được tiến hành trong dung dịch nước ở độ pH nằm trong khoảng 4 đến 9.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước b) được tiến hành trong khoảng 15 đến 50°C trong 5 đến 120 phút.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước c) được tiến hành trong khoảng 15 đến 50°C trong 1 đến 60 phút.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó R_c là $[-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{-para-phenylen-N(H)-C(=O)-}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{-C(=O)OH}]$, tốt hơn là $[-(\text{CH}_2)\text{-para-phenylen-N(H)-C(=O)-}(\text{CH}_2)_2\text{-C(=O)OH}]$.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó gốc hướng mô đã nêu bao gồm một chuỗi peptit có trình tự giống hệt với trình tự 1:

Chuỗi nhẹ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA
PKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
QHYYTPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS
TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO. 1)

và một chuỗi peptit có mức tương tự về trình tự là 98% hoặc lớn hơn hoặc giống hệt với trình tự 2:

Chuỗi nặng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK
GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL
RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO. 2)

8. Phức hợp thori hướng mô được tạo thành hoặc có thể tạo thành bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

9. Dược phẩm chứa ít nhất một phức hợp thori hướng mô như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này còn chứa chất đệm xitrat.

11. Dược phẩm theo điểm 9 hoặc điểm 10, trong đó dược phẩm này còn chứa axit p-aminobutyric (PABA), và tùy ý EDTA và/hoặc ít nhất một polysorbat.

12. Kit chứa:

- i) chất tạo chelat octadentat như được xác định trong điểm 1 hoặc 6;
- ii) ít nhất một gốc hướng mô như được xác định trong điểm 1 hoặc 7;
- iii) ít nhất một chất phản ứng kết hợp amit; và
- iv) tùy ý và tốt hơn là nuclit phóng xạ thori phát tia alpha, như ^{227}Th .

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Bayer Pharma AG

<120> PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PHỨC HỢP THORI HƯỚNG MÔ, PHỨC HỢP THORI HƯỚNG MÔ ĐƯỢC TẠO THÀNH HOẶC CÓ THỂ TẠO THÀNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY, ĐƯỢC PHẪM CHỨA PHỨC HỢP NÀY VÀ KIT LIÊN QUAN

<130> BHC163022 EP

<160> 6

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala
			20					25				30			
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35				40					45				
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					
Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70				75					80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro
				85				90					95		

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100                      105                      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115                      120                      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130                      135                      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                      150                      155                      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165                      170                      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180                      185                      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195                      200                      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng trình tự số 2

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
      20          25          30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35          40          45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
      50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

```

65					70						75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
		115					120					125				
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130					135				140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
145					150				155					160		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
			165					170					175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
		180						185				190				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
	195					200					205					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210					215				220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
225				230					235					240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
			245					250					255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
	260						265					270				
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
	275					280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290					295				300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305				310					315				320			
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
			325					330				335				
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
		340					345				350					

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 3

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng trình tự số 3

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

				85					90					95					
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln				
			100					105					110						
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val				
		115					120					125							
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala				
	130					135					140								
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser				
145					150				155						160				
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val				
			165					170					175						
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro				
		180						185				190							
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys				
	195						200					205							
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp				
	210					215				220									
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly				
225				230					235					240					
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile				
			245					250					255						
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu				
	260						265						270						
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His				
	275					280					285								
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg				
	290					295					300								
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys				
305				310					315					320					
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu				
			325					330					335						
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr				
	340						345					350							
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu				
	355						360					365							

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 4

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng trình tự số 4

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

			100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
		115						120				125				
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130						135				140					
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
145					150					155					160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165					170					175		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
			180					185					190			
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
		195					200					205				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210						215				220					
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245					250					255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
		260						265					270			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275					280					285				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290					295					300					
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
				325					330					335		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
		340						345					350			
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
		355					360					365				
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	370					375					380					

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 5
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng trình tự số 4

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125																	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala				
130	135	140																	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser				
145	150	155	160																
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val				
	165	170	175																
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro				
	180	185	190																
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys				
	195	200	205																
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp				
	210	215	220																
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly				
225	230	235	240																
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile				
	245	250	255																
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu				
	260	265	270																
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His				
	275	280	285																
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg				
	290	295	300																
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys				
305	310	315	320																
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu				
	325	330	335																
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr				
	340	345	350																
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu				
	355	360	365																
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp				
	370	375	380																
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val				
385	390	395	400																

[illegible]

```
<210> 6
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>

<223> Chuỗi năng trình tự số 6

```

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
          20          25          30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
          115          120          125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

```

130		135		140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser				
145		150		155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val				
	165		170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro				
	180		185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys				
	195		200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp				
	210		215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly				
225		230		235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile				
	245		250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu				
	260		265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His				
	275		280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg				
	290		295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
305		310		315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu				
	325		330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
	340		345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
	355		360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
	370		375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
385		390		395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp				
	405		410	415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly