



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

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

(11)



1-0045220

A61K 39/395; A61K 47/54; A61K (13) B

47/65; A61K 47/68; G01N 33/574;

(51)^{2020.01} A61K 51/10; A61P 35/00; C07K 16/30;
C12N 15/13; G01N 33/53; A61K 47/52;
A61K 49/16

(21) 1-2021-04789

(22) 06/01/2020

(86) PCT/JP2020/000036 06/01/2020

(87) WO2020/145227 16/07/2020

(30) 2019-000530 07/01/2019 JP; 2019-206560 14/11/2019 JP

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/10/2021 403A

(71) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)

5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8411, Japan

(72) AKAIWA, Michinori (JP); ISHIDA, Junya (JP); TOYA, Hiroki (JP); ASANO, Toru (JP); YOSHIKAWA, Tomoaki (JP); SANO, Yorikata (JP); SUGANO, Yukihiro (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) THẺ TIẾP HỢP CHỨA PHỐI TỬ, CHẾ PHẨM CHẨN ĐOÁN VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA THẺ TIẾP HỢP NÀY

(21) 1-2021-04789

(57) Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa phối tử, thành phần đệm, và phân tử liên kết peptit hữu ích đối với thuốc chẩn đoán in-vivo và phép xạ trị bên trong, sử dụng mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người mà hoạt tính gắn kết của nó không bị suy yếu thậm chí bằng cách đánh dấu với kim loại, thuốc nhuộm huỳnh quang, hoặc tương tự. Thể tiếp hợp chứa DOTA 3 nhánh, thành phần đệm đặc hiệu, phân tử liên kết peptit đặc hiệu, và phân tử sinh học bao gồm mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người, trong đó hoạt tính gắn kết của chúng không bị suy yếu thậm chí bằng cách đánh dấu với kim loại, thuốc nhuộm huỳnh quang, hoặc tương tự, có thể được sử dụng làm chế phẩm chẩn đoán và/hoặc dược phẩm. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chẩn đoán và dược phẩm chứa thể tiếp hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người hoặc mảnh Fab của kháng thể MUC1 người và phổi tử. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chẩn đoán và/hoặc dược phẩm chứa thể tiếp hợp, phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư sử dụng thể tiếp hợp, và tương tự. Hơn nữa, thể tiếp hợp chứa phổi tử, thành phần đệm, phần tử liên kết peptit, và phân tử sinh học, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc dược phẩm chứa thể tiếp hợp, phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến phân tử sinh học sử dụng thể tiếp hợp, và tương tự. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa phức hợp được tạo ra từ phổi tử và kim loại và mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người hoặc mảnh Fab của kháng thể MUC1 người. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa phức hợp, thành phần đệm, phần tử liên kết peptit, và phân tử sinh học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CEA (Carcinoembryonic antigen - kháng nguyên ung thư phôi) hoặc CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule - phân tử bám dính tế bào liên quan đến kháng nguyên ung thư phôi) là dấu chuẩn khối u được phát hiện vào năm 1965 (J. Exp. Med.;1965;121:439-462, PNAS;1969;64:161-167), và 23 phân tử liên quan đến CEA đã được nhận diện cho đến nay (BioMed Central Biology;2010;8:12-33). Trong số chúng, CEACAM5 hiếm khi được biểu hiện ở các mô bình thường, nhưng lại được biểu hiện ở ống tiêu hóa phôi thai và bệnh ung thư trực tràng (BBA;1990;1032:177-189, J. Clin. Mol. Pathol.;1999;52:174-178). Ngoài ra, CEACAM5 được biết là cũng được biểu hiện ở bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, và

bệnh ung thư tuyến giáp (Diagn. Cytopathol.; 1993;9:377-382, Cancer Res.; 1990; 50:6987-6994, Histopathology; 2000; 37:530-535).

Nồng độ của CEACAM5 trong máu cao hơn ở bệnh nhân ung thư trực tràng so với ở đối tượng khỏe mạnh (J. Exp. Med.;1965;121:439-462), và CEACAM5 được sử dụng làm dấu chuẩn khối u. Trong nghiên cứu mô học của các bệnh nhân ung thư trực tràng, CEACAM5 được biểu hiện cao ở 90% mô hoặc lớn hơn (British J. Cancer; 2013; 108:662-667).

Sự di căn sớm của bệnh ung thư trực tràng nằm ở gan, và do đó tỷ lệ tái phát có thể được giảm nếu di căn gan có thể được phát hiện và được điều trị ở giai đoạn sớm (Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.;2017;3:163-173).

Mucin 1 (Mucin 1: MUC1) là glycoprotein liên kết màng được biểu hiện ở phía khoang tế bào biểu mô cấu thành nên biểu mô của tuyến vú, khí quản, ống tiêu hóa, và tương tự (Nat. Rev. Cancer, 2004 Jan;4(1):45-60). MUC1 được biểu hiện quá mức trong các tế bào ung thư của bệnh ung thư vú (Mod. Pathol., 2005 Oct;18(10):1295-304), bệnh ung thư phổi (Hum. Pathol., 2008 Jan;39(1):126-36), bệnh ung thư trực tràng (Int. J. Oncol., 2000 Jan;16(1):55-64), bệnh ung thư bàng quang (PLoS One, 2014 Mar; 9(3):e92742), bệnh ung thư da (Histopathology, 2000, Sep; 37(3):218-23), bệnh ung thư tuyến giáp; (J. Pathol., 2003 Jul;200(3):357-69.), bệnh ung thư dạ dày (J. Pathol., 2000 Mar;190(4):437-43), bệnh ung thư tuyến tụy (Int. J. Oncol., 2004 Jan;24(1):107-13), bệnh ung thư thận (Mod. Pathol., 2004 Feb;17(2):180-8), bệnh ung thư buồng trứng (Gynecol. Oncol., 2007 Jun;105(3):695-702), bệnh ung thư cổ (Am. J. Clin. Pathol., 2004 Jul;122(1):61-9), và tương tự, và MUC1 là hữu ích làm phân tử đích để phát hiện các tổn thương ung thư (Nat. Rev. Cancer, 2004 Jan;4(1):45-60, Pathol. Res. Pract., 2010 Aug;206(8):585-9).

MUC1 được glycosyl hóa O ở threonin 9 của HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA (SEQ ID NO: 19 trong phần danh mục trình tự của đơn sáng chế này), là trình tự lặp tiếp đôi gồm 20 axit amin có mặt ở miền ngoại bào. Đã biết rằng quá trình O-glycosyl hóa này là không hoàn toàn ở tế bào ung thư, và quá trình O-glycosyl hóa như T (Gal β 1-

3GalNAc α 1-O-Ser/Thr), Tn (GalNAc α 1-O-Ser/Thr), và 2,3ST (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr) diễn ra theo cách đặc hiệu ung thư (PTL 1 và NPL 1). MUC1 ở các mô bình thường không trải qua quá trình O-glycosyl hóa đặc hiệu ung thư, MUC1 đặc hiệu ung thư ở người là đặc biệt hữu ích làm phân tử đích để điều trị các bệnh ung thư khác nhau ở người. Đối với kháng thể MUC1 đặc hiệu ung thư kháng người, ví dụ, kháng thể 1B2 (PTL 1), kháng thể PankoMab (NPL 2), và kháng thể 5E5 (PTL 2) là đã biết. Trong số các kháng thể này, kháng thể 1B2 được thông báo là có tính đặc hiệu cao hơn với MUC1 đặc hiệu bệnh ung thư ở người so với kháng thể PankoMab (PTL 1).

CT (computed tomography - chụp cắt lớp vi tính), MRI (nuclear magnetic resonance imaging - chụp cộng hưởng từ hạt nhân), và FDG-PET (Fluorodeoxyglucoza-positron emission tomography - chụp cắt lớp phát positron flodeoxyglucoza) được sử dụng để chẩn đoán di căn gan. Độ nhạy phát hiện của CT, MRI, và FDG-PET lần lượt là 74,4, 80,3, và 81,4%, và đối với khối u kích thước 1 cm hoặc nhỏ hơn, độ nhạy phát hiện được giảm xuống 47,3% đối với CT và 60,2% đối với MRI. (Radiology; 2010;257:674-684). MRI tăng cường phản quang đặc hiệu gan cũng được sử dụng, và độ nhạy phát hiện của nó là 29 đến 38% đối với khối u kích thước 1 cm hoặc nhỏ hơn (Radiology; 2005;237:89-98).

Các tác nhân chống ung thư và các kháng thể gắn kết với các chất đồng vị phóng xạ kim loại được sử dụng để chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư. Việc hướng đích sử dụng kháng thể có tính đặc hiệu cao đối với các tế bào khối u và gây ra ít tác dụng phụ. Cho đến nay, một vài kháng thể đơn dòng được đánh dấu chất đồng vị phóng xạ kim loại đã được ứng dụng trên lâm sàng trong việc chẩn đoán và điều trị (Cancer Control;2012;19:196-203).

Mặt khác, các kháng thể thường có thời gian bán thải dài trong máu, và sau khi chúng được dùng cho cơ thể, thì mất từ 4 ngày đến 5 ngày để đạt được tỷ lệ khối u trên máu mà đem lại tín hiệu đủ để quan sát bệnh ung thư (Clin. Pharmacol. Ther.; 2010;87:586-592). Ngoài ra, vùng Fc của kháng thể tạo ra tác dụng dược lý của tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC)

hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC) (Glycoconj. J.;2013;30:227-236, Curr. Opin. Biotechnol.;2002;13:609-614). Ngoài ra, các kháng thể được chuyển hóa trong gan, và do đó chúng được tích lũy cao trong gan không kể đích, nhưng sự di căn sớm của bệnh ung thư trực tràng lại nằm ở gan, và do đó khó để phát hiện các tổn thương của sự di căn gan sử dụng kháng thể (Clin. Pharmacol. Ther.;2010;87:586-592).

Các mảnh kháng thể tái tổ hợp có khối lượng phân tử nhỏ như Fab, scFv, và kháng thể kép có tính thấm mô cao và dễ bị tổn thương, và có thể được kỳ vọng để sản xuất ở mức chi phí thấp sử dụng hệ thống biểu hiện với *Escherichia coli* hoặc nấm men và do đó chúng được sử dụng làm các kháng thể để điều trị, trong khi đó chúng được đặc trưng bởi thời gian bán thải ngắn trong máu và được bài tiết bởi thận, và do đó chúng được thông báo là được sử dụng làm các thuốc chẩn đoán (Nat. Biotechnol.; 2005;23:1126-1136).

Kháng thể CEACAM5 kháng người đã được ứng dụng làm thuốc chẩn đoán, M5A (PTL 3), là kháng thể được làm giống như của người của kháng thể đơn dòng của chuột T84.66, là đã biết. Đối với M5A được đánh dấu bằng ^{64}Cu , trong thử nghiệm sử dụng chuột có tế bào khối u được cấy ghép dưới da, được thông báo rằng cần 22 giờ hoặc lâu hơn sau khi dùng để thu được hình ảnh PET tốt (NPL 3), và ngoài ra, trong thử nghiệm sử dụng mô hình trên chuột bị di căn gan, đã có thông báo rằng việc hấp thu vào các mô bình thường của gan và việc hấp thu vào các vị trí gan tổn thương đều mất khoảng 3 giờ sau khi dùng và có sự khác biệt đáng kể sau 24 giờ (NPL 4).

Đối với mảnh kháng thể CEACAM5 kháng người, đã có thông báo rằng CEA-Scan, là kháng thể đơn dòng của chuột NP-4 Fab' được đánh dấu bằng $^{99\text{m}}\text{Tc}$, có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư trực tràng (NPL 5). Tuy nhiên, mức hấp thu CEA-Scan vào các vị trí tổn thương không vượt quá mức hấp thu vào gan bình thường, và độ nhạy phát hiện của di căn gan là thấp hơn so với của FDG-PET (NPL 6). CEA-Scan đã được FDA phê chuẩn làm thuốc chẩn đoán đối với bệnh ung thư trực tràng vào năm 1999, nhưng không còn được bán (NPL 7).

DOTA (axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic) có kết quả lâm sàng và được sử dụng rộng rãi làm chất chelat hóa đối với kim loại có hoạt tính phóng xạ. Trong những năm gần đây, một nghiên cứu đã thông báo rằng việc đánh dấu kim loại được tiến hành bằng cách sử dụng DOTA, sau đó gắn kết với peptit và kháng thể và hướng đích (NPL 8).

Trong việc điều trị bệnh ung thư, đã có thông báo rằng Satoreotide tetraxetan (NPL 9) đã được phát triển ở pha I làm thuốc có DOTA. Đã có thông báo rằng ^{90}Y -epratuzumab tetraxetan được dùng cho bệnh nhân có khối u máu (NPL 10).

Nhìn chung, thể tiếp hợp với tác nhân chelat hóa như DOTA và kháng thể hoặc peptit có khối lượng phân tử thấp được gắn kết được hấp thu mạnh, giữ lại, hoặc tích lũy trong thận (các NPL 11 và 12).

Như được mô tả ở trên, sự tích lũy của thể tiếp hợp ở thận gây ra bất lợi trong việc chẩn đoán và điều trị chính xác (NPL 13).

Ví dụ, trong thử nghiệm ở chuột dùng thể tiếp hợp ^{111}In]DOTA-Rituxan Fab, đã có thông báo rằng nó được tích lũy cao ở thận (NPL 11).

Để tránh sự tích lũy cao này ở thận, nghiên cứu thứ nhất của thể tiếp hợp được cải biến với kháng thể mảnh như Fab, scFV, Fab', hoặc dsFV, và nghiên cứu thứ hai của thể tiếp hợp có phần tử liên kết (còn được gọi là phần tử liên kết peptit) được tách đặc hiệu ở thận giữa chelat và kháng thể có thể được đề cập (NPL 12).

Đã có thông báo rằng ban đầu, axit iodhippuric-Gly-Lys-Fab trong đó phần tử liên kết peptit là Gly (glyxin)-Lys (lysin) được tách bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận, và axit iodhippuric trong nước tiểu là chất chuyển hóa và được bài tiết (NPL 14). Ngoài ra, axit iodhippuric-Gly-Tys-Fab, trong đó phần tử liên kết peptit là Gly-Tyr (tyrosin), được thông báo (NPL 13).

Mặt khác, ^{188}Re]CpTR-Gly-Lys-Fab, trong đó phần tử liên kết peptit Gly-Lys được gắn kết với phức hợp reni hữu cơ CpTR-COOH thay bằng axit hippuric, được thông báo (NPL 15).

Ngoài ra, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PGGFML-IT-Fab, trong đó phần tử liên kết peptit là Gly-Phe

(phenylalanin)-Lys, được thông báo (PTL 4).

Ngoài ra, mục đích của NOTA là chất chelat, thể tiếp hợp được cấu thành bởi NOTA và phần tử liên kết peptit được thông báo (PTL 5).

Thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptit được tạo ra, nhưng phụ thuộc vào loại tác nhân chelat hóa, nảy sinh vấn đề là không được tách bởi enzym, và thể tiếp hợp được dự định để giải quyết vấn đề bằng cách đưa phần liên kết (-CH₂-Ph-CO-NH-) có cấu trúc đặc hiệu giữa tác nhân chelat hóa và phần tử liên kết peptit được thông báo (PTL 6). Mục đích là nhằm thu được thể tiếp hợp có phối tử mà có thể liên kết phối trí nguyên tử có bán kính nguyên tử tương đối lớn, như indi, mà thường được sử dụng làm chất đồng vị phóng xạ. Đối với thành phần đệm qua chelat và phần tử liên kết peptit, thành phần đệm có cấu trúc thioure được bộc lộ trong PTL 5 được đưa vào, nhưng được đề cập rằng việc phá hủy bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận sẽ không xảy ra.

Thể tiếp hợp ⁶⁷Ga-NOTA-Met-Ile-Fab, trong đó phần tử liên kết peptit giúp cho quá trình tách bởi tiêu thể là Met (methionin)-Ile (isoleuxin), được thông báo dựa trên các phát hiện sau (NPL 16).

Đã có thông báo rằng chất chuyển hóa ⁶⁷Ga-NOTA-Bn-Met sản sinh bằng cách tách tiêu thể của thể tiếp hợp NOTA-(p-SCN-Bz)-dsFv không có phần tử liên kết peptit được bài tiết ở thận (NPL 17), và thứ hai là từ tận cùng N của chuỗi nhẹ của dsFv của thể tiếp hợp NOTA-(p-SCN-Bz)-dsFv nêu trên là Ile, và do trong số các thể tiếp hợp này, thể tiếp hợp ⁶⁷Ga-NOTA-Met-Ile-Her2 (Herceptin) Fab được thiết kế (NPL 19).

Danh sách tài liệu đối chứng

Tài liệu phi sáng chế

NPL 1: Glycoconj. J., 2013 Apr;30(3):227-36.

NPL 2: Cancer Immunol Immunother, 2006 Nov; 55 (11): 1337-47

NPL 3: Bioconj. Chem.; 2008; 19: 89-96

NPL 4: PLOS ONE; 2014; 9 (9): e106921

NPL 5: Ann. Surg.; 1997; 226: 621-631

NPL 6: J. Nucl. Med.; 2000; 41: 1657-1663

NPL 7: Kenneth T.Cheng, "99mTc-Arcitumomab", [online], Update: March 17, 2008., Molecular Imaging and Contrast Agent Database, [searched on May 17, 2017], internet <URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23676/>>

NPL 8: Bioorg. Med. Chem.; 2019; 27: 3248-3253

NPL 9: Clinical Trials. gov Identifier: NCT02592707

NPL 10: Eur J Haematol. 2013 Dec; 91(6): 552-6

NPL 11: Bioconjugate Chem. (2001), 12, 264-270.

NPL 12: Bioconjugate Chem. (2002), 13, 985-995.

NPL 13: Bioconjugate Chem. (2013), 24, 291-299.

NPL 14: Cancer Res. (1999), 59, 128-134.

NPL 15: Bioconjugate Chem. (2007), 18, 190-198.

NPL 16: Bioconjugate Chem. (2014), 25, 2038-2045.

NPL 17: Bioconjugate Chem. (1997), 8, 365-369.

Tài liệu sáng chế

PTL 1: Công bố đơn quốc tế số WO2010/050528

PTL 2: Công bố đơn quốc tế số WO2008/040362

PTL 3: Công bố đơn quốc tế số WO2005/086875

PTL 4: Công bố đơn quốc tế số WO2013/081091

PTL 5: Công bố đơn quốc tế số WO2017/150549

PTL 6: Công bố đơn quốc tế số WO2019/065774

PTL 7: Công bố đơn quốc tế số WO2018/092885

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mảnh Fab hóa trị một có khối lượng phân tử khoảng 50 kDa, là nhỏ hơn so với kháng thể có khối lượng phân tử khoảng 150 kDa, được bài tiết bởi thận, và có thời gian bán thải ngắn trong máu. Do đó, trong vòng từ 2 đến 32 giờ sau khi dùng, tỷ lệ khối u

trên máu đem lại tín hiệu đủ để quan sát thấy bệnh ung thư. Mảnh Fab không có vùng Fc và do đó không gây ra ADCC hoặc CDC. Mảnh Fab chủ yếu bài tiết bởi thận và do đó không cản trở việc phát hiện di căn gan. Từ các đặc điểm này, mảnh Fab có thể được kỳ vọng là có hiệu quả hơn với vai trò là thuốc chẩn đoán in-vivo so với kháng thể.

Tuy nhiên, ở mảnh Fab, hoạt tính gắn kết của mảnh Fab thường bị suy yếu do chúng có hóa trị một, chứ không phải hóa trị hai như kháng thể. Hơn nữa, để sử dụng kháng thể làm thuốc chẩn đoán in-vivo hoặc tác nhân được sử dụng trong việc trị liệu miễn dịch hình ảnh, kháng thể cần được đánh dấu với kim loại, thuốc nhuộm huỳnh quang, hoặc tương tự, nhưng có một vấn đề là bằng cách đánh dấu bằng cơ chất như vậy, hoạt tính gắn kết của kháng thể bị suy yếu.

Mục đích của sáng chế là nhằm tạo ra thể tiếp hợp được đánh dấu hữu ích để làm thuốc chẩn đoán in-vivo và phép xạ trị bên trong sử dụng mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người mà hoạt tính gắn kết của nó không bị suy yếu bằng cách đánh dấu với kim loại, thuốc nhuộm huỳnh quang, hoặc tương tự. Mục đích của sáng chế là nhằm tạo ra thể tiếp hợp chứa mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người (PTL 7), phân tử liên kết peptit và phối tử, và thể tiếp hợp chứa mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người và phối tử. Ngoài ra, mục đích khác của sáng chế là nhằm tạo ra chế phẩm chẩn đoán chứa thể tiếp hợp nêu trên và phương pháp chẩn đoán sử dụng chế phẩm này, và nhằm tạo ra dược phẩm chứa thể tiếp hợp nêu trên và phương pháp điều trị sử dụng chế phẩm này.

Ngoài ra, mục đích của sáng chế là nhằm tạo ra thể tiếp hợp có chất chelat hóa và phân tử sinh học tích lũy ở thận và được bài tiết nhanh hơn.

Vấn đề cần giải quyết

Các tác giả sáng chế trước đây đã điều chế được mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người có ái lực tốt đối với CEACAM5 của người (Đơn quốc tế số PCT/JP2018/025618). Theo kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu khác, các tác giả sáng chế đã điều chế được thể tiếp hợp trong đó phối tử được sử dụng để đánh dấu được

gắn kết với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người qua (hoặc không qua) phần tử liên kết peptit, và đã nhận thấy rằng thể tiếp hợp có ái lực tương tự đối với CEACAM5 của người như chính mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, tức là hoạt tính gắn kết không bị suy yếu thậm chí bằng cách gắn kết giữa phần đánh dấu và mảnh Fab, từ đó hoàn thành sáng chế. Như vậy, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp chứa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, phần tử liên kết peptit, và phối tử, và thể tiếp hợp chứa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người và phối tử đặc hiệu. Đã xác nhận được rằng thể tiếp hợp không làm suy yếu hoạt tính gắn kết với CEACAM5 của người thậm chí bằng cách gắn kết giữa phần đánh dấu và mảnh Fab và giữ lại hoạt tính gắn kết tốt với CEACAM5 của người, và dựa vào các kết quả này, sáng chế đề xuất cách thức chẩn đoán và điều trị sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế.

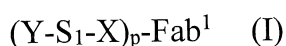
Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã điều chế được mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người có ái lực tốt đối với MUC1 đặc hiệu bệnh ung thư ở người, và theo kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu khác, đã điều chế được thể tiếp hợp trong đó phối tử được gắn kết với mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người qua (hoặc không qua) phần tử liên kết peptit. Thể tiếp hợp có ái lực tương tự đối với MUC1 đặc hiệu bệnh ung thư ở người như chính mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người. Như vậy, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp chứa mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người, phần tử liên kết peptit, và phối tử, và thể tiếp hợp chứa mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người và phối tử đặc hiệu. Hơn nữa, đã xác nhận được rằng thể tiếp hợp không làm suy yếu hoạt tính gắn kết với MUC1 đặc hiệu bệnh ung thư ở người thậm chí bằng quá trình gắn kết của phần đánh dấu và giữ lại hoạt tính gắn kết tốt với MUC1 đặc hiệu bệnh ung thư ở người, và dựa vào các kết quả này, sáng chế đề xuất cách thức chẩn đoán và điều trị sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu thể tiếp hợp được bài tiết nhanh hơn do thể tiếp hợp cấu thành từ phức hợp đã được tạo ra từ phối tử và kim loại (còn được gọi là phức hợp kim loại, thành phần đệm, phần tử liên kết peptit, và phân tử sinh học như kháng thể hữu ích dùng làm thuốc như tác nhân cản quang hoặc tác nhân chống

ung thư, có thể tích lũy ở thận. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã hướng tới DOTA (axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic), có kết quả lâm sàng và được sử dụng rộng rãi làm chất chelat hóa đối với kim loại có hoạt tính phóng xạ, và nhận thấy rằng thể tiếp hợp cấu thành từ DOTA 3 nhánh, thành phần đệm đặc hiệu, phân tử liên kết peptit đặc hiệu, và phân tử sinh học được phân hủy ở thận và được bài tiết.

Dựa vào các phát hiện nêu trên, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp sau đây chứa kháng thể Fab CEACAM5, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc được phẩm chứa thể tiếp hợp, phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư sử dụng thể tiếp hợp, và tương tự. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp sau chứa kháng thể Fab MUC1, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc được phẩm chứa thể tiếp hợp, phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư sử dụng thể tiếp hợp, và tương tự. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa DOTA, thành phần đệm, phân tử liên kết peptit, và phân tử sinh học được bài tiết nhanh chóng bởi thận, hợp chất trung gian của thể tiếp hợp, và phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến phân tử sinh học sử dụng thể tiếp hợp, và tương tự.

[1] Thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức (I) sau:



trong đó

Fab¹ là mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (a) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và
- (b) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và trong đó axit glutamic của axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi

nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4,

Fab¹ được gắn kết với X qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p ở Fab¹;

X là phần tử liên kết peptit hoặc liên liên kết;

S₁ là thành phần đệm hoặc liên kết;

Y là phối tử; và

p là số tự nhiên từ 1 đến 25 và là số của nhóm (Y-S₁-X) gắn kết với Fab¹;

với điều kiện khi X là liên kết, thì S₁ là -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)- hoặc liên kết, và Y là axit 1,4,7,10-tetraazaxycloclodecan-1,4,7,10-tetraaxetic (sau đây, đôi khi được viết tắt là DOTA).

[2] Thẻ tiếp hợp theo mục [1], trong đó

Fab¹ được chọn từ nhóm cấu thành từ

(a) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, và

(b) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và trong đó axit glutamic của axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

[3] Thẻ tiếp hợp theo mục [2], trong đó Fab¹ chứa mảnh Fab chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 (sau đây, dùng để chỉ Fab²).

[4] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [3], trong đó X là phần tử liên kết peptit bao gồm peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin có trình tự axit amin được tách bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận hoặc enzym tiêu thể.

[5] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [4], trong đó

S₁ là

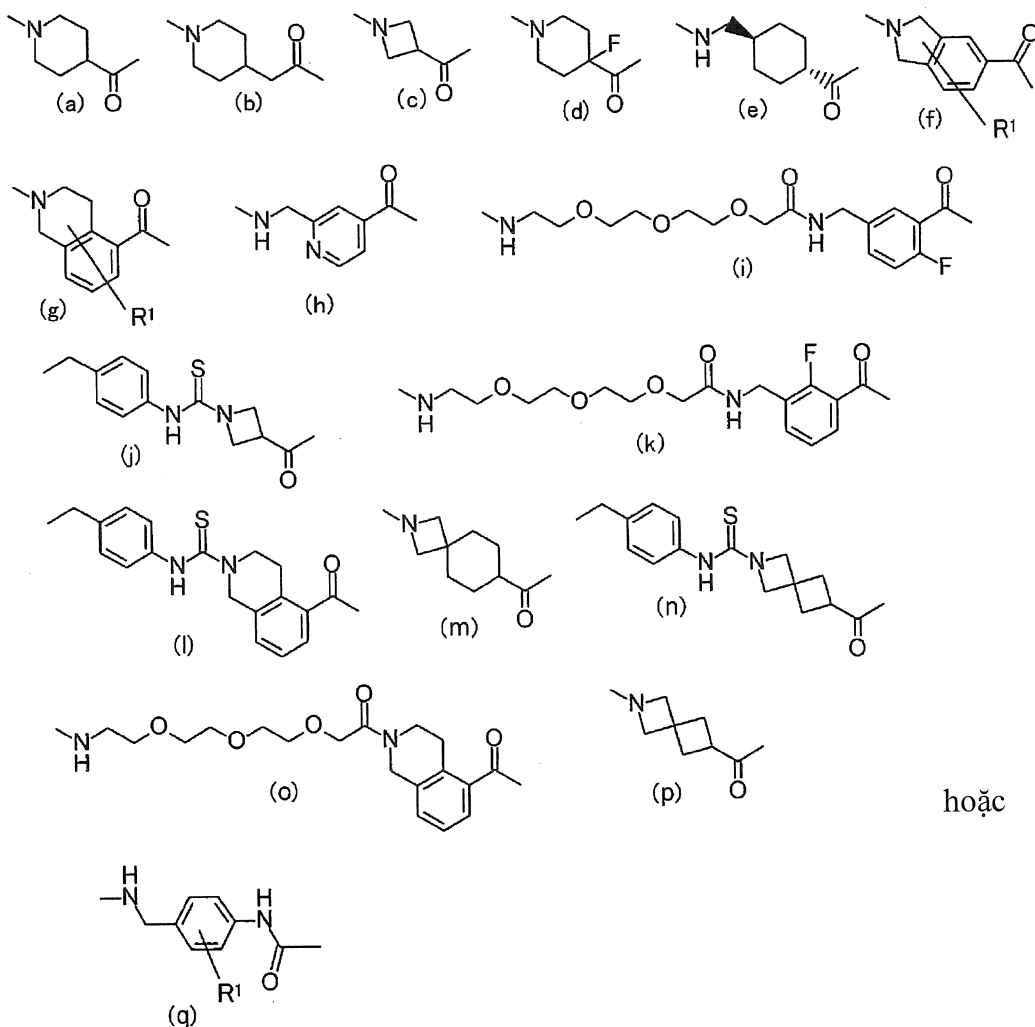
-C(=O)-CH₂O-(1,3-phenylen)-C(=O)-,

-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-(1,3-phenylen)-C(=O)-,

$\text{-C(=O)-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$,
 $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$,
 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-C(=O)-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$,
 $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-}$,
 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(=O)-}$,
 $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-}$,
 $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-C(=O)-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$,

thành phần đệm có công thức bất kỳ trong số các công thức (a) đến (q), hoặc liên kết,

[Công thức hóa học 1]



trong đó R^1 có nghĩa là nguyên tử hydro, halogen, hoặc C_{1-6} alkyl, và các nhóm tương tự được dùng dưới đây; và

X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

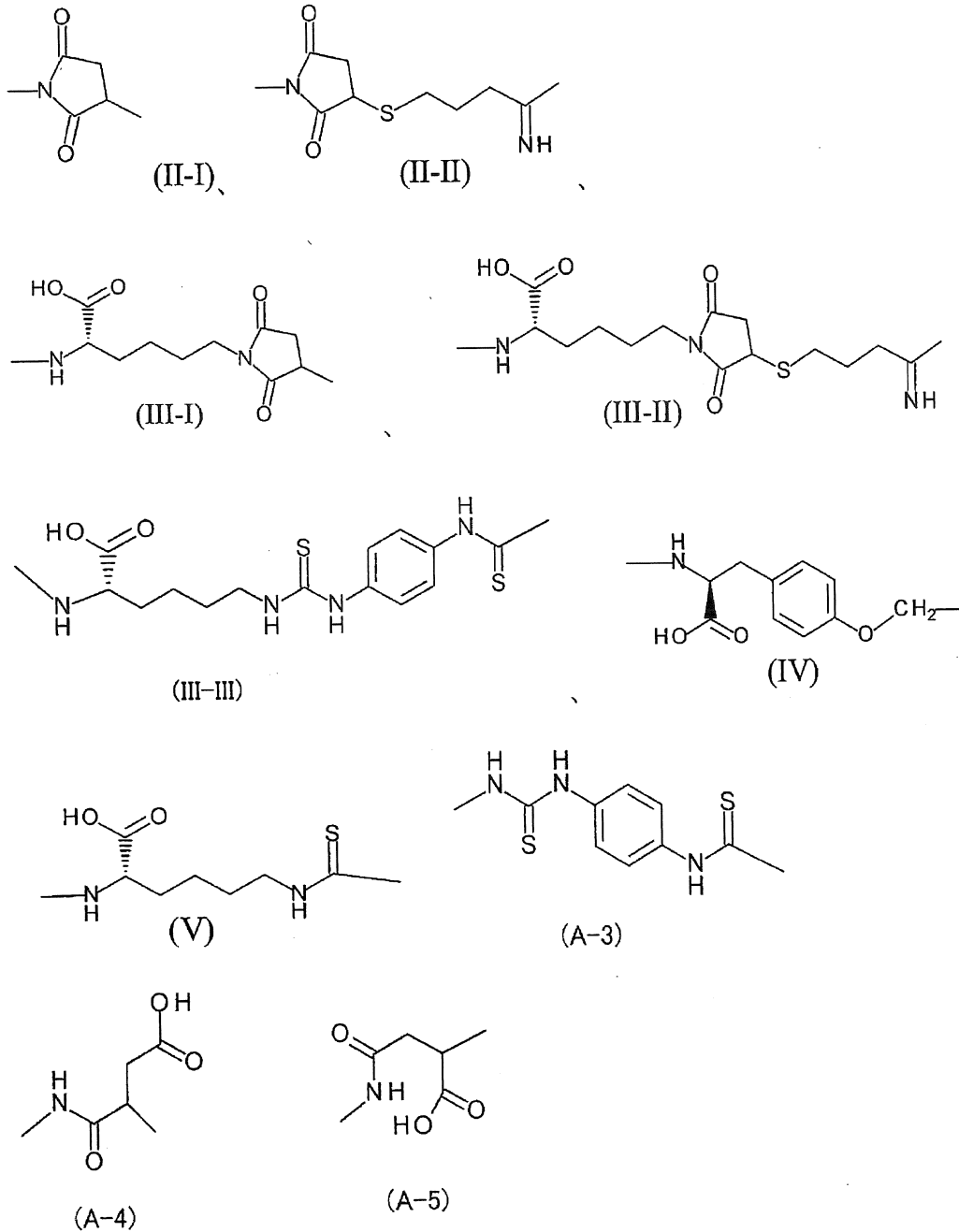
- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-,
- (7) -Gly-Arg-Lys*-Z₂-,

- (8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,
- (13) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-Lys*-Z₂-,
- (14) -Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (15) -Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (16) -Gly-Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (17) -Gly-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-,
- (19) -Gly-Tyr-Lys*-Z₂-,
- (20) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-,
- (22) -Gly-diphenylalanin-Lys*-Z₂-,
- (23) -Gly-Tyr-NH-(CH₂)₅-Z₁-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
- (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-, hoặc
- (29) liên kết,

trong đó Met là methionin, Ile là isoleuxin, Gly là glyxin, Lys là lysin, Phe là phenylalanin, Val là valin, Tyr là tyrosin, Arg là arginin, Asp là axit aspartic, Z₁ là nhóm được thể hiện bởi công thức (II-I) hoặc (II-II) sau, và -Lys*-Z₂- là nhóm được thể hiện bởi công thức (III-I) hoặc (III-II) sau, Tyr*-CH₂- là nhóm được thể hiện bởi công thức (IV) sau, -Lys*-C(=S)- là nhóm được thể hiện bởi công thức (V) sau, -Lys*-Z₃- là nhóm được thể hiện bởi công thức (III-III) sau, và

nhóm (A-3), (A-4), hoặc (A-5) là như được thể hiện bởi các công thức sau.

[Công thức hóa học 2]



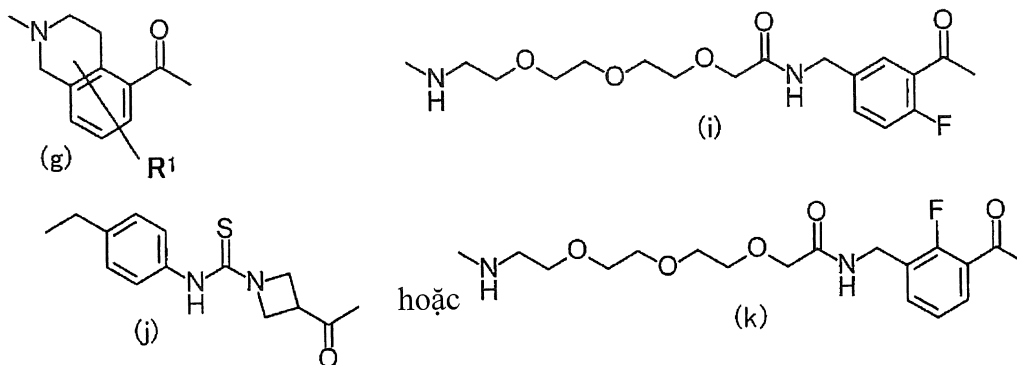
[6] Thể tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó S_1 là $-C(=O)-CH_2O-(1,3\text{-phenylen})-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-(1,3\text{-phenylen})-C(=O)-$, hoặc $-C(=O)-(1,3\text{-phenylen})-C(=O)-$, và

X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-, và
- (8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-.

[7-1] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó S₁ là -C(=O)-CH₂O-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-C(=O)-, -C(=O)-(1,3-phenylen)-C(=O)-, hoặc công thức sau

[Công thức hóa học 3]



, và

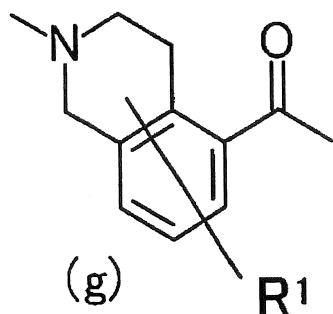
X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-,
- (8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,

- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
 (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
 (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
 (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

[7-2] Thẻ tiếp hợp theo mục [7-1], trong đó S₁ là NH-CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-, hoặc công thức sau

[Công thức hóa học 4]



, và

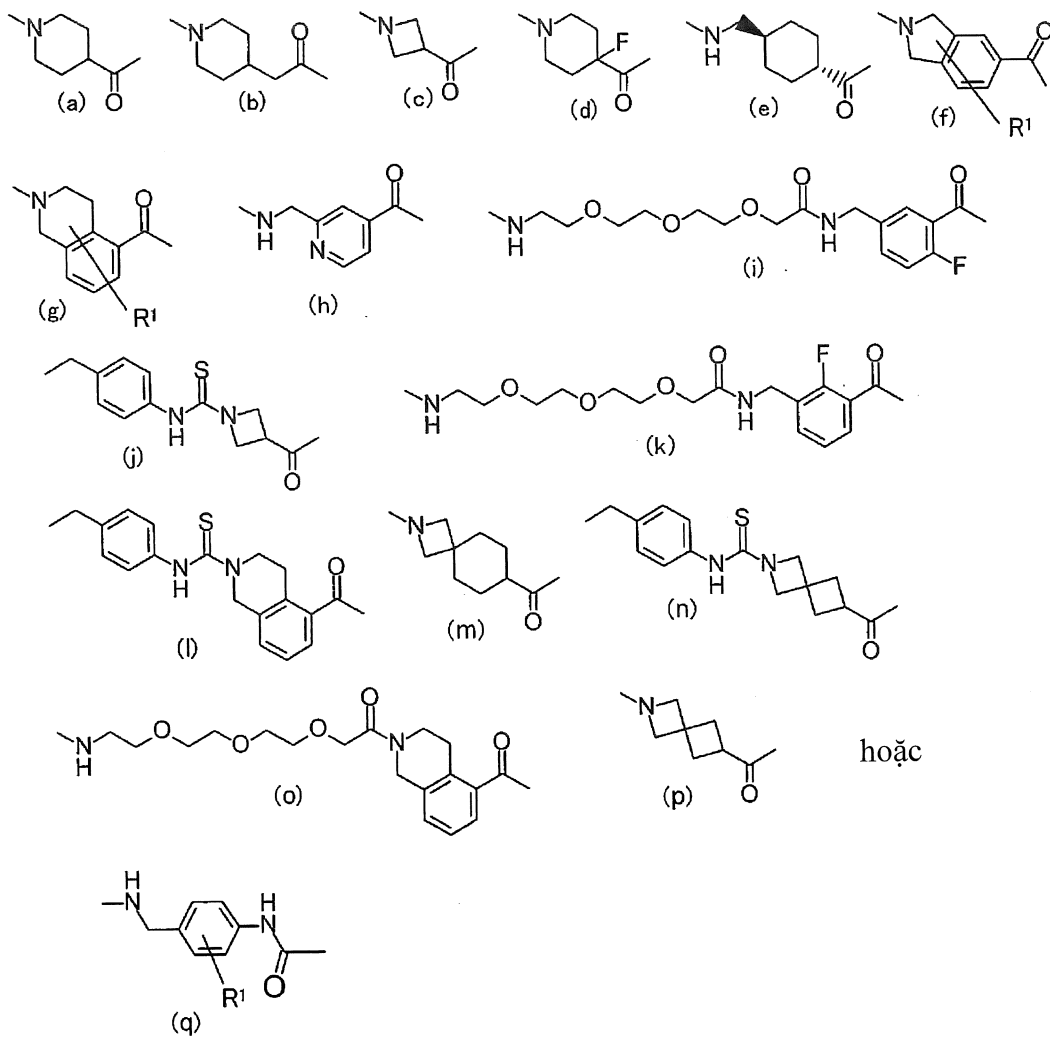
X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
 (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
 (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
 (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
 (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
 (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

[8] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó S₁ là NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-(CH₂)₂-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-, -NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-, -NH-(CH₂)₃-C(=O)-, -NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, thành phần đệm có công thức bất kỳ trong số các công thức (a) đến

(q), hoặc liên kết

[Công thức hóa học 5]



, và

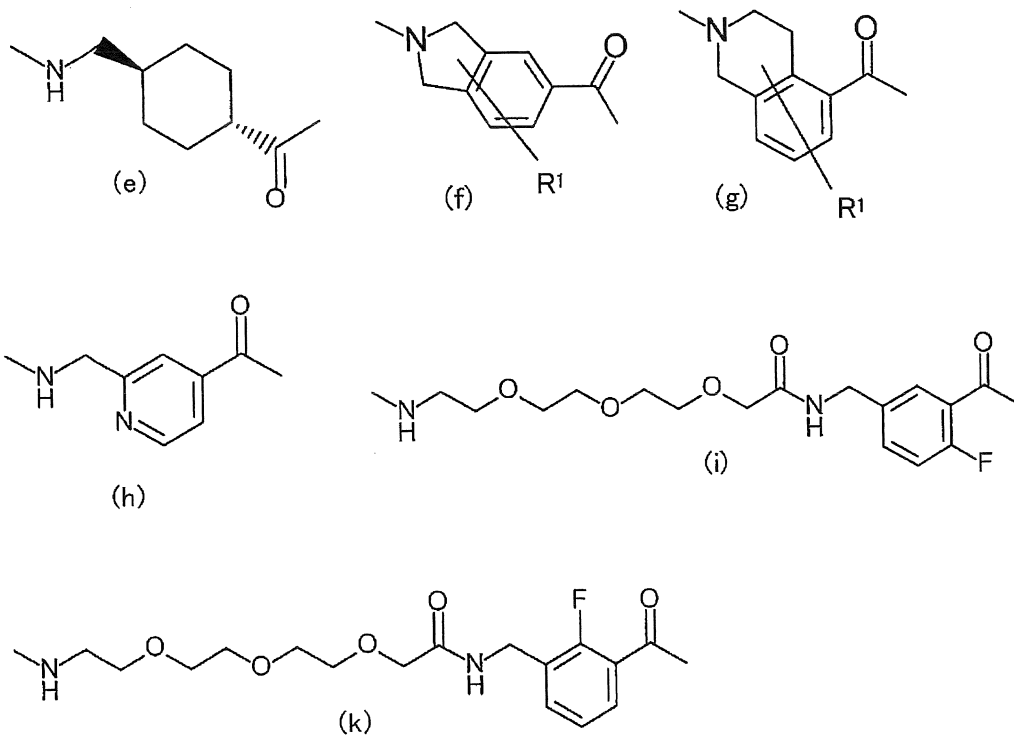
X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (7) -Gly-Arg-Lys*-Z₂-,

- (8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,
- (13) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-Lys*-Z₂-,
- (14) -Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (15) -Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (16) -Gly-Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (17) -Gly-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-,
- (19) -Gly-Tyr-Lys*-Z₂-,
- (20) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-,
- (22) -Gly-diphenylalanin-Lys*-Z₂-,
- (23) -Gly-Tyr-NH-(CH₂)₅-Z₁-
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
- (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

[9] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó S₁ là NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-, -NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-, thành phần đệm có công thức bất kỳ trong số các công thức (e) đến (i) hoặc (k), hoặc liên kết

[Công thức hóa học 6]



, và

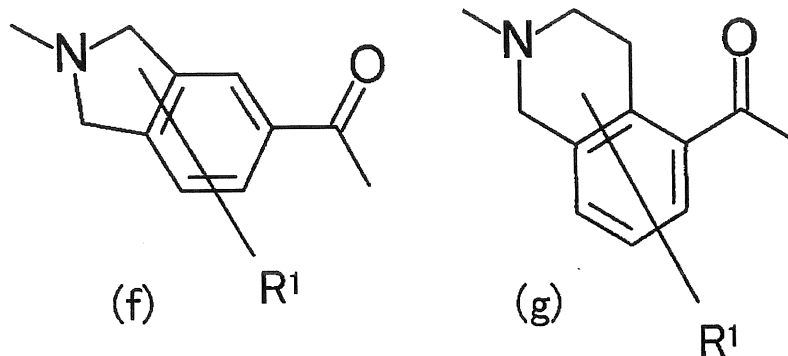
X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,
- (21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
- (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và

(28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

[10] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó S₁ là nhóm được chọn từ nhóm cấu thành từ -NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-, -NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-, thành phần đệm được thể hiện bởi công thức sau (f) hoặc (g), hoặc liên kết

[Công thức hóa học 7]



, và

X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,

(9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,

(11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,

(12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,

(18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-,

(24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,

(25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,

(26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,

(27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và

(28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

[11] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-, và
- (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-.

[12] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

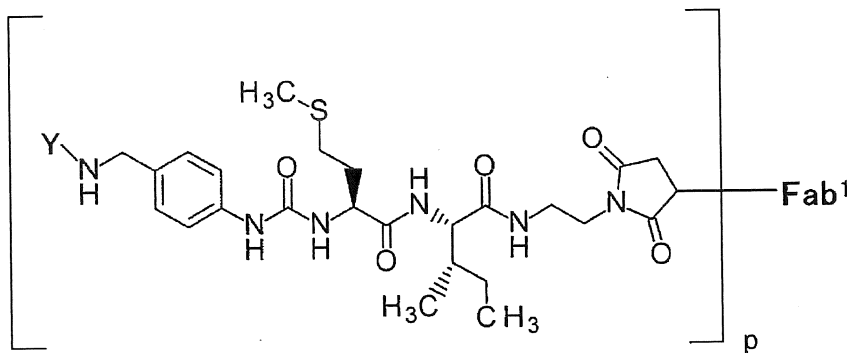
- (4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

[13] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

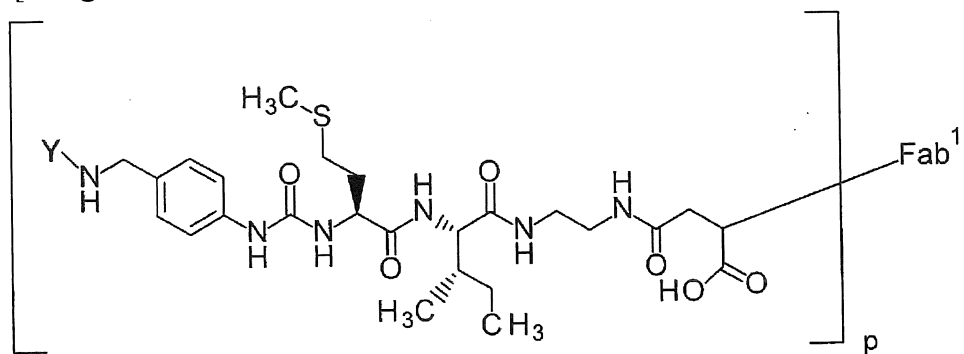
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

[14] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [5], trong đó thẻ tiếp hợp là thẻ tiếp hợp được chọn từ nhóm cấu thành từ các hợp chất được thể hiện bởi công thức sau, và Fab¹ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p ở Fab¹.

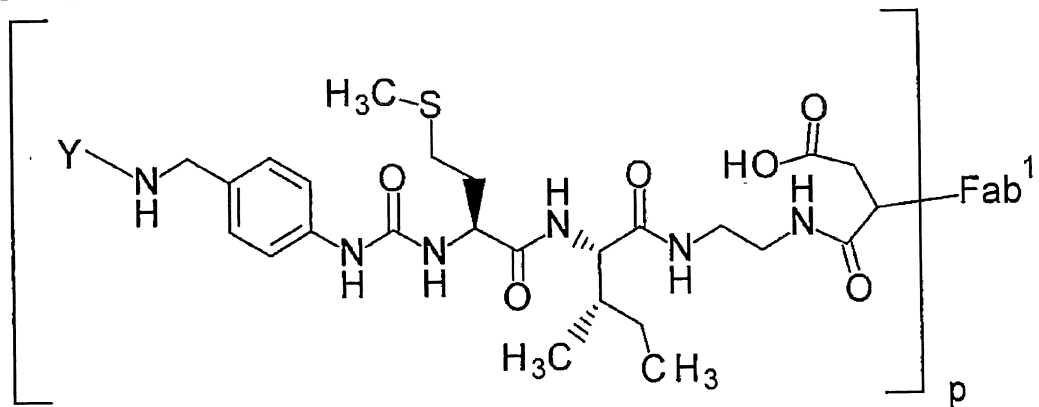
[Công thức hóa học 8]



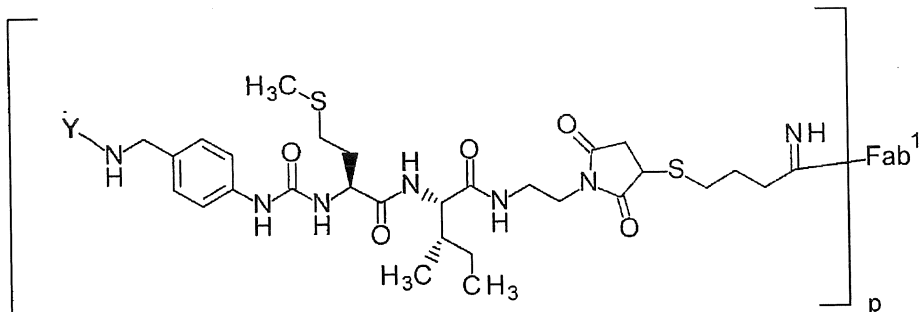
[Công thức hóa học 9]



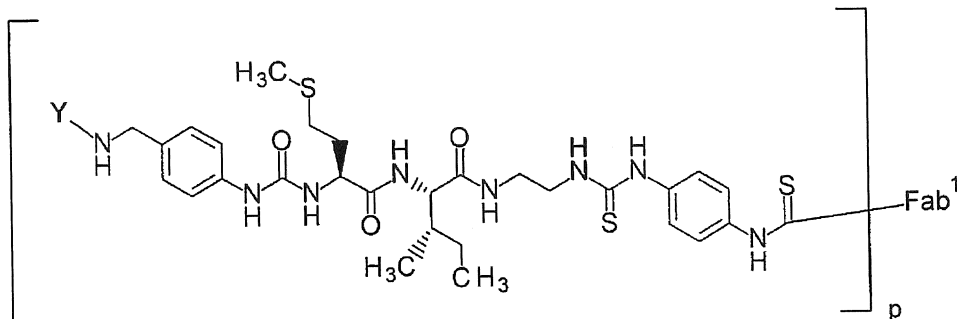
[Công thức hóa học 10]



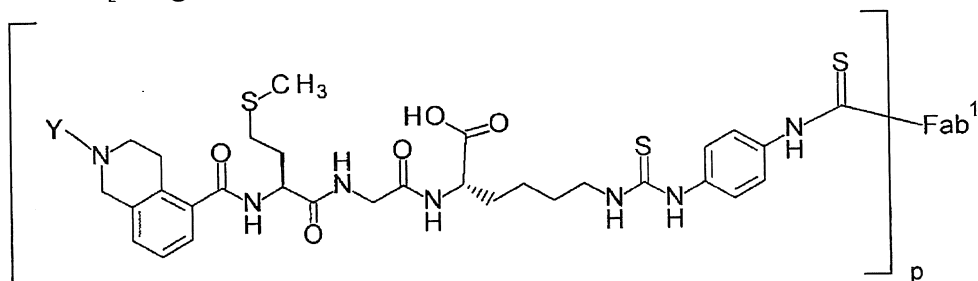
[Công thức hóa học 11]



[Công thức hóa học 12]



[Công thức hóa học 13]



[15] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [14], trong đó Y là deferoxamin (sau đây, đôi khi được viết tắt là DFO) hoặc axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic (sau đây, đôi khi được viết tắt là DOTA).

[16] Thẻ tiếp hợp theo mục [15], trong đó Y là DFO.

[17] Thẻ tiếp hợp theo mục [15], trong đó Y là DOTA.

[18] Thẻ tiếp hợp theo mục [17], trong đó Y là DOTA 3 nhánh hoặc DOTA 4 nhánh.

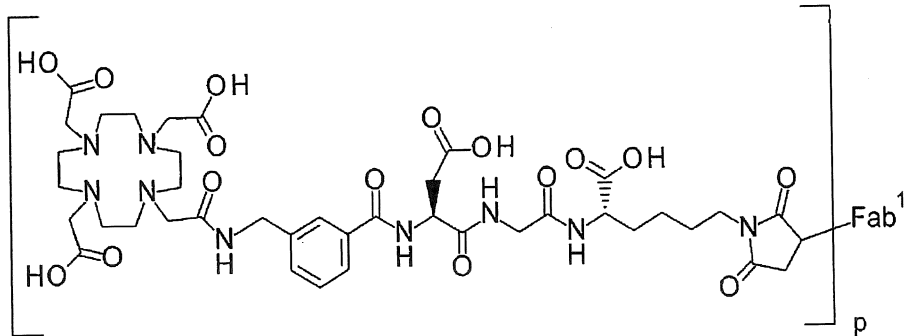
[19] Thẻ tiếp hợp theo mục [18], trong đó Y là DOTA 3 nhánh.

[20] Thẻ tiếp hợp theo mục [18], trong đó Y là DOTA 4 nhánh.

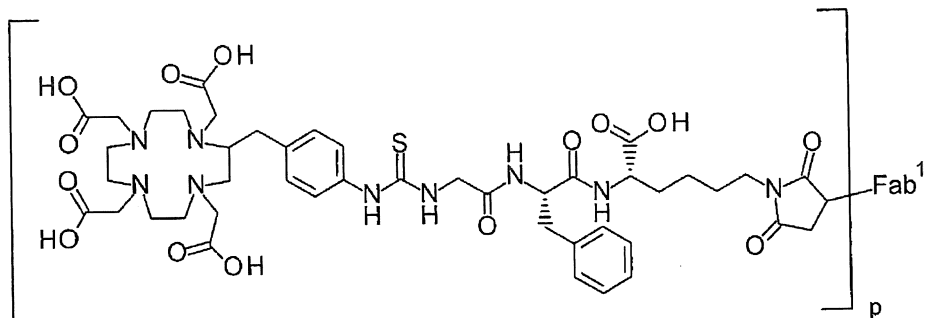
[21] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [15] hoặc [17] đến [20], trong đó

thể tiếp hợp là thể tiếp hợp được chọn từ nhóm cấu thành từ các hợp chất được thể hiện bởi công thức sau, và Fab¹ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p ở Fab¹.

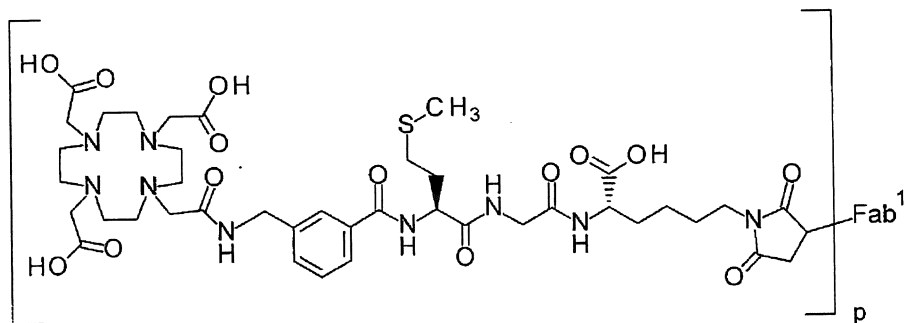
[Công thức hóa học 14]



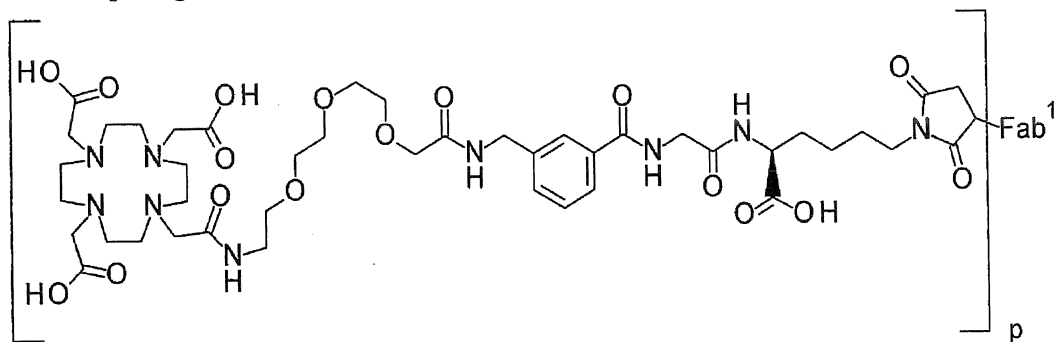
[Công thức hóa học 15]



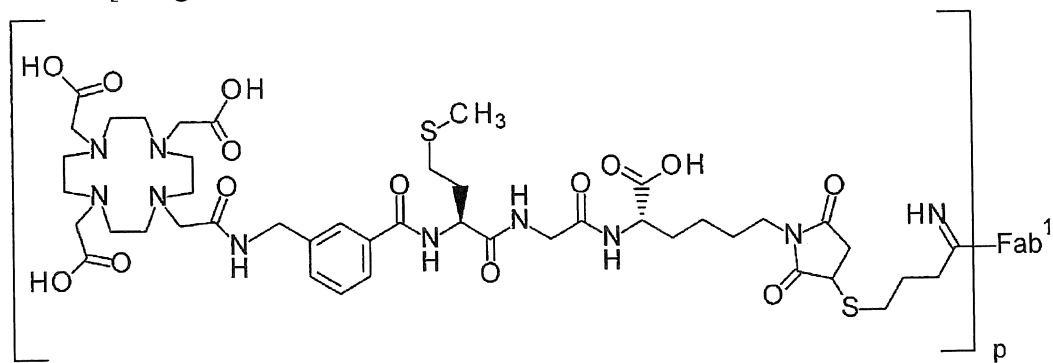
[Công thức hóa học 16]



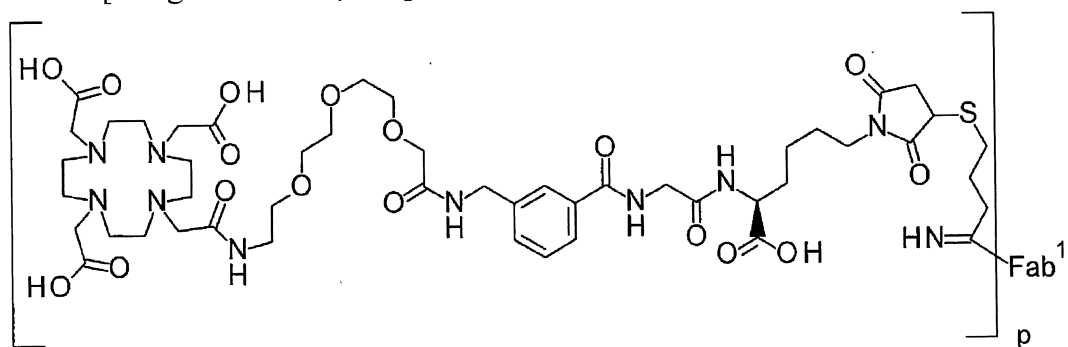
[Công thức hóa học 17]



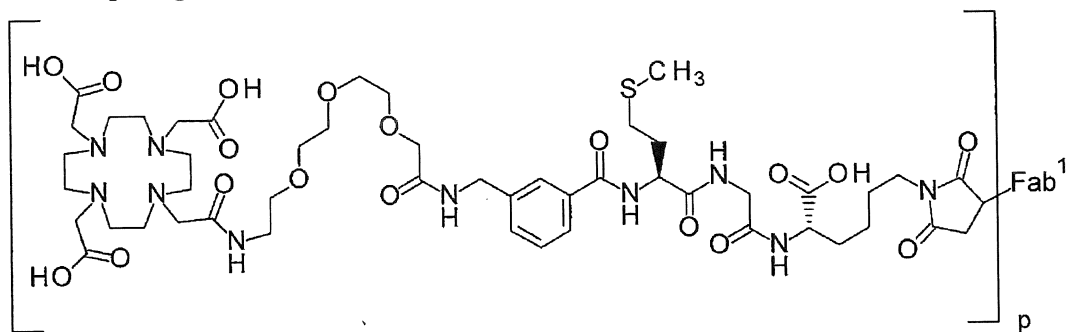
[Công thức hóa học 18]



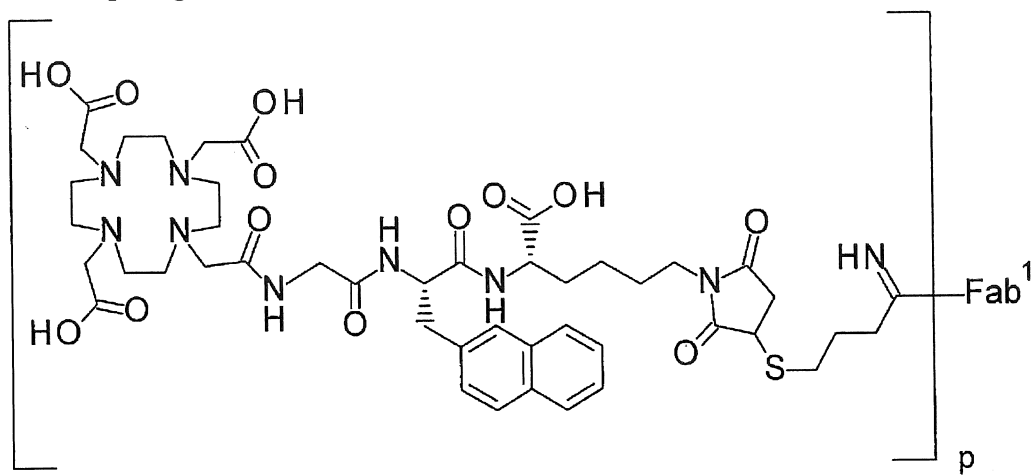
[Công thức hóa học 19]



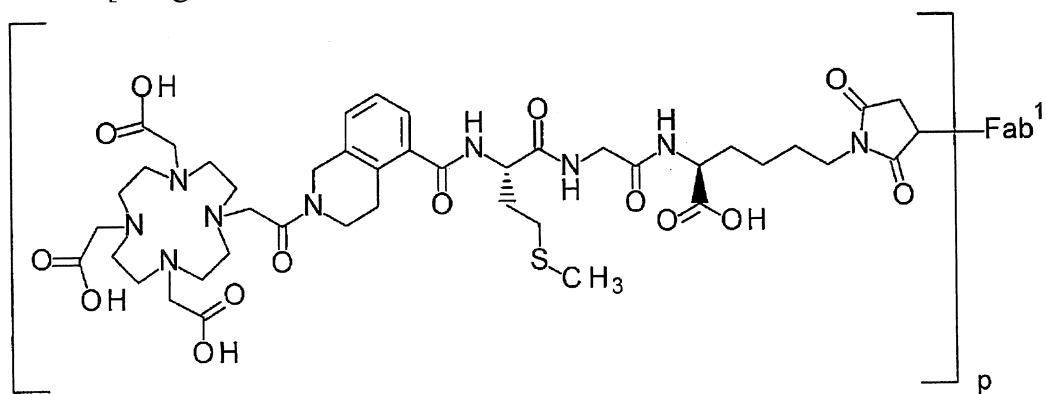
[Công thức hóa học 20]



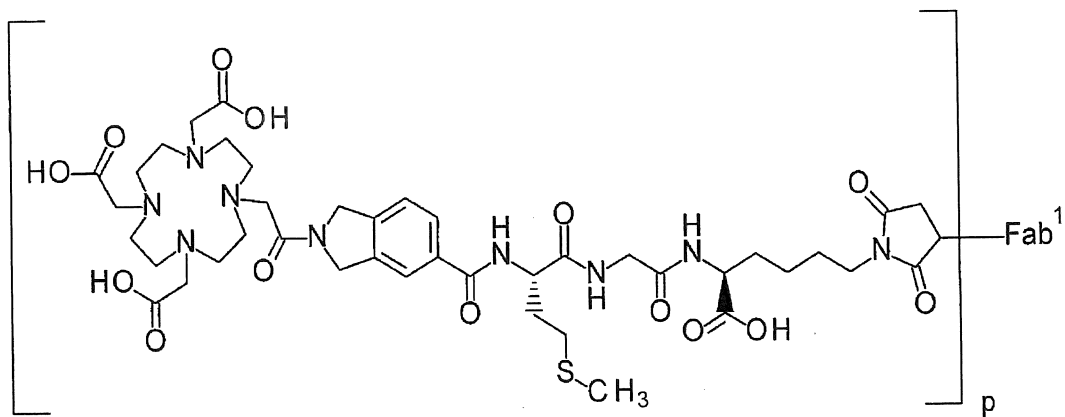
[Công thức hóa học 21]



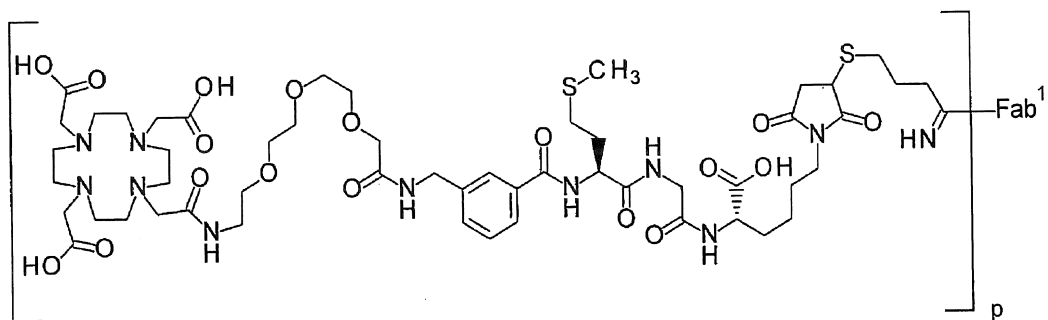
[Công thức hóa học 22]



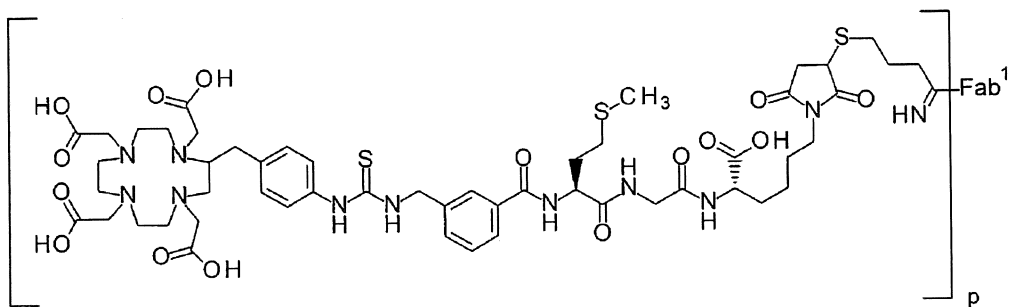
[Công thức hóa học 23]



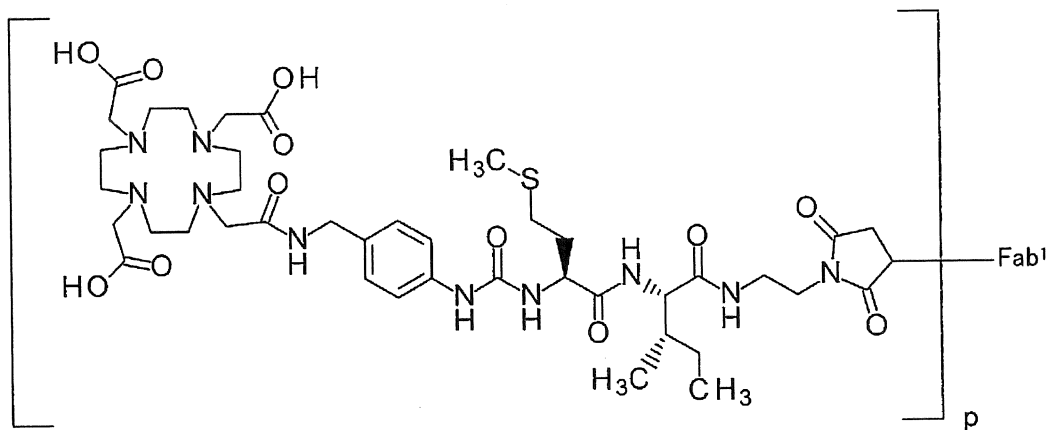
[Công thức hóa học 24]



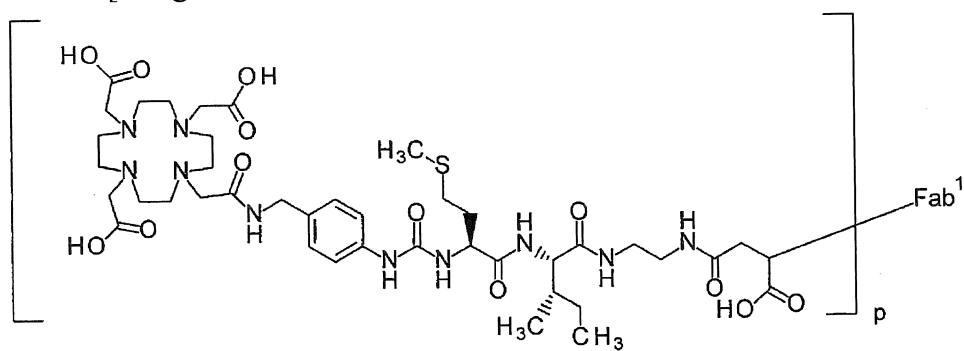
[Công thức hóa học 25]



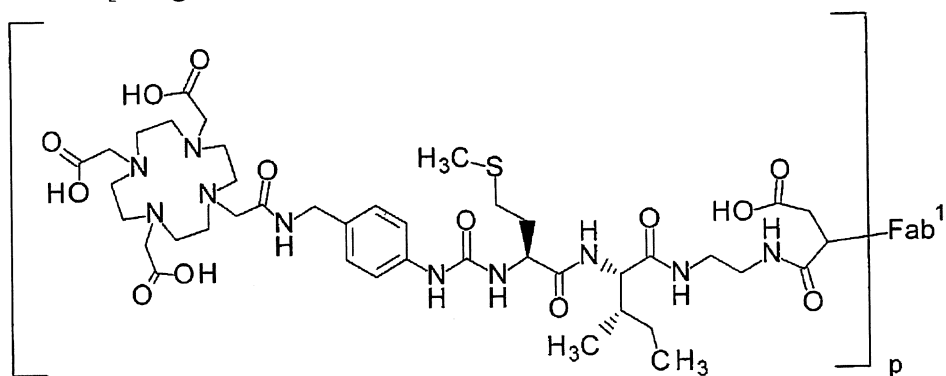
[Công thức hóa học 26]



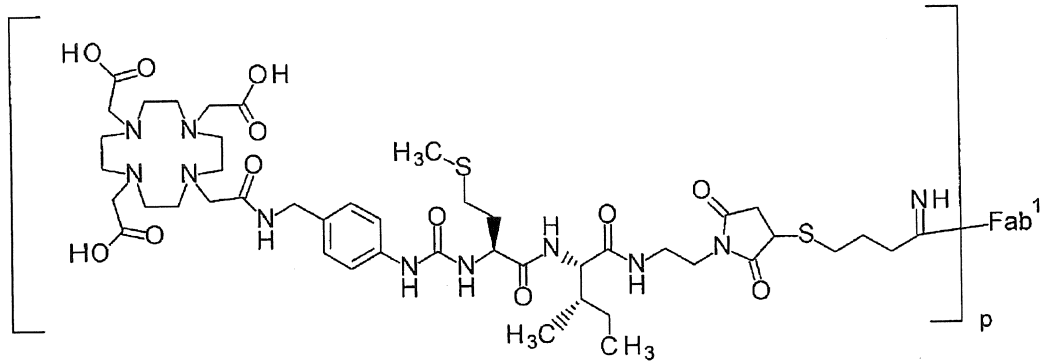
[Công thức hóa học 27]



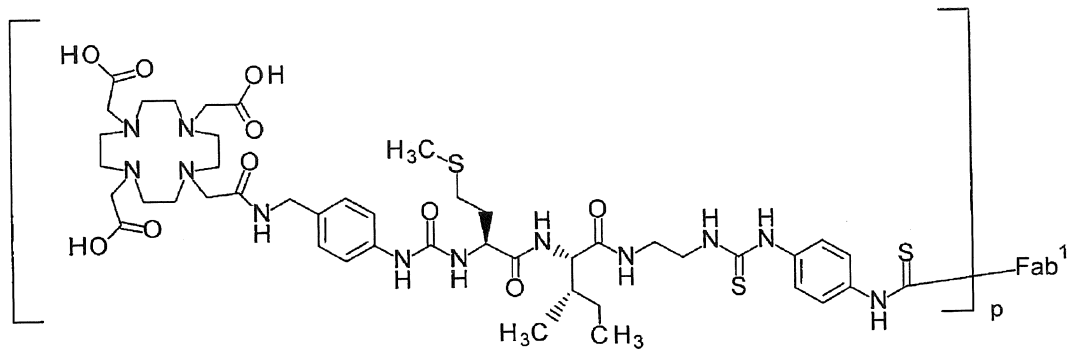
[Công thức hóa học 28]



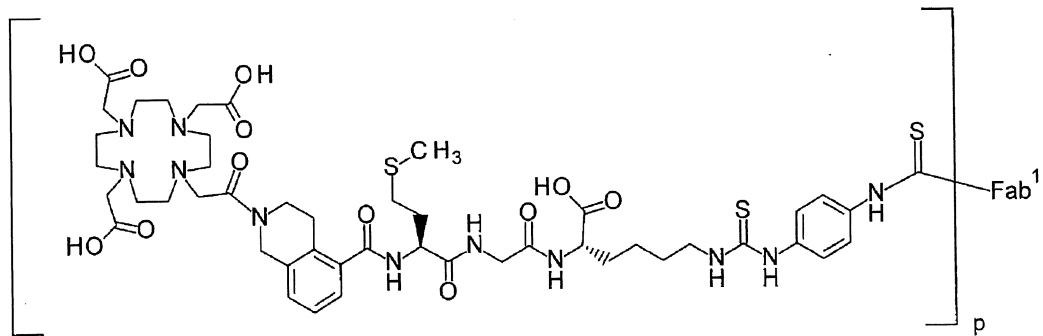
[Công thức hóa học 29]



[Công thức hóa học 30]

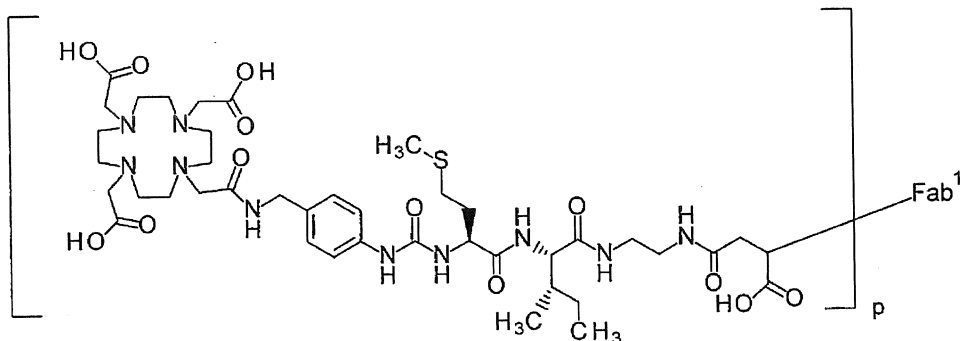


[Công thức hóa học 31]

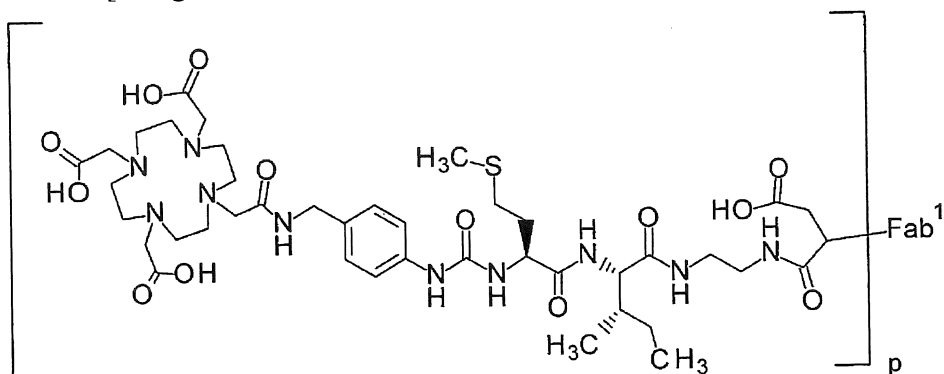


Ngoài ra, thể tiếp hợp theo sáng chế có thể là hỗn hợp của hai thể tiếp hợp sau.

[Công thức hóa học 27]

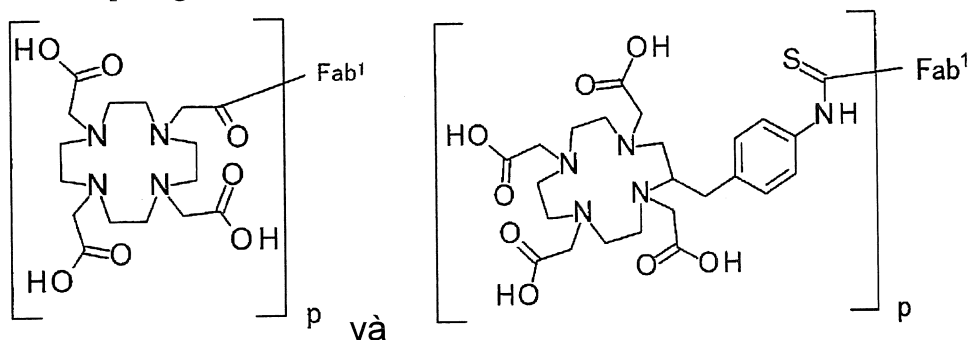


[Công thức hóa học 28]



[22] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [15] hoặc [17] đến [20], trong đó thẻ tiếp hợp là thẻ tiếp hợp được chọn từ nhóm cấu thành từ các hợp chất được thể hiện bởi công thức sau, và Fab¹ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p ở Fab¹.

[Công thức hóa học 32]



[23] Thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (22), trong đó p là số tự nhiên từ 1 đến 5.

[24] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [20], trong đó kim loại được

liên kết phối trí với Y.

[25] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [21] đến [22], trong đó kim loại được liên kết phối trí.

[26] Thẻ tiếp hợp theo mục [24] hoặc [25], trong đó kim loại là chất đồng vị phóng xạ kim loại.

[27] Thẻ liên hợp theo mục [26], trong đó kim loại là ^{89}Zr .

[28] Thẻ tiếp hợp theo mục [24] hoặc [25], trong đó kim loại là ion kim loại thuận từ.

[29] Thẻ tiếp hợp theo mục [28], trong đó kim loại là Gd^{3+} .

[30] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [29], trong đó thẻ tiếp hợp là chất đánh dấu PET.

[31] Chế phẩm chẩn đoán chứa một hoặc nhiều thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [30] và chất mang dược dụng.

[32] Chế phẩm chẩn đoán theo mục [31], trong đó chế phẩm chẩn đoán này được sử dụng làm thuốc chẩn đoán sớm hoặc thuốc chia giai đoạn.

[33] Chế phẩm chẩn đoán theo mục bất kỳ trong số các mục [31] hoặc [32], trong đó chế phẩm chẩn đoán được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện CEACAM5 của người.

[34] Chế phẩm chẩn đoán theo mục [33], trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến giáp, hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của chúng.

[35] Dược phẩm chứa một hoặc nhiều thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [29], và chất mang dược dụng.

[36] Dược phẩm theo mục [35], trong đó dược phẩm này là dược phẩm để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CEACAM5 của người.

[37] Dược phẩm theo mục [36], trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến giáp, hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của chúng.

[38] Sử dụng theo một hoặc nhiều mục theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [29]

để sản xuất chế phẩm chẩn đoán bệnh ung thư và/hoặc được phẩm để điều trị bệnh ung thư.

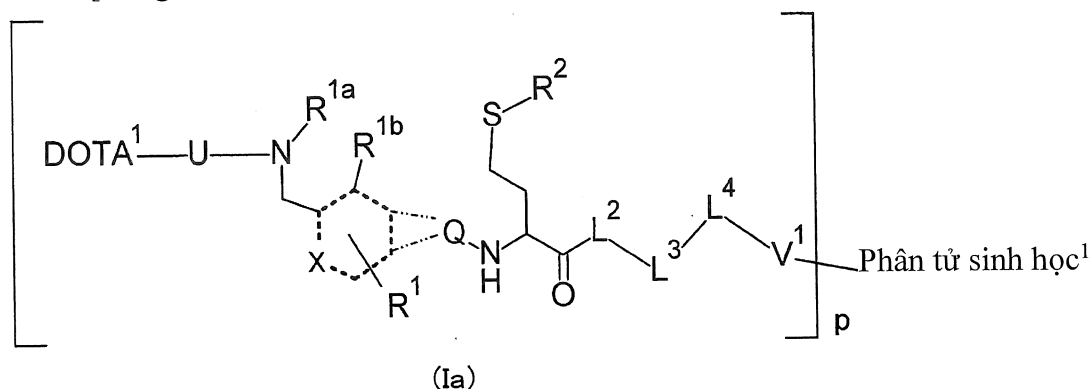
[39] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [30], trong đó thẻ tiếp hợp được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư và/hoặc điều trị bệnh ung thư.

[40] Phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm bước dùng một hoặc nhiều thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [30] cho đối tượng.

[41] Phương pháp điều trị bệnh ung thư, bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [24] đến [30] cho đối tượng.

[42] Thẻ tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau (Ia)

[Công thức hóa học 33]



trong đó

DOTA¹: DOTA 3 nhánh,

U: liên kết hoặc $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$

Q: $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, hoặc $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

X: C hoặc N

R¹ᵃ, R¹ᵇ: giống hoặc khác nhau, H, hoặc C₁₋₆ alkyl,

với điều kiện R¹ᵃ và R¹ᵇ cùng nhau có thể tạo ra C₁₋₆ alkylen;

p là số tự nhiên từ 1 đến 25 và được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p ở phân tử sinh học¹;

R¹: H, halogen, C₁₋₆ alkyl, hoặc halo C₁₋₆ alkyl,

R²: C₁₋₆ alkyl hoặc halo C₁₋₆ alkyl,

L^2 : Ile, Gly, Ala, Val, Phe, $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{NR}^3\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{N}_3)\text{C}(=\text{O})-$,

hoặc $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$,

R^3 : H, C_{1-6} alkyl,

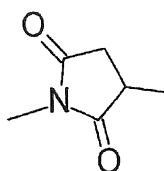
R^4 : H, C_{1-6} alkyl,

L^3 : liên kết, Arg, hoặc His,

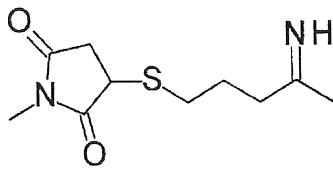
L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$, $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$, hoặc liên kết,

V^1 : nhóm có công thức bất kỳ trong số các công thức (A-1) đến (A-5),

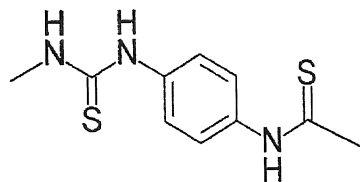
[Công thức hóa học 34]



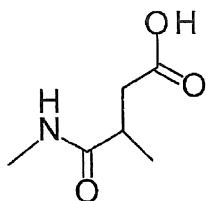
(A-1)



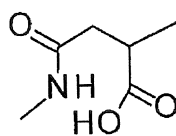
(A-2)



(A-3)



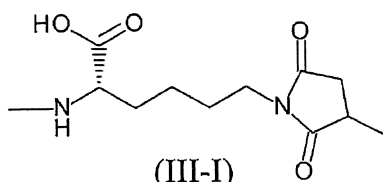
(A-4)



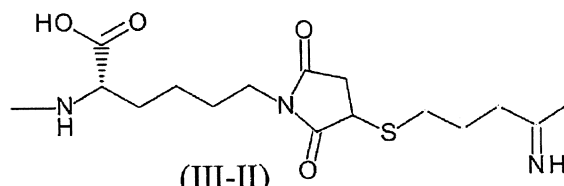
(A-5)

hoặc, các nhóm $-L^3-L^4-V^1-$ cùng nhau tạo ra công thức sau

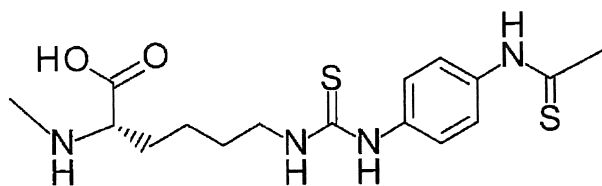
[Công thức hóa học 35]



(III-I)



(III-II)



(III-III)

phân tử sinh học¹: phân tử sinh học

[Công thức hóa học 36]

đường chấm chấm — . . — . : Q được gắn kết với một trong số các nguyên tử cacbon trên vòng
đường chấm chấm : liên kết đơn hoặc liên kết đôi

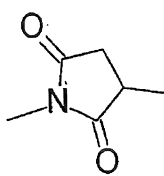
[43] Thễ tiếp hợp theo mục [42], trong đó L^3 , L^4 , và V^1 là các nhóm sau.

L^3 : liên kết, Arg, hoặc His,

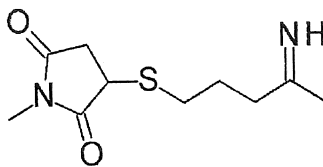
L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$, $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$, hoặc liên kết,

V^1 : nhóm có công thức bất kỳ trong số các công thức (A-1) đến (A-5),

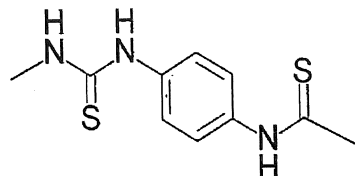
[Công thức hóa học 37]



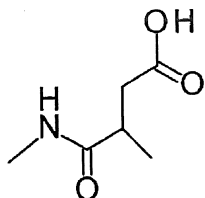
(A-1)



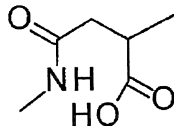
(A-2)



(A-3)



(A-4)

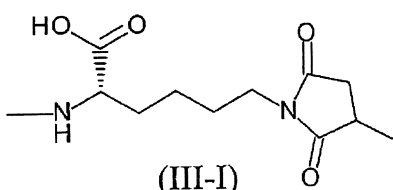


(A-5)

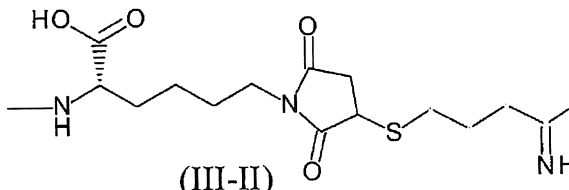
[44] Thễ tiếp hợp theo mục [43], trong đó

các nhóm $-L^3-L^4-V^1-$ cùng nhau tạo ra công thức sau.

[Công thức hóa học 38]



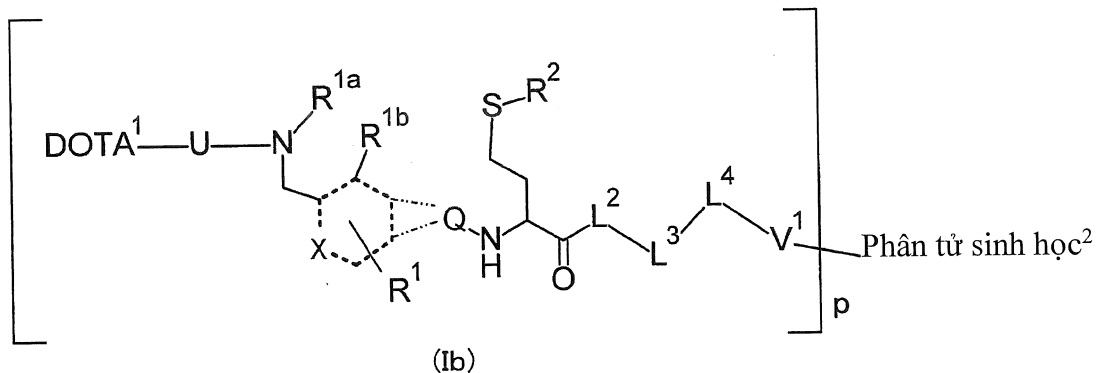
(III-I)



(III-II)

[45] Thễ tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau (Ib)

[Công thức hóa học 39]



trong đó

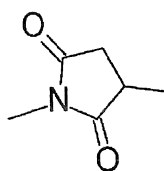
DOTA¹: DOTA 3 nhánh,

U: liên kết hoặc $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$ Q: $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, hoặc $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

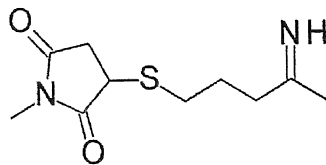
X: C hoặc N

 R^{1a} , R^{1b} : giống hoặc khác nhau, H, hoặc C_{1-6} alkyl,với điều kiện R^{1a} và R^{1b} cùng nhau có thể tạo ra C_{1-6} alkylen; p là số tự nhiên từ 1 đến 25 và được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p ở phân tử sinh học²; R^1 : H, halogen, C_{1-6} alkyl, hoặc halo C_{1-6} alkyl, R^2 : C_{1-6} alkyl hoặc halo C_{1-6} alkyl, L^2 : Ile, Gly, Ala, Val, Phe, $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{NR}^3\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{N}_3)\text{C}(=\text{O})-$, hoặc $-\text{NHCH}(\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$, R^3 : H, C_{1-6} alkyl, R^4 : H, C_{1-6} alkyl, L^3 : liên kết, Arg, hoặc His, L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$, $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$, hoặc liên kết, V^1 : nhóm có công thức bất kỳ trong số các công thức (A-1) đến (A-5),

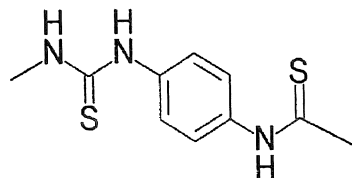
[Công thức hóa học 40]



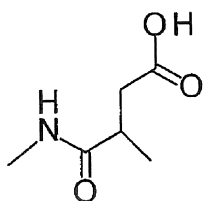
(A-1)



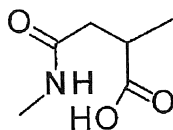
(A-2)



(A-3)



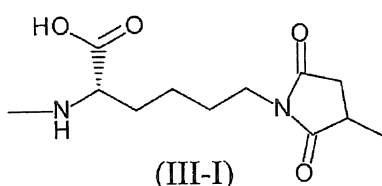
(A-4)



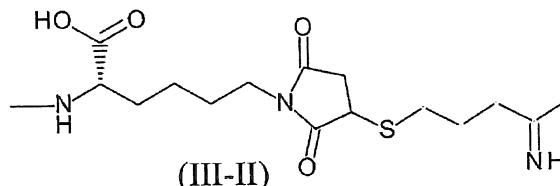
(A-5)

hoặc, các nhóm $-L^3-L^4-V^1-$ cùng nhau tạo ra công thức sau

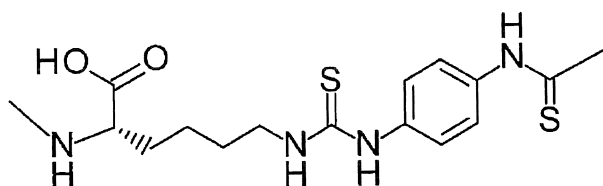
[Công thức hóa học 41]



(III-I)



(III-II)



(III-III)

phân tử sinh học²: mảnh kháng thể Fab

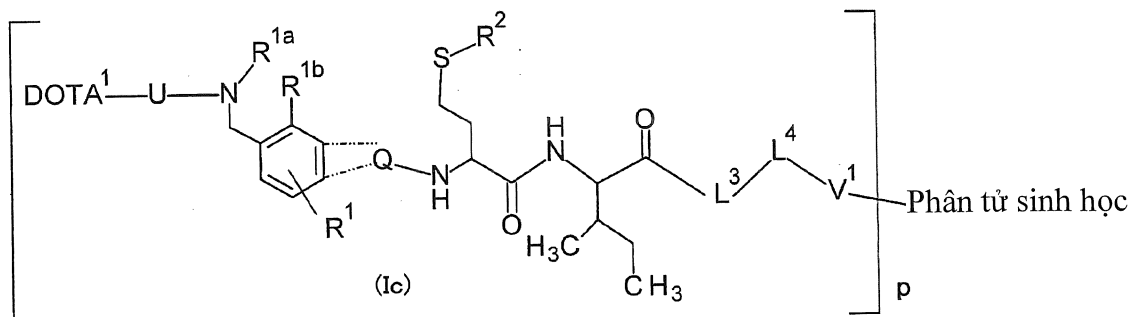
[Công thức hóa học 42]

đường chấm chấm — . . — : Q được gắn kết với nguyên tử bất kỳ trong số hai nguyên tử cacbon trên vòng;

đường chấm chấm : liên kết đơn hoặc liên kết đôi.

[46-1] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [45], trong đó thẻ tiếp hợp có công thức (Ic) sau:

[Công thức hóa học 43]



trong đó

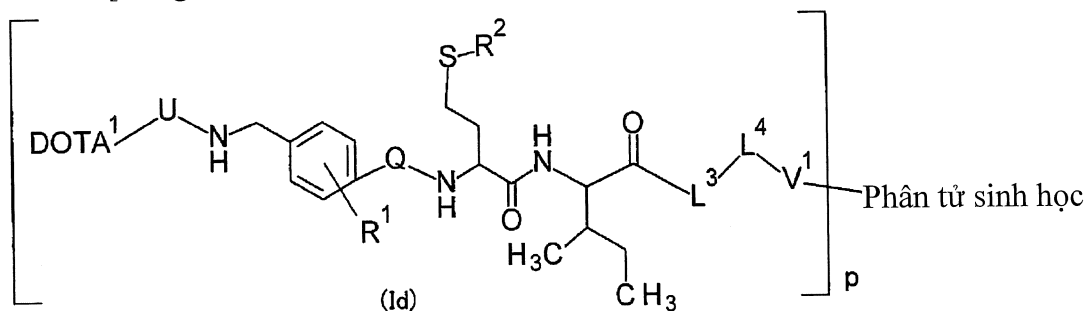
 L^3 : liên kết, L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ hoặc $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$,phân tử sinh học: phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học².

[46-2] Thẻ tiếp hợp theo mục [46-1], trong đó trong công thức (Ic),

 L^3 là liên kết, và L^4 là $\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$.

[47-1] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [46-2], trong đó thẻ tiếp hợp được thể hiện bởi công thức (Id) sau:

[Công thức hóa học 44]



trong đó

 L^3 : liên kết, L^4 : $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ hoặc $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$,phân tử sinh học: phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học²

thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [45].

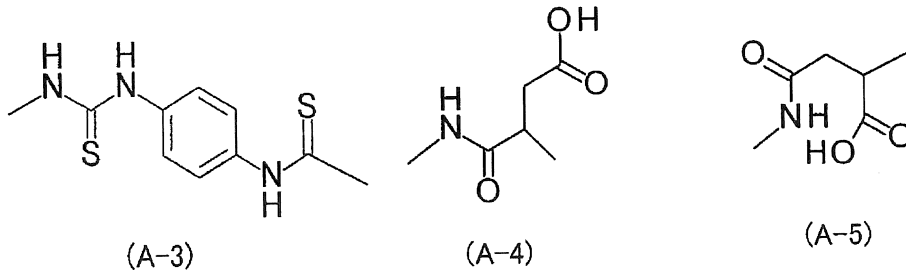
[47-2] Thẻ tiếp hợp theo mục [47-1], trong đó trong công thức (Id),

L^3 là liên kết, và

L^4 là $NH-(CH_2)_2-$.

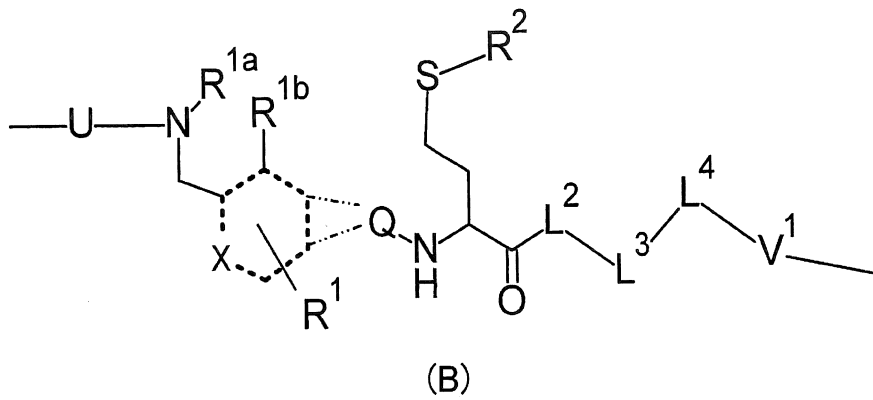
[48] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [47-2], trong đó V^1 là nhóm bất kỳ có các công thức (A-3) đến (A-5) sau.

[Công thức hóa học 45]



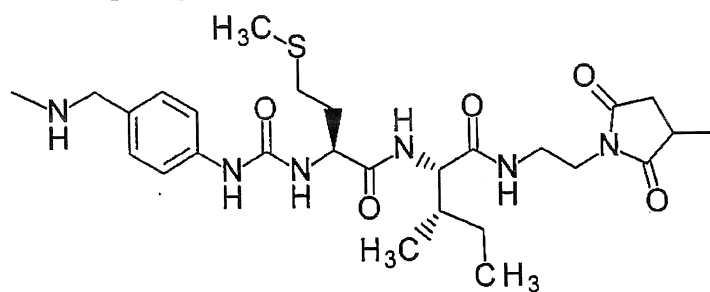
[49] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [48], trong đó nhóm (B) trong công thức (Ia) hoặc (Ib)

[Công thức hóa học 46]

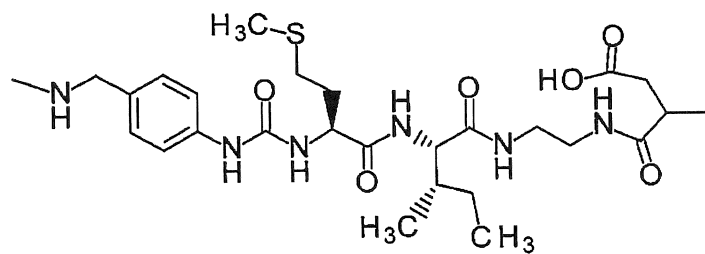


là nhóm được chọn từ nhóm cấu thành từ các công thức (B-1) đến (B-7) sau.

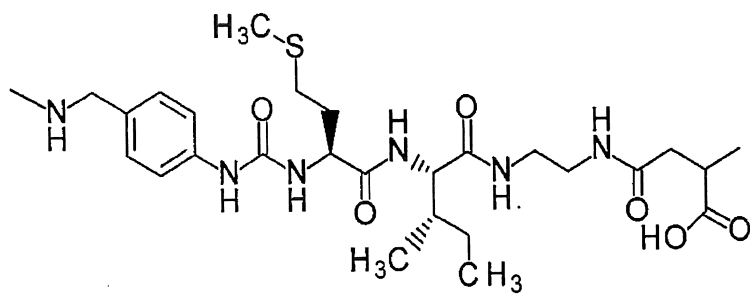
[Công thức hóa học 47]



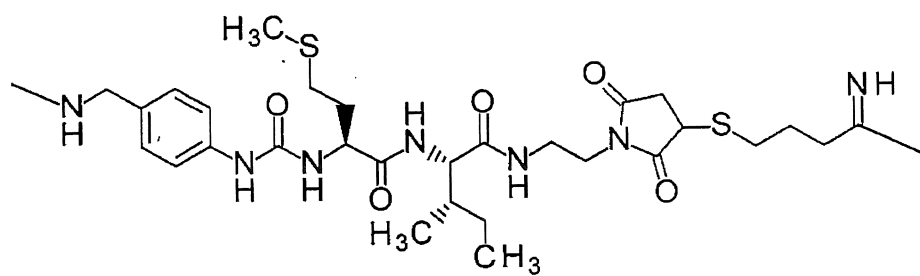
(B-1)



(B-2)

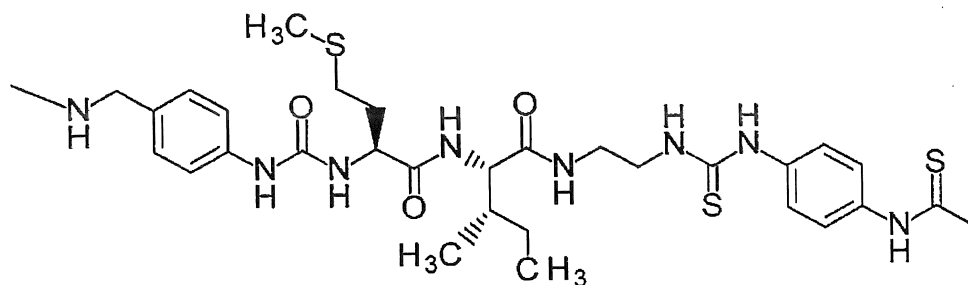


(B-3)

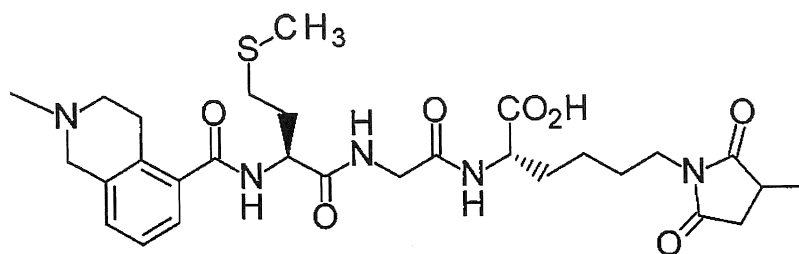


(B-4)

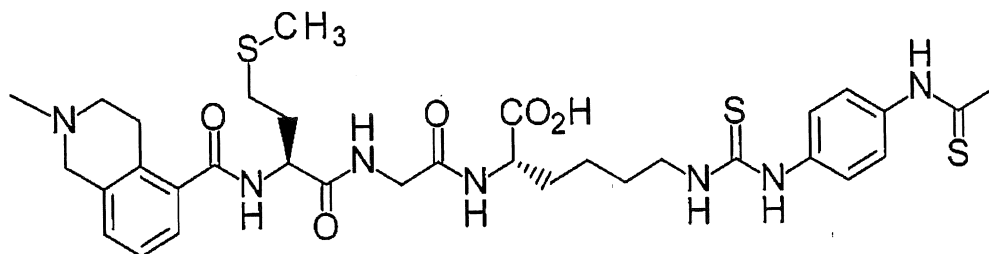
[Công thức hóa học 48]



(B-5)



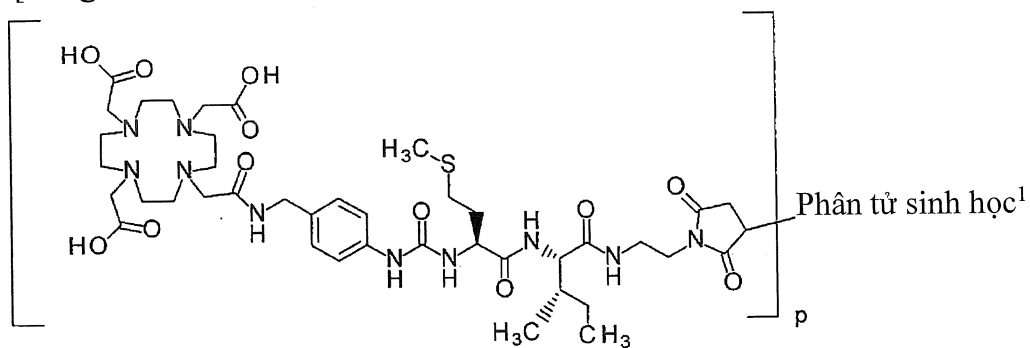
(B-6)



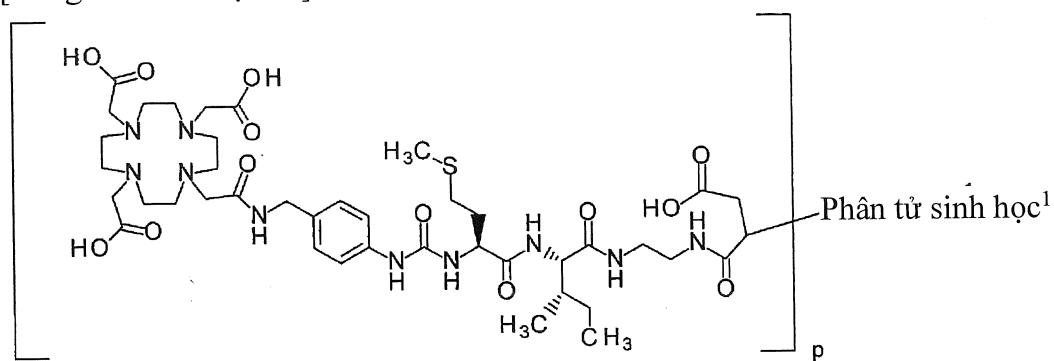
(B-7)

[50] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [49], trong đó thẻ tiếp hợp được chọn từ nhóm cấu thành từ các hợp chất được thể hiện bởi các công thức sau.

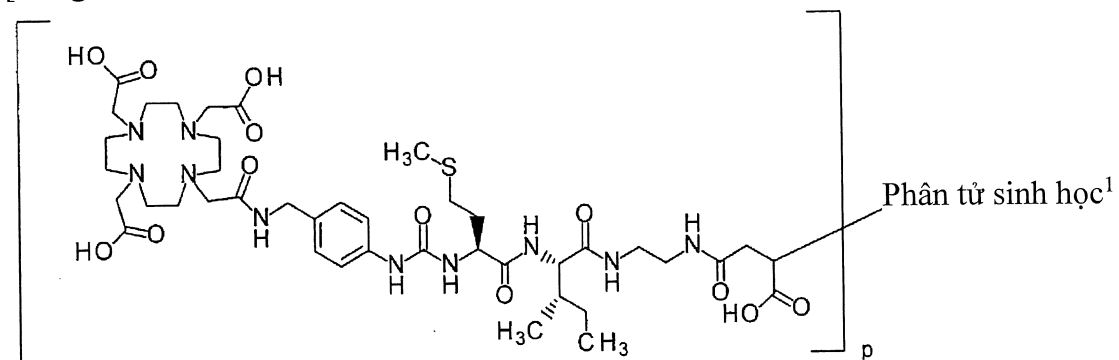
[Công thức hóa học 49]



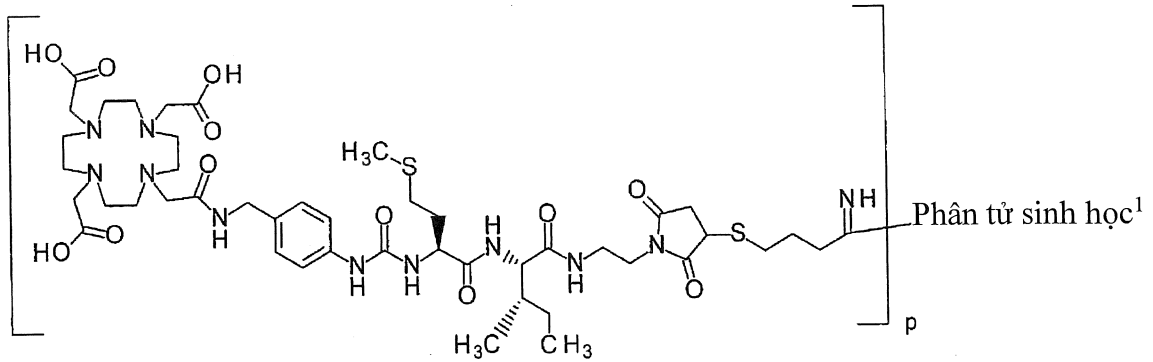
[Công thức hóa học 50]



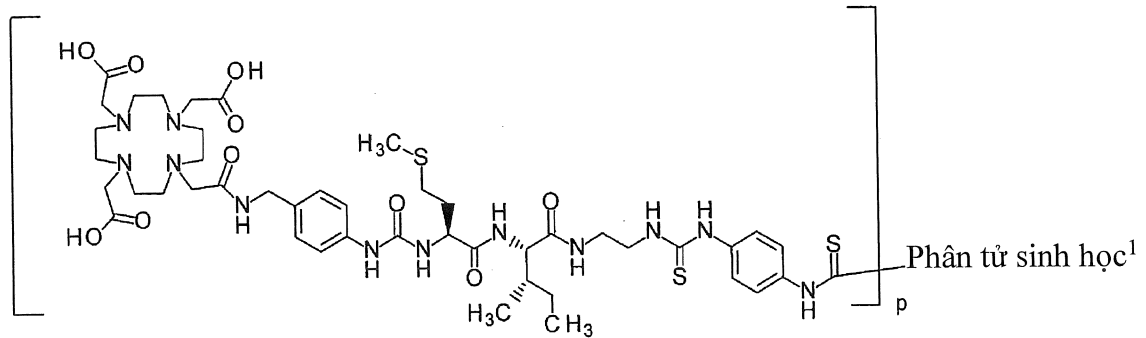
[Công thức hóa học 51]



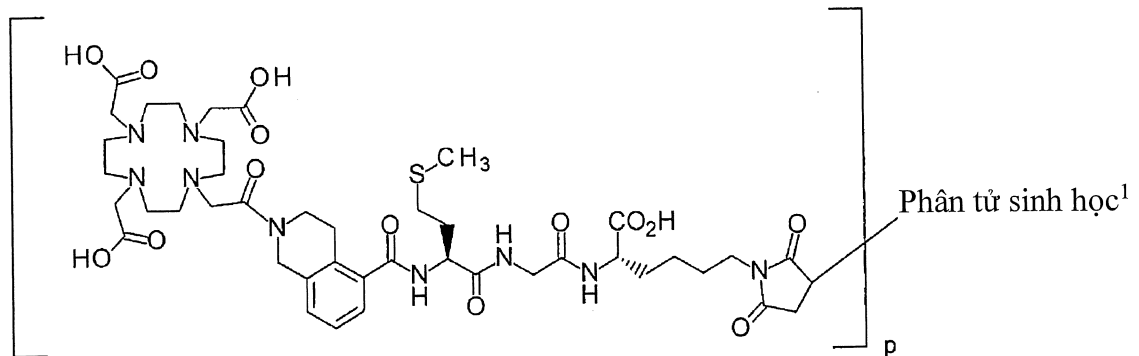
[Công thức hóa học 52]



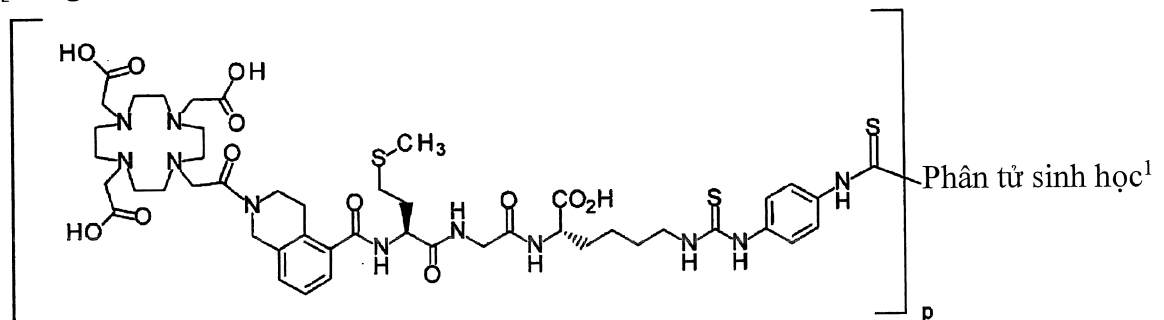
[Công thức hóa học 53]



[Công thức hóa học 54]



[Công thức hóa học 55]



[51-1] Thể tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [50], trong đó mỗi phân tử sinh học¹ và phân tử sinh học² là phân tử sinh học hoặc mảnh Fab của kháng thể khác với mảnh Fab của kháng thể:

(a) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và

(b) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và trong đó axit glutamic của axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

[51-2] Thể tiếp hợp theo mục [51-1], trong đó mỗi phân tử sinh học¹ và phân tử sinh học² là phân tử sinh học hoặc mảnh Fab của kháng thể không phải mảnh Fab của kháng thể sau:

(a) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và

(b) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và trong đó axit glutamic của axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4,

(c) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, hoặc

(b) mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và trong đó axit glutamic của axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ được thể hiện ở SEQ ID NO: 4.

[52] Thể tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [51-2], trong đó phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học² là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) và (b) sau:

(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16,

và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16.

[53] Thể tiếp hợp theo mục [52], trong đó phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học² là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) và (b) sau:

(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10; và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu

thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

[54] Thể tiếp hợp theo mục [53], trong đó phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học² mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người sau:

mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

(55) Thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (42) đến (54), trong đó p là số tự nhiên từ 1 đến 4.

[56] Thể tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [42] đến [55], trong đó kim loại được liên kết phối trí với DOTA¹.

[57] Thể liên hợp theo mục [56], trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

[58] Thể liên hợp theo mục [57], trong đó kim loại là ⁸⁹Zr.

[59] Thể tiếp hợp theo mục [56], trong đó kim loại là ion kim loại thuận từ.

[60] Thể tiếp hợp theo mục [59], trong đó kim loại là Gd³⁺.

[61] Thể tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [56] đến [60], trong đó thể tiếp hợp là chất đánh dấu PET.

[62] Dược phẩm chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [56] đến [61], và chất mang dược dụng.

[63] Chế phẩm chẩn đoán theo mục [62], trong đó chế phẩm chẩn đoán này được sử dụng làm thuốc chẩn đoán sớm hoặc thuốc chia giai đoạn.

[64] Chế phẩm chẩn đoán theo mục bất kỳ trong số các mục [62] hoặc [63], trong đó chế phẩm chẩn đoán được sử dụng để chẩn đoán bệnh liên quan đến phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học².

[65] Chế phẩm chẩn đoán theo mục [64], trong đó bệnh liên quan đến phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học² là bệnh liên quan đến MUC1.

[66] Chế phẩm chẩn đoán theo mục [65], trong đó chế phẩm chẩn đoán được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện MUC1.

[67] Chế phẩm chẩn đoán theo mục [66], trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, ung thư trực tràng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư cổ.

[68] Dược phẩm chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo bất kỳ trong số [56] đến [60], và chất mang dược dụng.

[69] Dược phẩm theo mục [68], trong đó dược phẩm được sử dụng để chẩn đoán bệnh liên quan đến phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học².

[70] Dược phẩm theo mục [69], trong đó bệnh liên quan đến phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học² là bệnh liên quan đến MUC1.

[71] Dược phẩm theo mục [70], trong đó dược phẩm này là dược phẩm để điều trị bệnh ung thư biểu hiện MUC1.

[72] Dược phẩm theo mục [71], trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, ung thư trực tràng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư cổ.

[73] Sử dụng trong số một hoặc nhiều theo mục bất kỳ trong số các mục [56] đến [60] để sản xuất chế phẩm chẩn đoán bệnh ung thư và/hoặc dược phẩm để điều trị bệnh ung thư.

[74] Thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [56] đến [60], trong đó thẻ tiếp hợp được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư và/hoặc điều trị bệnh ung thư.

[75] Phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm bước dùng một hoặc nhiều thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [56] đến [60] cho đối tượng.

[76] Phương pháp điều trị bệnh ung thư, bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu điều trị của thẻ tiếp hợp theo mục bất kỳ trong số các mục [56] đến [60] cho đối tượng.

Lợi ích của sáng chế

Thẻ tiếp hợp bao gồm mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, phân tử liên

kết peptit, và phối tử, và thể tiếp hợp bao gồm mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người và phối tử đặc hiệu được mô tả trong sáng chế có hoạt tính gắn kết đặc hiệu tuyệt vời với CEACAM5 của người. Do đó, thể tiếp hợp theo sáng chế còn bao gồm kim loại được kỳ vọng là hữu ích để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư. Ngoài ra, thể tiếp hợp bao gồm mảnh Fab của kháng thể MUC1 người, phân tử liên kết peptit, và phối tử được mô tả trong sáng chế có hoạt tính gắn kết tuyệt vời với MUC1 người. Thể tiếp hợp cấu thành từ DOTA 3 nhánh, thành phần đệm, phân tử liên kết peptit, và phân tử sinh học được mô tả trong sáng chế được bài tiết bởi thận một cách nhanh hơn. Do đó, thể tiếp hợp theo sáng chế còn bao gồm kim loại được kỳ vọng là hữu ích để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hình ảnh PET/CT thu được khoảng 3 giờ sau khi dùng dung dịch PBS chứa dung dịch thể tiếp hợp ^{64}Cu -protein (A).

Fig. 2 thể hiện hình ảnh PET/CT thu được khoảng 3 giờ sau khi dùng dung dịch PBS chứa dung dịch thể tiếp hợp ^{64}Cu -protein (B).

Fig. 3 thể hiện SUV.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây, nhưng sáng chế không bị giới hạn vào đó. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế sẽ có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

"Alkyl" có nghĩa là mạch hydrocacbon bão hòa thẳng hoặc mạch nhánh và có nghĩa là nhóm hóa trị một.

"C₁₋₆ alkyl" để chỉ alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, như metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, n-pentyl, hoặc n-hexyl. Theo một phương án C₁₋₆ alkyl là C₁₋₄ alkyl, theo một phương án C₁₋₆ alkyl là metyl hoặc etyl, và

theo một phương án C₁₋₆ alkyl là methyl.

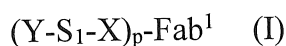
"C₁₋₆ alkylen" là nhóm hóa trị hai thu được bằng cách loại hydro ra khỏi C₁₋₆ alkyl nêu trên. Theo một phương án, C₁₋₆ alkylen là metylen, etylen, propylen, methylmetylen, hoặc tương tự.

"Halogen" có nghĩa là F, Cl, Br, hoặc I.

"Halo C₁₋₆ alkyl" là C₁₋₆ alkyl được thế bằng một hoặc nhiều halogen. Theo một phương án halo C₁₋₆ alkyl là C₁₋₆ alkyl được thế bằng 1 đến 5 halogens, và theo một phương án halo C₁₋₆ alkyl là CF₃.

1-1. Thể tiếp hợp theo sáng chế

Thể tiếp hợp theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau (I):



trong đó

Fab¹ là mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, và Fab¹ được gắn kết với X qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p ở Fab¹,

X là phần tử liên kết peptit hoặc liên kết,

S₁ là thành phần đệm hoặc liên kết,

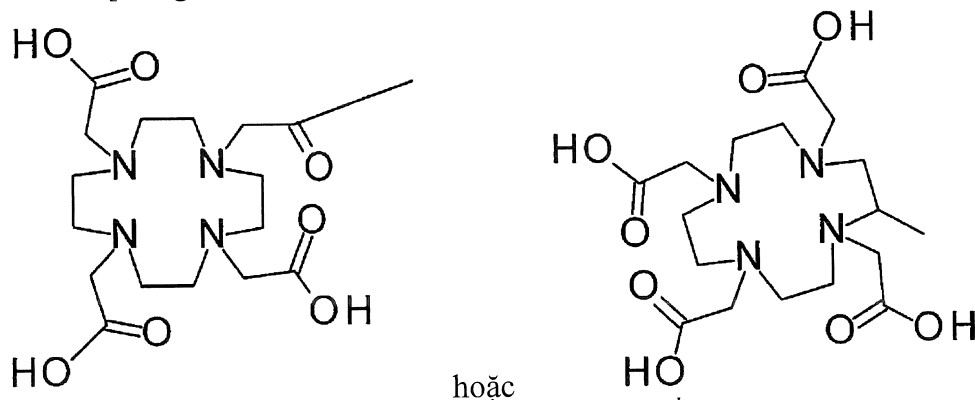
Y là phối tử, và

p là số tự nhiên từ 1 đến 25 và là số (Y-S₁-X) gắn kết với Fab¹,

với điều kiện khi X là liên kết, S₁ là -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)- hoặc liên kết, và

Y là nhóm được thể hiện bởi công thức sau

[Công thức hóa học 56]



Mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người (Fab¹)

Mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được thể hiện bởi "Fab¹" trong công thức (I) sẽ được mô tả.

Cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể là phổ biến đối với mỗi lớp và được cấu thành bởi chuỗi nặng có khối lượng phân tử từ 50.000 đến 70.000 và chuỗi nhẹ có khối lượng phân tử từ 20.000 đến 30.000. Chuỗi nặng thường cấu thành bởi mạch polypeptit bao gồm khoảng 440 axit amin, có cấu trúc đặc trưng đối với mỗi lớp, và được gọi là mạch γ , μ , α , δ , hoặc ϵ , lần lượt tương ứng với IgG, IgM, IgA, IgD, hoặc IgE. Hơn nữa, IgG bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, mà lần lượt được gọi là γ_1 , γ_2 , γ_3 , và γ_4 . Chuỗi nhẹ thường cấu thành bởi mạch polypeptit bao gồm khoảng 220 axit amin, và hai loại, loại L và loại K, là đã biết và lần lượt được gọi là mạch λ và κ . Cấu hình peptit của cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể là hai chuỗi nặng tương đồng và hai chuỗi nhẹ tương đồng mà được gắn kết bởi các liên kết disulfua (liên kết S-S) và liên kết không cộng hóa trị, và khối lượng phân tử là từ 150.000 đến 190.000. Hai chuỗi nhẹ có thể được cặp đối với chuỗi nặng bất kỳ. Mỗi phân tử kháng thể luôn được cấu thành bởi hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau.

Có bốn liên kết S-S trong mạch ở chuỗi nặng (năm liên kết đối với các mạch μ và ϵ) và hai liên kết S-S trong mạch ở chuỗi nhẹ; một vòng được tạo ra đối với mỗi 100 đến 110 gốc axit amin, và cấu trúc không gian này là giống trong số các vòng và được gọi là đơn vị cấu trúc hoặc miền. Các miền nằm ở đầu tận cùng N của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được gọi là các vùng biến đổi do trình tự axit amin của chúng không ổn định, ngay cả ở mẫu xác nhận từ cùng một lớp (phân lớp) của cùng một loài động vật, và các miền tương ứng của chúng được gọi là vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L). Trình tự axit amin nằm gần phía đầu tận cùng C hơn đầu tận cùng N gần như là ổn định đối với mỗi lớp hoặc phân lớp và được gọi là vùng ổn định, và mỗi miền trong số các miền được thể hiện bởi C_H1 , C_H2 , C_H3 , hoặc C_L .

Tính đặc hiệu của khả năng gắn kết kháng thể-kháng nguyên phụ thuộc vào trình tự axit amin của phần được cấu thành bởi V_H và V_L . Mặt khác, hoạt tính sinh học như gắn kết với các bề mặt và các tế bào khác nhau phản ánh sự khác biệt trong cấu trúc của các vùng ổn định giữa các lớp Ig. Nhận thấy rằng tính biến đổi trong các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hầu hết bị giới hạn bởi ba vùng siêu biến nhỏ có mặt ở cả hai chuỗi, và các vùng này được gọi là vùng xác định bổ thể (complementarity determining region - CDR; CDR1, CDR2, và CDR3 bắt đầu từ phía đầu tận cùng N). Phần còn lại của vùng biến đổi được gọi là vùng khung (framework region - FR) và tương đối ổn định.

Vùng nằm giữa miền C_{H1} và miền C_{H2} của vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể được gọi là vùng bản lề, và vùng này bao gồm nhiều gốc prolin và bao gồm nhiều liên kết S-S liên mạch nối hai chuỗi nặng. Ví dụ, mỗi vùng bản lề của IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 người lần lượt gồm 2, 4, 11, và 2 gốc xystein mà cấu thành các liên kết S-S liên chuỗi nặng. Vùng bản lề là vùng nhạy cảm cao với enzym phân giải protein như papain hoặc pepsin. Nếu kháng thể được phân hủy bằng papain thì chuỗi nặng của nó được phân cắt ở vị trí gần phía đầu tận cùng N hơn so với phía liên kết S-S liên chuỗi nặng của vùng bản lề, do đó kháng thể bị cắt thành hai mảnh Fab và một mảnh Fc. Mảnh Fab được cấu thành bởi chuỗi nhẹ và mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H), miền C_{H1} , và phần của vùng bản lề. Mảnh Fab bao gồm vùng biến đổi và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên.

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là mảnh Fab có đặc tính sau: mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Vì vùng ổn định chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế, nên vùng ổn định bất kỳ như

Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3, hoặc Ig γ 4 có thể được chọn. Theo một phương án, vùng ổn định chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là vùng ổn định Ig γ 1 của người.

Vì vùng ổn định chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế, nên vùng ổn định Ig λ hoặc Ig κ có thể được chọn. Theo một phương án, vùng ổn định chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là vùng ổn định Ig κ 1 của người.

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là mảnh Fab² sau:

mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người bao gồm mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 (để chỉ Fab²).

Đã biết rằng khi kháng thể, bao gồm mảnh Fab, được biểu hiện ở tế bào, thì kháng thể sẽ được cải biến sau dịch mã. Ví dụ về sự cải biến sau dịch mã bao gồm tách lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng bởi carboxypeptidaza, cải biến glutamin hoặc axit glutamic ở tận cùng N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng cách pyroglutamyl hóa, glycosylat hóa, oxy hóa, khử amit, và glycosylat hóa, và đã biết rằng sự cải biến sau dịch mã này xuất hiện ở các kháng thể khác nhau (J. Pharm. Sci.;2008;97:2426-2447).

Mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm mảnh Fab được sản sinh bằng cách cải biến sau dịch mã. Ví dụ về mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người theo sáng chế mà có thể được sản sinh bằng cách cải biến sau dịch mã bao gồm mảnh Fab được pyroglutamyl hóa của kháng thể CEACAM5 kháng người ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng. Đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật rằng sự cải biến sau dịch mã này bằng cách polyglutamyl hóa ở đầu tận cùng N không ảnh hưởng đến hoạt tính của kháng thể (Anal. Biochem.; 2006;348:24-39).

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người có đặc tính sau:

mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và trong đó axit glutamic của axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người có đặc tính sau:

mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và trong đó axit glutamic của axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

Theo phương án khác, mảnh kháng thể kháng CEACAM5 Fab được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người có đặc tính sau:

mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 31 đến 35 của SEQ ID NO: 2, CDR2 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 50 đến 66 của SEQ ID NO: 2, và CDR3 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 99 đến 110 của SEQ ID NO: 2, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 24 đến 38 của SEQ ID NO: 4, CDR2 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 54 đến 60 của SEQ ID NO: 4, và CDR3 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 93 đến 101 của SEQ ID NO: 4.

Mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế gắn kết với CEACAM5 của người. Ví dụ về phương pháp xác định

hoạt tính gắn kết của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người thu được với CEACAM5 của người bao gồm các phương pháp như phân tích bằng phương pháp cộng hưởng tử plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) và ELISA. Ví dụ, khi phân tích bởi phương pháp SPR được sử dụng, hằng số tốc độ gắn kết (k_a), hằng số tốc độ phân ly (k_d), và hằng số phân ly (K_D) có thể được xác định bằng cách bất động kit Biotin CAPture (GE Healthcare Japan Corporation) và CEACAM5 được biotinyl hóa của người trên chip cảm biến sử dụng Biacore T200 (GE Healthcare Japan Corporation) và bổ sung mảnh Fab được pha loãng theo dãy.

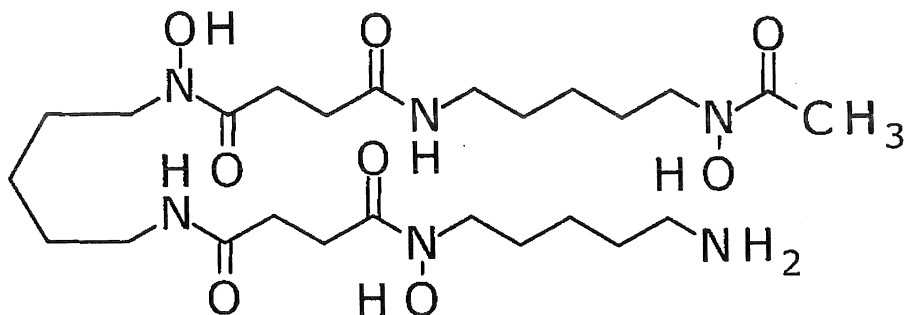
Mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được điều chế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào thông tin trình tự của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người theo sáng chế được bộc lộ ở đây. Mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và có thể được tạo ra, ví dụ, theo phương pháp được mô tả trong <Phương pháp sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế> được mô tả sau.

1-2. Phối tử

"Phối tử" là phần của thể tiếp hợp mà có thể tạo ra phức hợp chelat với kim loại và có nghĩa là nhóm được cấu thành bởi tác nhân chelat hóa. Nhóm được cấu thành để chỉ nhóm có liên kết do loại proton ra khỏi tác nhân chelat hóa. Nhóm được cấu thành bởi tác nhân chelat hóa gắn kết với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người một cách trực tiếp hoặc qua thành phần đệm và/hoặc phân tử liên kết peptit.

"Tác nhân chelat hóa" để chỉ hợp chất mà có thể liên kết phối trí với kim loại. Ví dụ về "tác nhân chelat hóa" được sử dụng ở đây bao gồm thể mang sắt và thể không mang sắt. Ví dụ về thể mang sắt bao gồm loại axit hydroxamic, loại catechol, và loại phối tử hỗn hợp. Ví dụ về loại axit hydroxamic thể mang sắt bao gồm ferrichrom, deferoxamin (DFO) được thể hiện bởi công thức sau:

[Công thức hóa học 57]

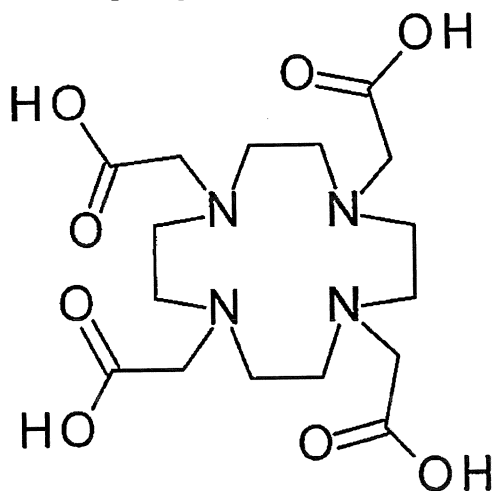


fusarinin C, ornibactin, và axit rhodotorulic. Các ví dụ về thể mang sắt loại catechol bao gồm enterobactin, bacillibactin, và vibriobactin. Các ví dụ về thể mang sắt loại phối tử hỗn hợp bao gồm azotobactin, pyoverdin, và yersiniabactin. Trong trường hợp thể mang sắt được mô tả ở trên, DFO có thể được phản ứng với thành phần đệm hoặc phần tử liên kết peptit qua $-NH_2$, mà là nhóm chức hoạt tính của nó, và trong trường hợp thể mang sắt không phải DFO, chúng cũng có thể được phản ứng với thành phần đệm hoặc phần tử liên kết peptit qua nhóm chức hoạt tính như nhóm carboxyl, nhóm hydroxyl, hoặc nhóm amino bằng phương pháp thường được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Ví dụ về thể không mang sắt bao gồm

DOTA (axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic, số CAS: 60239-18-1) được biểu diễn bởi công thức dưới đây:

[Công thức hóa học 58]

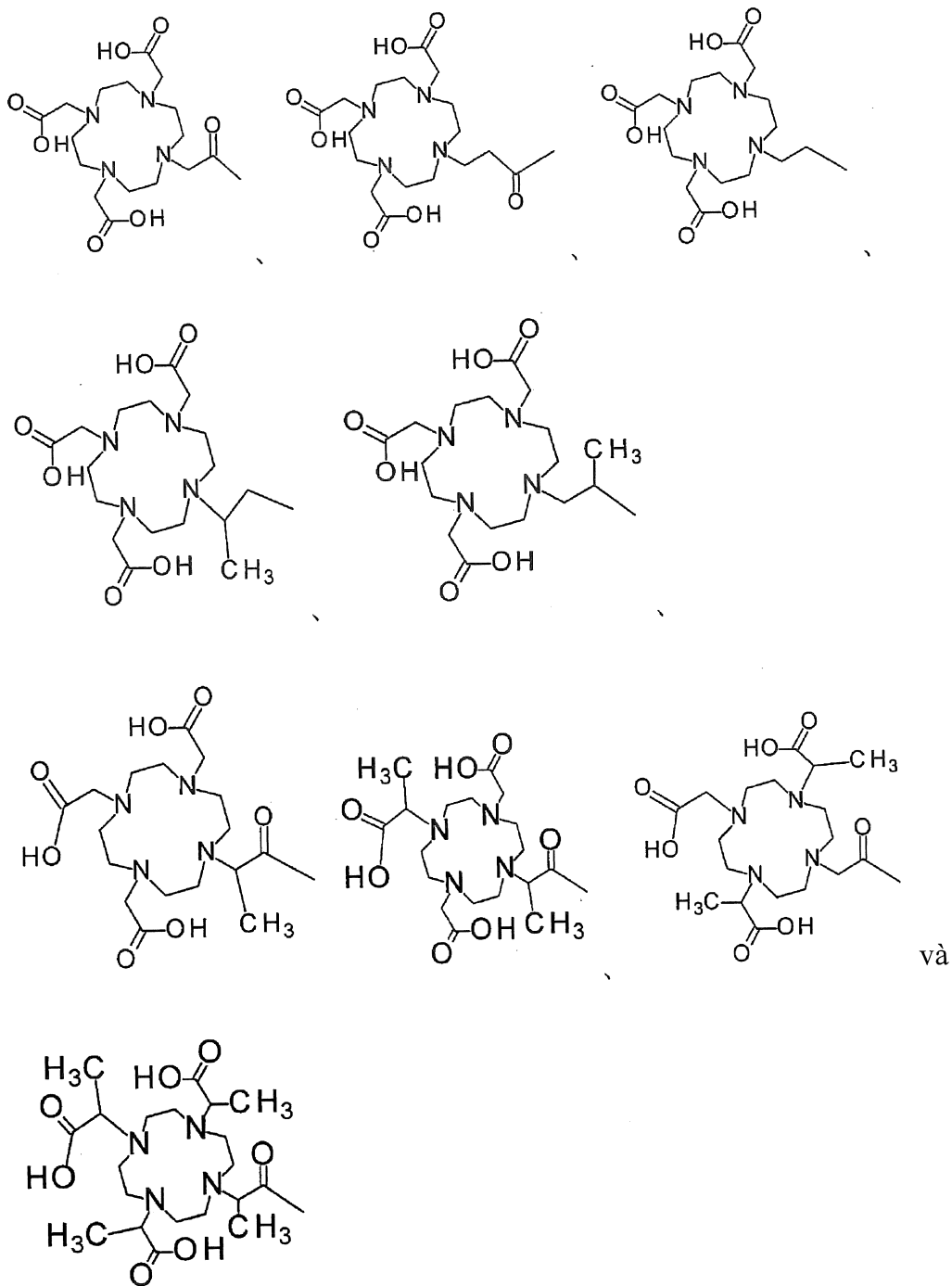


DTPA (axit diethylentriamin pentaaxetic, số CAS: 67-43-6), DTPA-BMA (axit 1,7-bis(methylcarbamoylmethyl)-1,4,7-triazaheptan-1,4,7-triaxetic, số CAS: 119895-95-3), EOB-DTPA (N-[(2S)-2-[bis(carboxymethyl)amino]-3-(4-etoxyphenyl)propyl]-N-[2-[bis(carboxymethyl)amino]etyl]glyxin, số CAS: 158599-72-5), TTHA (axit triethylentetramin hexaaxetic, số CAS: 869-52-3), DO3A (axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7-triaxetic, số CAS: 217973-03-0), HP-DO3A (axit 10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7-triaxetic, số CAS: 120041-08-9), và các dẫn xuất phản ứng đã biết của chúng.

DOTA có thể được phản ứng với thành phần đệm hoặc phân tử liên kết peptit qua một trong số các axit carboxylic mà là nhóm chức hoạt tính của chúng (sau đây, DOTA có ba axit carboxylic được gắn kết từ đó đôi khi được gọi là DOTA 3 nhánh (PLoS One. 2019 Mar 22;14(3):e0213397)).

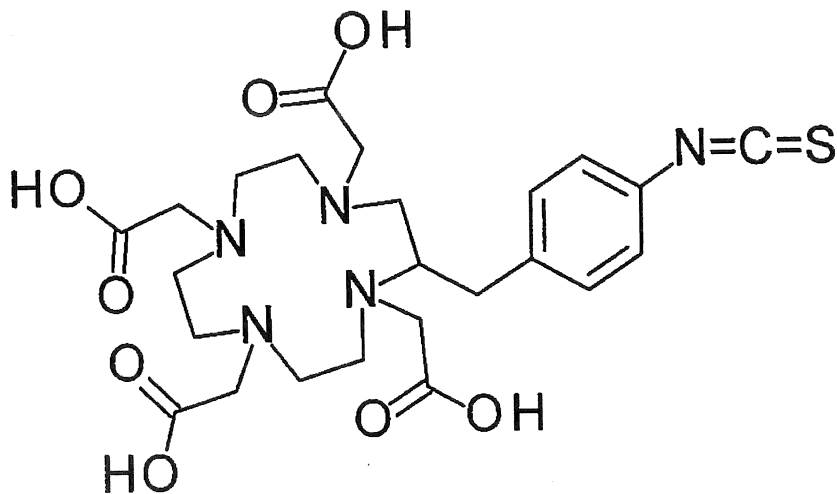
Trong số DOTA, ví dụ về DOTA 3 nhánh bao gồm các DOTA sau.

[Công thức hóa học 59]



Theo cách khác, DOTA trong đó bốn axit carboxylic được giữ lại (sau đây, đôi khi được gọi là DOTA 4 nhánh) sử dụng chất phản ứng p-SCN-Bn-DOTA có công thức sau cũng có thể được phản ứng với thành phần đệm hoặc phân tử liên kết peptit.

[Công thức hóa học 60]



Ví dụ về phương án của "tác nhân chelat hóa" tạo ra phối tử được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm DFO, DOTA, DTPA, DTPA-BMA, EOB-DTPA, DO3A, và HP-DO3A. Theo một phương án, tác nhân chelat hóa là DFO hoặc DOTA.

Các hợp chất và thể tiếp hợp ở đây cũng bao gồm ba dạng và muối của chúng, trừ khi được quy định theo cách khác. Ở đây, "muối của chúng" là muối mà, khi muối cộng axit hoặc muối với bazơ có thể được tạo ra phụ thuộc vào loại phần tử thể của hợp chất và thể tiếp hợp của chúng, có thể được tạo ra bởi hợp chất và thể tiếp hợp. Ví dụ cụ thể của chúng bao gồm muối cộng axit với các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit hydroiodic, axit sulfuric, axit nitric, và axit phosphoric; và với các axit hữu cơ như axit formic, axit axetic, axit propionic, axit oxalic, axit malonic, axit succinic, axit fumaric, maleic, axit lactic, axit malic, axit mandelic, axit tartaric, axit dibenzoyltartaric, axit ditoluoyltartaric, axit citric, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, axit aspartic và axit glutamic; và với các bazơ vô cơ như natri, kali, magie, canxi, và nhôm; muối với các bazơ hữu cơ như metylamin, etylamin, etanolamin, lysin, và ornithin; muối với các axit amin khác nhau và các dẫn xuất của axit amin như acetyleuxin; và các muối amoni. Ví dụ, DFO cũng tồn tại ở dạng deferoxamin metanesulfonat và dạng muối khác. DTPA tồn tại ở cả dạng

muối natri DTPA cũng như dạng tự do.

Thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm kim loại có thể được sử dụng đối với các tác nhân cản quang khác nhau và/hoặc các tác nhân trị liệu đối với bệnh ung thư, và được sử dụng, ví dụ, đối với tác nhân cản quang MRI và tác nhân sử dụng đối với chất đánh dấu PET.

Ví dụ về phương án của "tác nhân chelat hóa" khi được sử dụng đối với tác nhân cản quang MRI bao gồm tác nhân chelat hóa thể mang sắt và thể không mang sắt như được mô tả ở trên.

Ví dụ về phương án của "tác nhân chelat hóa" khi được sử dụng đối với chất đánh dấu PET bao gồm tác nhân chelat hóa thể mang sắt và thể không mang sắt như được mô tả ở trên, và theo một phương án, tác nhân chelat hóa là DFO hoặc DOTA.

Trong thể tiếp hợp theo sáng chế, tác nhân chelat hóa có thể bao gồm kim loại. Như được sử dụng ở đây, "kim loại" có nghĩa là ion kim loại thuận từ hoặc chất đồng vị phóng xạ kim loại. Kim loại không bị giới hạn cụ thể miễn là kim loại được liên kết phối trí với mỗi tác nhân chelat hóa. Dạng kết hợp thích hợp của tác nhân chelat hóa và kim loại được chọn theo mục đích sử dụng thể tiếp hợp.

Ion kim loại thuận từ được ưu tiên sử dụng đối với tác nhân cản quang MRI. Các ví dụ về các phương án của ion kim loại thuận từ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Rh^{2+} , Co^{2+} , Gd^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Tb^{3+} , Pm^{3+} , Nd^{3+} , Tm^{3+} , Ce^{3+} , Y^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , La^{3+} , Yb^{3+} , Mn^{3+} , và Mn^{2+} . Theo một phương án, ion kim loại thuận từ là Gd^{3+} , Mn^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , hoặc Fe^{3+} . Theo một phương án, ion kim loại thuận từ là Gd^{3+} . Theo một phương án, ion kim loại thuận từ là Mn^{3+} hoặc Mn^{2+} . Trong trường hợp này, halogen hoặc chất tương tự có thể được sử dụng làm anion trái dấu trong thể liên hợp. Ngoài ra, ion đôi có thể là phối tử C(=O)O^- , và hơn nữa, thể tiếp hợp có thể có cation đôi như Na^+ .

Chất đồng vị phóng xạ kim loại được sử dụng đối với chất đánh dấu PET và tương tự. Ví dụ về phương án của chất đồng vị phóng xạ kim loại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ^{89}Zr , ^{52}Mn , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , hoặc

^{177}Lu . Ví dụ về phương án của chất đồng vị phóng xạ kim loại sử dụng đối với chất đánh dấu PET, chất đánh dấu SPECT, và tương tự bao gồm ^{89}Zr , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, hoặc ^{111}In . Theo một phương án, chất đồng vị phóng xạ kim loại là chất đồng vị phóng xạ zirconium (Zr). Theo một phương án, chất đồng vị phóng xạ kim loại là ^{89}Zr . Ví dụ về phương án của chất đồng vị phóng xạ kim loại sử dụng để điều trị bệnh ung thư bao gồm ^{90}Y hoặc ^{177}Lu .

Phương án của thể tiếp hợp theo sáng chế là thể tiếp hợp trong đó Y là DFO mà ^{89}Zr được liên kết phối trí. Phương án khác là thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA mà chất đồng vị phóng xạ kim loại cấu thành từ ^{90}Y , ^{67}Ga , ^{68}Ga , và ^{177}Lu được liên kết phối trí với nó. Phương án khác nữa là thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA mà ion kim loại thuận từ cấu thành từ Gd^{3+} và Y^{3+} được liên kết phối trí với nó. Phương án khác nữa là thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA mà Gd^{3+} được liên kết phối trí với nó.

1-3. Phần tử liên kết peptit hoặc liên kết

Trong thể tiếp hợp theo sáng chế, phối tử (Y) hoặc thành phần đệm (S_1) và Fab¹ có thể được gắn kết một cách trực tiếp (tức là, X là liên kết), hoặc có thể được gắn kết qua phần tử liên kết peptit (tức là, X là phần tử liên kết peptit).

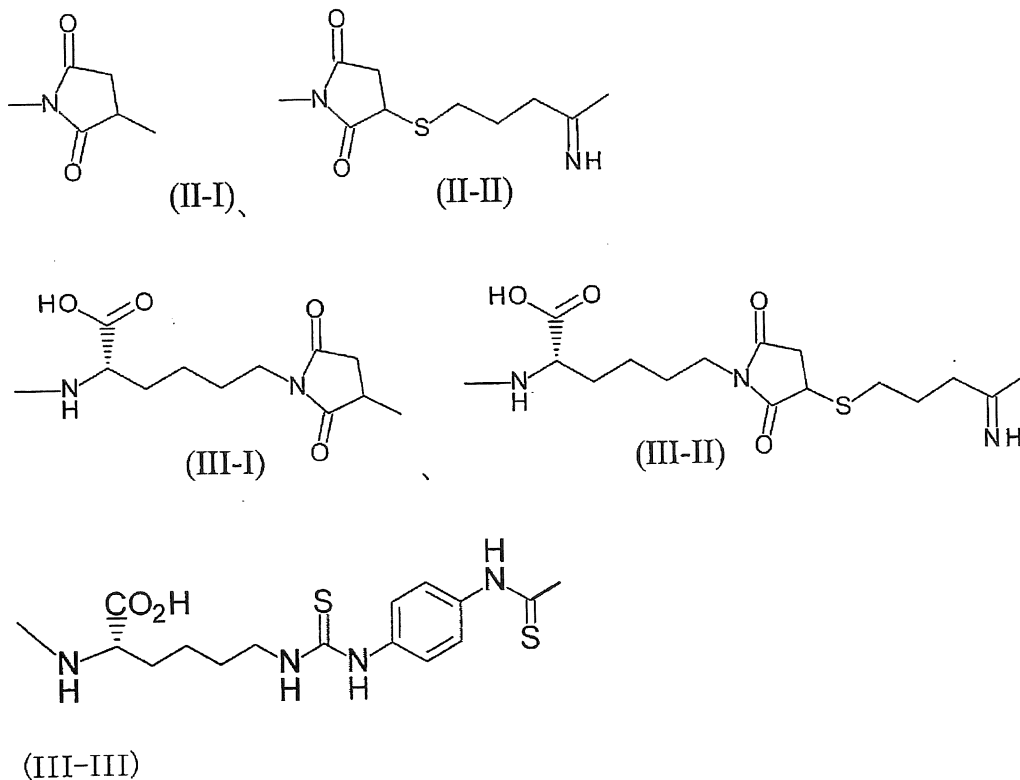
Như được sử dụng ở đây, "phần tử liên kết peptit" là phần tử liên kết bao gồm peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin, và, nếu muốn, có các điểm gắn Z_1 đến Z_3 hoặc tương tự thích hợp để gắn kết với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người. Ở đây, peptit được bao gồm trong phần tử liên kết peptit không bị giới hạn cụ thể, và tốt hơn là peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin, mỗi peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ glycine (Gly), lysine (Lys), methionine (Met), isoleucine (Ile), phenylalanine (Phe), valine (Val), tyrosine (Tyr), arginine (Arg), alanine (Ala), glutamine (Gln), axit glutamic (Glu), asparagine (Asn), axit aspartic (Asp), histidine (His) và leucine (Leu), 3-(2-naphthyl)alanine, và diphenylalanine, và tốt hơn là peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin, mỗi peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ glycine, lysine, methionine, isoleucine, phenylalanine, valine, tyrosine, axit aspartic, arginine, 3-(2-naphthyl)alanine, và diphenylalanine. Nếu không có quy định cụ thể khác, cấu hình của gốc axit amin không phải glycine là dạng L.

Phương án của phần tử liên kết peptit là phần tử liên kết peptit bao gồm peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin có trình tự axit amin được tách bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận hoặc enzym tiêu thể và hơn nữa có thể có điểm gắn xen kẽ nằm giữa phần tử liên kết peptit và phân tử sinh học hoặc mảnh Fab của kháng thể. Đã có thông báo rằng phần tử liên kết peptit có trình tự axit amin được tách bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận hoặc enzym tiêu thể được tách đặc hiệu bởi các enzym này có mặt ở thận, từ đó làm giảm sự tích lũy của phần đánh dấu ở thận và làm giảm nguy cơ phơi nhiễm của thận và rối loạn về thận có thể được dự kiến. Ví dụ, tài liệu *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Sep;60(12):1319-28., *Bioconjug Chem.* 2005 Nov-Dec;16(6):1610-6., và *Cancer Res.* 1999 Jan 1;59(1):128-34. bộc lộ rằng phần tử liên kết glyxin-lysin được tách đặc hiệu bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận có mặt ở thận. Patent Nhật số 6164556 bộc lộ rằng phần tử liên kết glyxin-phenylalanin-lysin được tách đặc hiệu ở thận bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận; ngoài ra, *Bioconjug Chem.* 2002 Sep-Oct;13(5):985-95. bộc lộ rằng phần tử liên kết bao gồm trình tự glyxin-leuxin-glyxin-lysin được tách đặc hiệu ở thận bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận; và ngoài ra, tài liệu *Bioconjug Chem.* 2013 Feb 20;24(2):291-9. bộc lộ rằng phần tử liên kết glyxin-tyrosin được tách đặc hiệu bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận. Hơn nữa, tài liệu *Bioconjug Chem.* 2014 Nov 19;25(11):2038-45. bộc lộ rằng phần tử liên kết bao gồm trình tự methionin-isoleuxin được tách đặc hiệu bởi enzym tiêu thể có mặt ở thận. Phương án của phần tử liên kết peptit là phần tử liên kết peptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm cấu thành từ methionin-isoleuxin, glyxin-lysin, glyxin-phenylalanin-lysin, methionin-valin-lysin, glyxin-tyrosin, glyxin-lysin-lysin, và glyxin-arginin-lysin, axit aspartic-glyxin-lysin, methionin-glyxin-lysin, methionin-isoleuxin-lysin, glyxin-tyrosin-lysin, glyxin-valin, glyxin-isoleuxin, methionin-phenylalanin-lysin, glyxin-(3-(2-naphtyl)alanin)-lysin, và glyxin-diphenylalanin-lysin. Một phương án là phần tử liên kết peptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm cấu thành từ methionin-isoleuxin axit aspartic-glyxin-lysin, glyxin-phenylalanin-lysin, methionin-glyxin-lysin, glyxin-lysin, và glyxin-(3-(2-naphtyl)alanin)-lysin.

"Phần tử liên kết peptit" có thể tùy ý có điểm gắn thích hợp để gắn kết với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, trong đó điểm gắn thích hợp để gắn kết với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người là nhóm tạo ra liên kết về mặt hóa hữu cơ giữa phần liên kết peptit và nhóm amino hoặc nhóm thiol của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, và một phương án của chúng là nhóm bao gồm nhóm dẫn xuất maleimit (ví dụ, nhóm được thể hiện bởi công thức (II-I) hoặc (II-II) sau) hoặc nhóm dẫn xuất isothioxyanat ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$) ở một đầu. Một phương án là $\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-phenylen})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$, hoặc $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-(1,4\text{-phenylen})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$, trong đó Z_1 được thể hiện bởi công thức (II-I) hoặc (II-II) sau. Hơn nữa, công thức sau (II-I) có thể được gọi là $-\text{Z}_1(\#N)-$, và công thức sau (II-II) có thể được gọi là $-\text{Z}_1(\#S)-$.

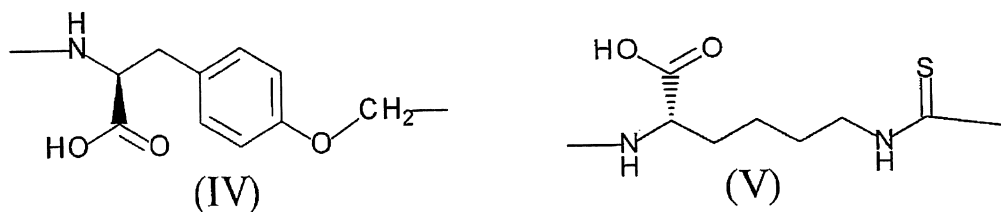
Điểm gắn tạo ra phần tử liên kết peptit bằng cách gắn kết với nhóm amino hoặc nhóm carboxyl của axit amin ở một đầu của peptit, hoặc với nhóm amino (ví dụ, lysin) hoặc nhóm hydroxyl (ví dụ, tyrosin) ở mạch bên của axit amin. Ví dụ về điểm gắn mà tạo ra phần tử liên kết peptit bằng cách gắn kết với nhóm chức ở mạch bên của axit amin ở một đầu của peptit bao gồm nhóm được thể hiện bởi công thức (III-I) hoặc (III-II) sau vì điểm gắn được hợp nhất với Lys, và ở đây, hai nhóm này được gọi chung là $-\text{Lys}^*-\text{Z}_2-$. Công thức (III-I) sau có thể được gọi là $-\text{Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$, và công thức sau (III-II) có thể được gọi là $-\text{Lys}^*-\text{Z}_2(\#S)-$. Công thức (III-III) sau có thể được gọi là $-\text{Lys}^*-\text{Z}_3-$.

[Công thức hóa học 61]



Hơn nữa, ở đây, theo cách tương tự, nhóm được thể hiện bởi công thức (IV) sau và nhóm được thể hiện bởi công thức (V) sau mà có cấu trúc trong đó nhóm chức ở mạch bên của axit amin tận cùng và điểm gắn được gắn kết lần lượt được gọi là -Tyr*-CH₂- và -Lys*-C(=S)-.

[Công thức hóa học 62]



Phương án của phân tử liên kết peptit "X" là phân tử liên kết peptit bao gồm điểm gắn. Một phương án là phân tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,

- (4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-,
- (7) -Gly-Arg-Lys*-Z₂-,
- (8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,
- (13) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-Lys*-Z₂-,
- (14) -Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (15) -Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (16) -Gly-Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (17) -Gly-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-,
- (19) -Gly-Tyr-Lys*-Z₂-,
- (20) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-,
- (22) -Gly-diphenylalanin-Lys*-Z₂-,
- (23) -Gly-Tyr-NH-(CH₂)₅-Z₁-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
- (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Hơn nữa, phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-,
- (7) -Gly-Arg-Lys*-Z₂-,
- (8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-, và
- (9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-.

Một phương án là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
- (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (7) -Gly-Arg-Lys*-Z₂-,

- (8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,
- (10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,
- (13) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-Lys*-Z₂-,
- (14) -Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (15) -Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (16) -Gly-Val-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (17) -Gly-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-,
- (19) -Gly-Tyr-Lys*-Z₂-,
- (20) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-,
- (22) -Gly-diphenylalanin-Lys*-Z₂-,
- (23) -Gly-Tyr-NH-(CH₂)₅-Z₁-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
- (27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-,

(7) -Gly-Arg-Lys*-Z₂-, và

(8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(2) -Gly-Lys*-Z₂-,

(3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,

(10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,

(11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-, và

(21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(2) -Gly-Lys*-Z₂-,

(3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,

(5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-, và

(8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(2) -Gly-Lys*-Z₂-,

(3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,

(5) -Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(6) -Gly-Lys-Lys*-Z₂-,

(8) -Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,

(24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,

(25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,

(26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,

(27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và

(28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(2) -Gly-Lys*-Z₂-,

(3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,

(9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,

(10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,

(11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,

(12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,

(21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-,

(24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,

(25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,

(26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,

(27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và

(28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,

(9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,

(11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,

(12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,

(18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-,

(24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,

(25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,

(26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,

(27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và

(28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(1) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,

(9) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-NH-C(=S)-NH-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-,

(12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,

(24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,

(25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,

(26) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-, và

(27) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(4) -Met-Val-Lys*-Z₂-,

(11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,

(18) -Met-Phe-Lys*-Z₂-, và

(28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Phương án của phần tử liên kết peptit "X" là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

(11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-, và

(28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

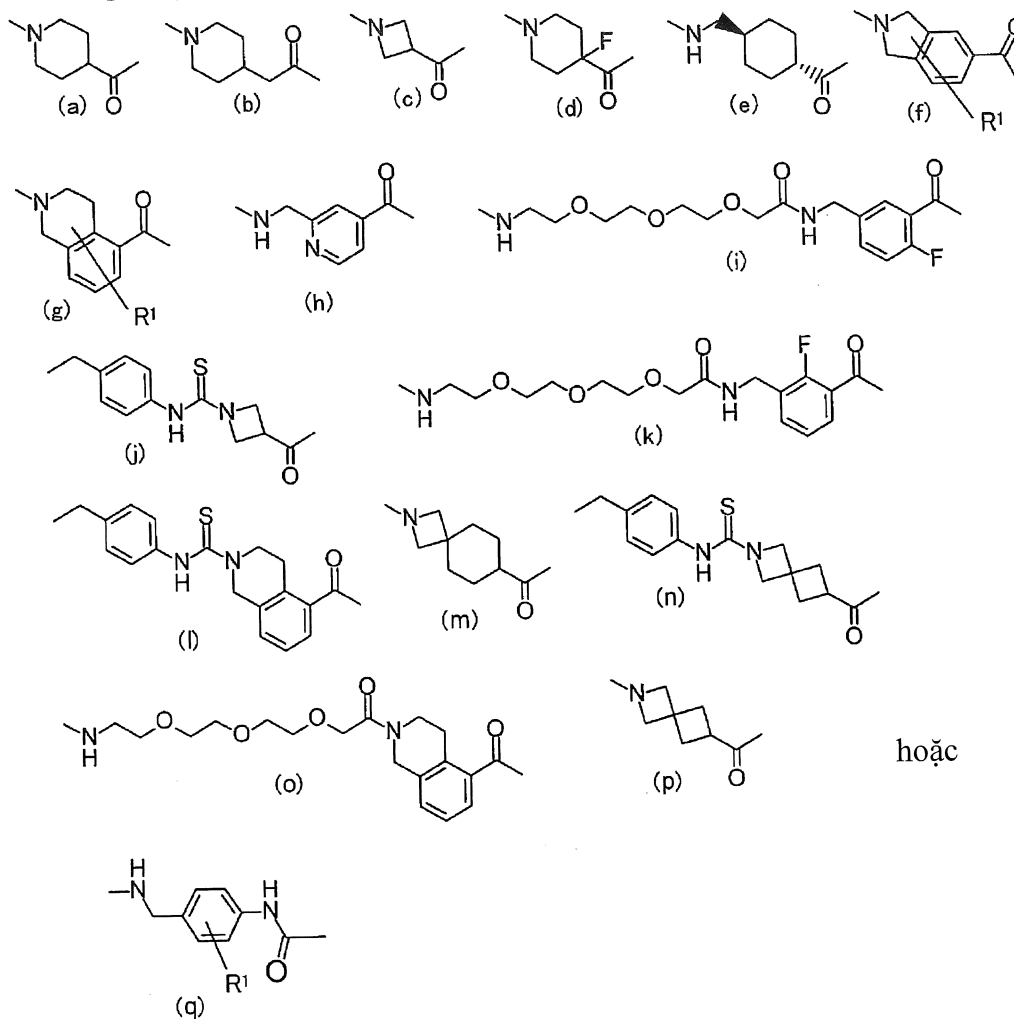
1-4. Thành phần đệm hoặc liên kết (S₁)

Trong thể tiếp hợp theo sáng chế, phối tử (Y) và phần tử liên kết peptit (X) được gắn kết trực tiếp (tức là, S₁ là liên kết) hoặc được gắn kết qua thành phần đệm (tức là, S₁ là thành phần đệm).

Như được sử dụng ở đây, "thành phần đệm" S₁ là nhóm được đưa vào để tạo ra khoảng cách nhất định giữa phối tử và phần tử liên kết peptit hoặc Fab¹ hoặc để gắn kết giữa phối tử và phần tử liên kết peptit, và ví dụ về một phương án của chúng bao gồm

-C(=O)-CH₂O-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -C(=O)-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-(CH₂)₂-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-, -NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-, -NH-(CH₂)₃-C(=O)-, -NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-, -NH-CH₂-(1,4-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-phenylen)-C(=O)-, và các thành phần đệm được thể hiện bởi các công thức (a) đến (q) sau.

[Công thức hóa học 63]



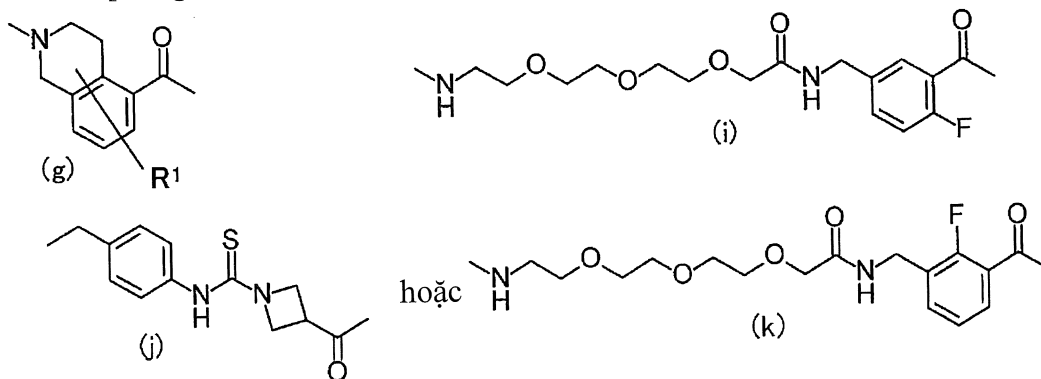
Theo một phương án, S₁ là -C(=O)-CH₂O-(1,3-phenylen)-C(=O)-, -C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-(1,3-phenylen)-C(=O)-, hoặc -C(=O)-(1,3-phenylen)-C(=O)-. Theo một

phương án, S_1 là $\text{NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(=O)-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-C(=O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, hoặc thành phần đệm được thể hiện bởi công thức bất kỳ trong số các công thức (a) đến (q) nêu trên. Theo một phương án, S_1 là $\text{NH-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-}$ hoặc thành phần đệm được thể hiện bởi công thức (g), (i), hoặc (k) nêu trên.

Theo một phương án, S_1 là $\text{-C(=O)-CH}_2\text{O-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, $\text{-C(=O)-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_4\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-C(=O)-}$, hoặc $\text{-C(=O)-(1,3-phenylen)-C(=O)-}$, hoặc

là

[Công thức hóa học 64]

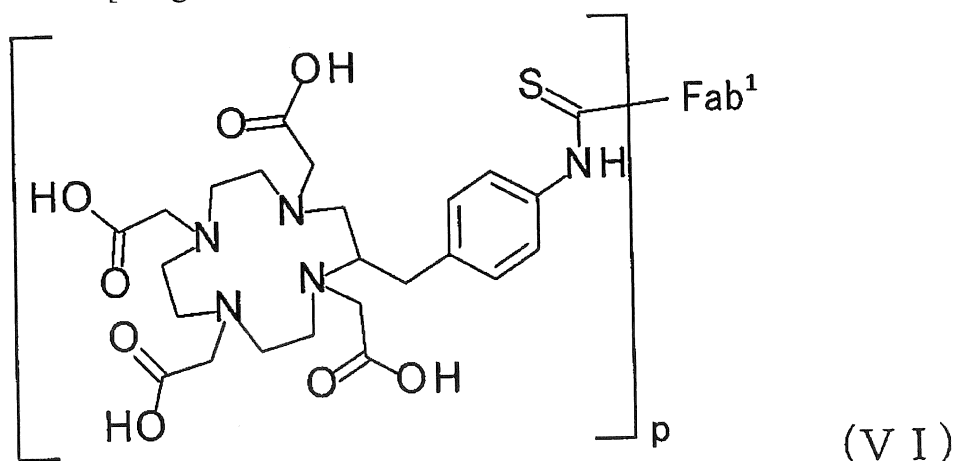


Theo một phương án, S_1 là liên kết.

Ngoài ra, trong thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA theo sáng chế, DOTA và mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người (Fab¹) có thể được gắn kết một cách trực tiếp hoặc gắn kết qua thành phần đệm ($\text{-CH}_2\text{-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-}$). Tuy nhiên, thể tiếp hợp trong đó DOTA và mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng

người (Fab¹) được gắn kết qua -CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=S)-, là thành phần đệm, là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau (VI).

[Công thức hóa học 65]



Ngoài ra, thành phần đệm S₁ được mô tả ở đây bao gồm thành phần đệm mới và các thành phần đệm được thể hiện bởi các công thức (g) và (l), mà là đặc biệt hữu ích làm thành phần đệm khi DOTA được gắn kết với phân tử liên kết peptit bao gồm peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin có trình tự axit amin được tách bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận hoặc enzym tiêu thể. Như được thể hiện ở thử nghiệm đánh giá sự tích lũy ở thận của Ví dụ 4 được mô tả dưới đây, trong thể tiếp hợp trong đó phân tử liên kết peptit được tách bởi enzym được kết hợp với DOTA và thành phần đệm được thể hiện bởi công thức (g), đã xác nhận được rằng sự tích lũy của phần đánh dấu ở thận được giảm xuống. Theo một phương án, S₁ là thành phần đệm được thể hiện bởi công thức (g) hoặc (l).

Phương án của thể tiếp hợp theo sáng chế là thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA, S₁ là thành phần đệm được thể hiện bởi công thức (g) hoặc (l), và X là phân tử liên kết peptit bao gồm peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin có trình tự axit amin được tách bởi enzym rìa bàn chải ở thận hoặc enzym tiêu thể.

Một phương án của nó là thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA, S₁ là thành phần đệm được thể hiện bởi công thức (g) hoặc (l), và X là phân tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (2) -Gly-Lys*-Z₂-,
- (3) -Gly-Phe-Lys*-Z₂-,
- (10) -Asp-Gly-Lys*-Z₂-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-, và
- (21) -Gly-(3-(2-naphtyl)alanin)-Lys*-Z₂-.

Một phương án là thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA, S₁ là NH-CH₂-(1,4-phenylen)-NH-C(=O)- hoặc thành phần đệm được thể hiện bởi công thức bất kỳ trong số các công thức (g), (i), hoặc (k), và X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

- (1)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁-,
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-,
- (12) -Met-Ile-Lys*-Z₂-,
- (24) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4)-,
- (25) -Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-5)-,
- (26)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(II-II)-,
- (27)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)-, và
- (28)-Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Một phương án là thể tiếp hợp trong đó Y là DOTA, S₁ là thành phần đệm được thể hiện bởi công thức (g), và X là phần tử liên kết peptit được chọn từ nhóm cấu thành từ

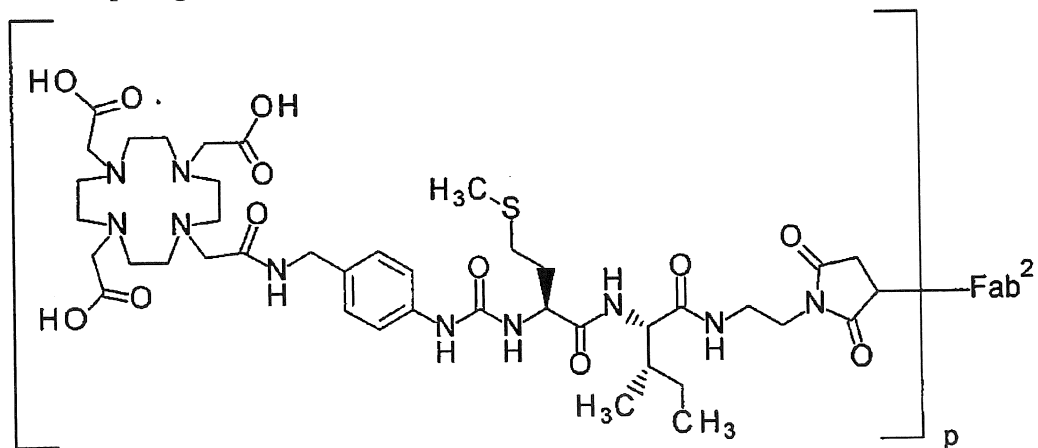
- (11) -Met-Gly-Lys*-Z₂-, và
- (28) -Met-Gly-Lys*-Z₃-.

Thể tiếp hợp theo sáng chế cấu thành từ việc kết hợp các phương án nêu trên. Các phương án cụ thể của thể tiếp hợp theo sáng chế là như sau. Trong các công thức, Fab² là mảnh Fab chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

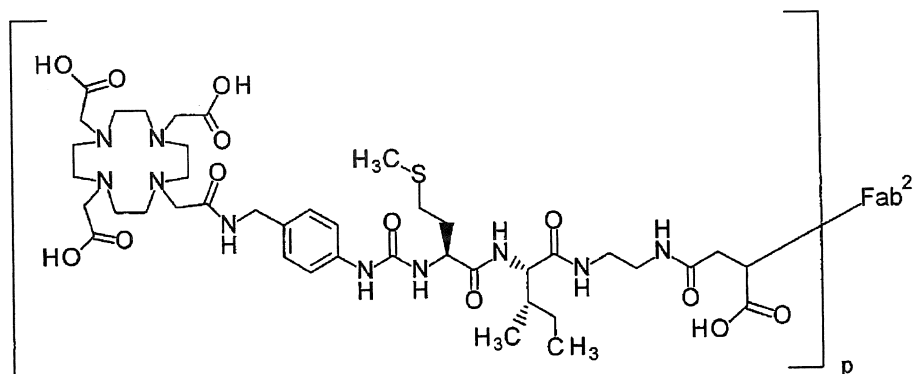
p là số tự nhiên từ 1 đến 25. Fab² được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm

amin hoặc nhóm thiol p ở Fab².

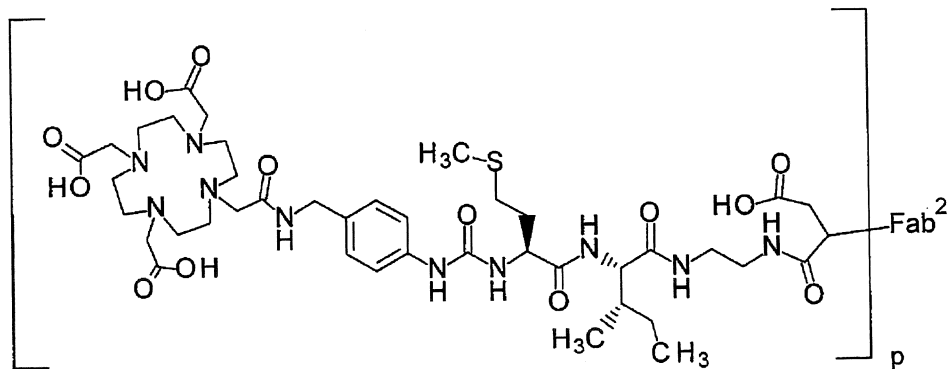
[Công thức hóa học 66]



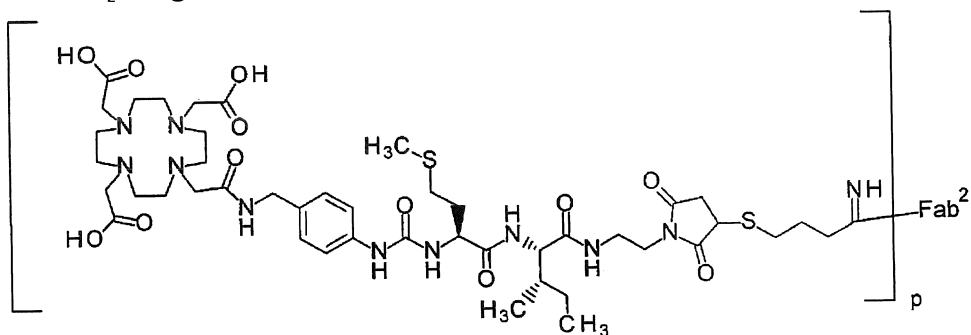
[Công thức hóa học 67]



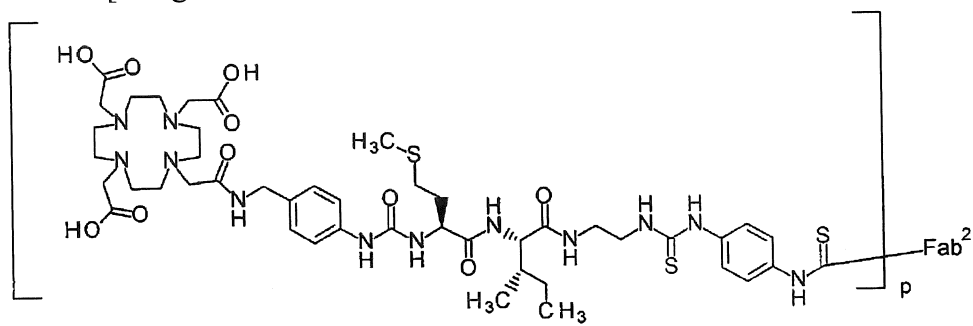
[Công thức hóa học 68]



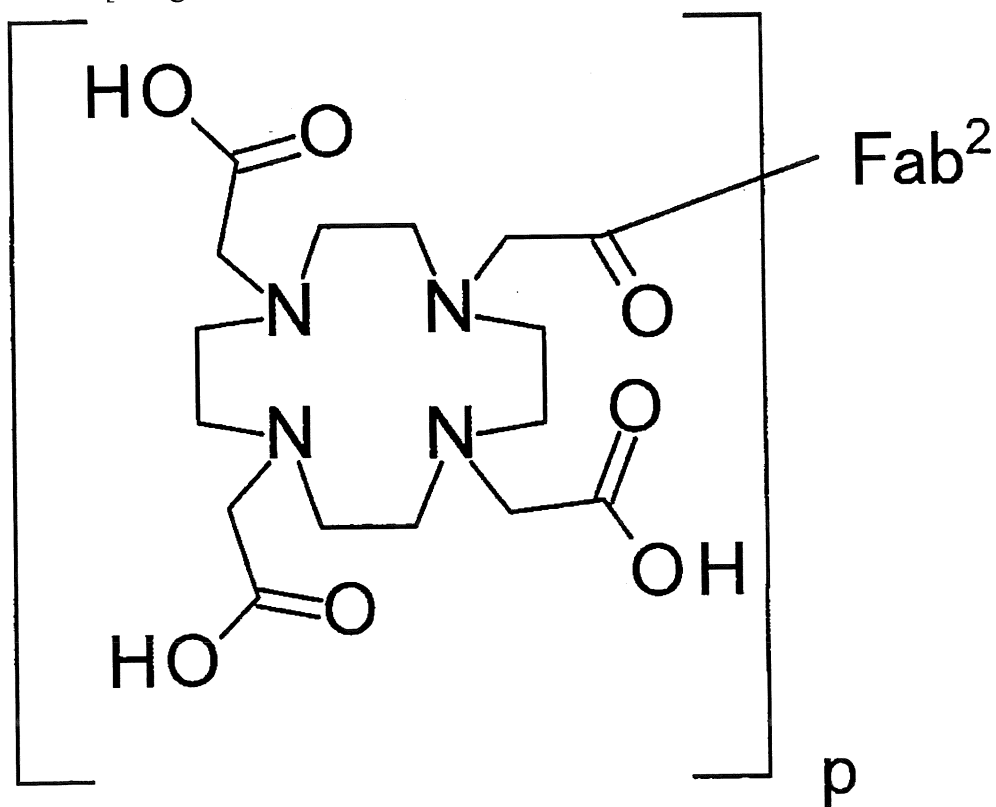
[Công thức hóa học 69]



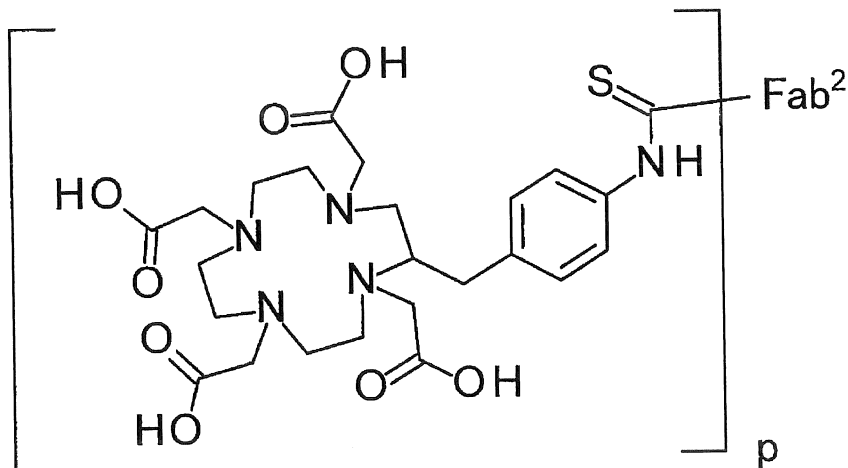
[Công thức hóa học 70]



[Công thức hóa học 71]



[Công thức hóa học 72]



Phần đánh dấu của dạng kết hợp trong đó Y là DOTA, S₁ là thành phần đệm được thể hiện bởi công thức (g) hoặc (l), và X là phần tử liên kết peptit bao gồm peptit cấu thành từ 2 đến 4 axit amin có trình tự axit amin được tách bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận hoặc enzym tiêu thể là hữu ích làm phần đánh dấu mà được kỳ vọng là làm giảm độc tính ở thận và tương tự ở các thể tiếp hợp tương tự sử dụng các kháng thể Fab khác nhau mà không bị giới hạn ở dạng kết hợp với Fab¹ theo sáng chế, và sáng chế cũng bao gồm việc phát hiện ra chính phần đánh dấu.

Trong quá trình sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế, quá trình gắn kết của mảnh kháng thể kháng CEACAM5 Fab với phối tử, thành phần đệm và/hoặc phần tử liên kết peptit, và quá trình gắn kết của phối tử với thành phần đệm và/hoặc phần tử liên kết peptit có thể được tiến hành thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bằng phương pháp đã biết.

Như được sử dụng ở đây, "phần đánh dấu" có nghĩa là, ví dụ, phần không phải Fab¹ trong công thức (I) và phần không phải phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học² trong công thức (Ia) hoặc (Ib). Phần đánh dấu là (i) phối tử và phần tử liên kết peptit (Y-S₁-X: trong đó S₁ là liên kết và X là phần tử liên kết peptit), (ii) phối tử (Y-S₁-X: trong đó S₁ và X là mỗi liên kết), hoặc (iii) phối tử, thành phần đệm, và phần tử liên kết peptit (Y-S₁-X: trong đó S₁ là thành phần đệm và X là phần tử liên kết peptit). Theo một phương án, phần đánh dấu là (ii) phối tử. Theo một phương án, phần đánh

đầu là (i) phối tử và phần tử liên kết peptit hoặc (iii) phối tử, thành phần đệm, và phần tử liên kết peptit. Ở đây, phối tử của "phần đánh dấu" có thể còn bao gồm kim loại, và một số phương án là (i) phối tử bao gồm kim loại và phần tử liên kết peptit, (ii) phối tử, hoặc (iii) phối tử, thành phần đệm, và phần tử liên kết peptit, và còn là (i) phối tử tạo ra phức hợp chelat với kim loại và phần tử liên kết peptit, (ii) phối tử tạo ra phức hợp chelat với kim loại, hoặc (iii) phối tử tạo ra phức hợp chelat với kim loại, thành phần đệm, và phần tử liên kết peptit. Hơn nữa, có trường hợp của (iv) phần tử liên kết peptit trong đó thành phần đệm còn được bao gồm trong phần tử liên kết peptit. Ngoài ra, trong công thức (Ia) hoặc (Ib), phần đánh dấu có nghĩa là phần không phải phân tử sinh học¹ hoặc phân tử sinh học².

1-5. Số lượng (p) của phần đánh dấu (Y-S₁-X) gắn kết với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người (Fab¹) và số lượng (p) của phần đánh dấu gắn kết với phân tử sinh học¹ và phân tử sinh học² có công thức (Ia) hoặc (Ib)

Thể tiếp hợp theo sáng chế là thể tiếp hợp trong đó một hoặc nhiều phần đánh dấu (Y-S₁-X) được gắn kết qua một hoặc nhiều nhóm amino hoặc nhóm thiol trong mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người (Fab¹). Ngoài ra, thể tiếp hợp theo sáng chế là thể tiếp hợp trong đó một hoặc nhiều phần đánh dấu được gắn kết qua một hoặc nhiều nhóm amino hoặc nhóm thiol trong phân tử sinh học¹ và phân tử sinh học² có công thức (Ia) hoặc (Ib). Thể tiếp hợp theo sáng chế có thể là hỗn hợp của các thể tiếp hợp trong đó số lượng của các phần đánh dấu gắn kết là khác nhau, và điều này chỉ ra rằng thể tiếp hợp này là thể tiếp hợp bất kỳ trong đó 1 đến 25 phần đánh dấu (Y-S₁-X) được gắn kết với Fab¹ trong công thức (I) hoặc hỗn hợp của chúng. Đối với một Fab¹, thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm 1 đến 25 phần đánh dấu (Y-S₁-X) theo một phương án, bao gồm 1 đến 23 phần đánh dấu (Y-S₁-X) theo một phương án, bao gồm 1 đến 15 phần đánh dấu (Y-S₁-X) theo một phương án, bao gồm 1 đến 11 phần đánh dấu (Y-S₁-X) theo một phương án, bao gồm 1 đến 9 phần đánh dấu (Y-S₁-X) theo một phương án, bao gồm 1 đến 7 phần đánh dấu (Y-S₁-X) theo một phương án, bao gồm 1 đến 5 phần đánh dấu (Y-S₁-X) theo một phương án, và hơn nữa, bao gồm 1 đến 4 phần đánh

dấu (Y-S₁-X) theo một phương án.

Đã chỉ ra rằng trong công thức (Ia) hoặc (Ib), phân tử sinh học¹ và phân tử sinh học² là Fab¹ bất krong đó 1 đến 25 phần đánh dấu được gắn kết hoặc hỗn hợp của chúng. Đối với một phân tử sinh học¹ và phân tử sinh học², thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm 1 đến 25 phần đánh dấu theo một phương án, bao gồm 1 đến 23 phần đánh dấu theo một phương án, bao gồm 1 đến 15 phần đánh dấu theo một phương án, bao gồm 1 đến 11 phần đánh dấu theo một phương án, bao gồm 1 đến 9 phần đánh dấu theo một phương án, bao gồm 1 đến 7 phần đánh dấu theo một phương án, bao gồm 1 đến 5 phần đánh dấu theo một phương án, và hơn nữa, bao gồm 1 đến 4 phần đánh dấu theo một phương án.

Tức là, "p" là số phần đánh dấu (Y-S₁-X) gắn kết với một Fab¹ và "p" là số phần đánh dấu gắn kết với một phân tử sinh học¹ và phân tử sinh học² là giống hoặc khác nhau và mỗi chúng là số tự nhiên từ 1 đến 25 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 23 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 15 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 11 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 9 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 7 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 6 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 5 theo một phương án, là số tự nhiên từ 1 đến 4 theo một phương án, và hơn nữa, là số tự nhiên từ 1 đến 3 theo một phương án.

2. Polynucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế được mã hóa bởi polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người.

Theo một phương án, polynucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến

đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, hoặc polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit của các nucleotit 1 đến 363 của SEQ ID NO: 1. Ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4 bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit của các nucleotit 1 đến 336 của SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án, polynucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, hoặc polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

Ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 1. Ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 3.

Polynucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp gen đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào trình tự nucleotit được thiết kế dựa vào trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người. Phương pháp tổng hợp gen như vậy, các

phương pháp khác nhau đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật như phương pháp tổng hợp gen kháng thể được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế số 90/07861 có thể được sử dụng.

3. Vectơ biểu hiện của polynucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế

Vectơ biểu hiện của polynucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, và vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người.

Ví dụ về các vectơ biểu hiện ưu tiên bao gồm vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Các vectơ biểu hiện ưu tiên bao gồm vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự

nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4, và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

Các vector biểu hiện này không bị giới hạn cụ thể với điều kiện chúng có thể sản sinh polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế ở các tế bào chủ khác nhau của tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình và/hoặc tế bào sinh vật có nhân điển hình. Ví dụ về các vector biểu hiện như vậy bao gồm vector plasmit và vector virus (ví dụ, adenovirus hoặc retrovirus), và tốt hơn là pEE6.4 hoặc pEE12.4 (Lonza) có thể được sử dụng.

Ngoài ra, các vector biểu hiện này có thể bao gồm trình tự khởi động được liên kết hoạt động với gen mã hóa mảnh chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của polynucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế. Ví dụ về trình tự khởi động để biểu hiện mảnh Fab trong tế bào chủ bao gồm, khi tế bào chủ là vi khuẩn của chi *Escherichia*, trình tự khởi động Trp, trình tự khởi động lac, trình tự khởi động recA, trình tự khởi động λ PL, trình tự khởi động lpp, và trình tự khởi động tac. Ví dụ về trình tự khởi động để biểu hiện ở nấm men bao gồm trình tự khởi động PH05, trình tự khởi động PGK, trình tự khởi động GAP, và trình tự khởi động ADH, và ví dụ về trình tự khởi động để biểu hiện ở vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* bao gồm trình tự khởi động SL01, trình tự khởi động SP02, và trình tự khởi động penP. Ngoài ra, các ví dụ của chúng bao gồm, khi vật chủ là tế bào sinh vật có nhân điển hình như tế bào động vật có vú, trình tự khởi động có nguồn gốc từ virus như CMV, RSV, hoặc SV40, trình tự khởi động retrovirus, trình tự khởi động actin, trình tự khởi động EF (yếu tố kéo dài) 1α , và trình tự khởi động sốc nhiệt.

Các vector biểu hiện này có thể còn bao gồm, khi vi khuẩn, đặc biệt là *E. coli*, được sử dụng làm tế bào chủ, codon khởi đầu, codon kết thúc, vùng tận cùng, và đơn vị sao chép. Mặt khác, khi nấm men, tế bào động vật, hoặc tế bào côn trùng được sử dụng

dùng làm vật chủ, thì vector biểu hiện có thể bao gồm codon khởi đầu và codon kết thúc. Ngoài ra, trong trường hợp này, vector biểu hiện có thể bao gồm trình tự tăng cường, các vùng không dịch mã 5' và 3' của gen mã hóa mảnh chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ theo sáng chế, trình tự tín hiệu tiết, điểm nối, vị trí polyadenyl hóa, hoặc đơn vị sao chép, hoặc tương tự. Ngoài ra, vector biểu hiện có thể bao gồm chất đánh dấu chọn lọc thường được sử dụng phụ thuộc vào mục đích nhất định (ví dụ, gen kháng tetracyclin, gen kháng ampicillin, gen kháng kanamycin, gen kháng neomycin, hoặc gen dihydrofolat reductaza).

4. Tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện.

Các tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm tế bào chủ được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) đến (d) sau:

- (a) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người;
- (b) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người;
- (c) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người; và
- (d) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện là tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) đến (d) sau:

- (a) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình

tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2;

(b) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4;

(c) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4; và

(d) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện là tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) đến (d) sau:

(a) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2;

(b) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4;

(c) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong

SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4; và

(d) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

Ví dụ về tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện ưu tiên bao gồm tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế, và tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế.

Tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện không bị giới hạn cụ thể với điều kiện nó tương hợp với vector biểu hiện đã được sử dụng và có thể được biến nạp bằng vector biểu hiện để biểu hiện mảnh Fab, và ví dụ của chúng bao gồm các tế bào khác nhau như tế bào tự nhiên hoặc tế bào được thiết lập nhân tạo (ví dụ, vi khuẩn (vi khuẩn thuộc chi *Escherichia* hoặc vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*), nấm men (thuộc chi *Saccharomyces*, chi *Pichia*, hoặc tương tự), và tế bào động vật hoặc tế bào côn trùng (ví dụ, Sf9)), dòng tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào được nuôi cấy như tế bào CHO-K1SV, tế bào CHO-DG44, hoặc tế bào 293) thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Bản thân việc biến nạp có thể được thực tiến hành bằng phương pháp đã biết, như phương pháp canxi phosphat hoặc phương pháp điện di.

5. Phương pháp sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao

gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế.

Việc sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ biến nạp được mô tả nêu trên để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người.

Theo một phương án, tế bào chủ biến nạp được nuôi cấy trong quá trình sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) đến (c) sau:

- (a) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế;
- (b) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế; và
- (c) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế, và tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể CEACAM5 kháng người Fab flagmen được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế.

Theo một phương án, tế bào chủ biến nạp được nuôi cấy trong quá trình sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) đến (c) sau:

- (a) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành

từ các trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4;

(b) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4; và

(c) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện bởi axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, tế bào chủ biến nạp được nuôi cấy trong quá trình sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) đến (c) sau:

(a) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4;

(b) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4; và

(c) tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình

tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, và tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

Tế bào chủ biến nạp sử dụng tốt hơn là tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế, hoặc tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế.

Trong quá trình sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế, các tế bào chủ được biến nạp có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng. Môi trường dinh dưỡng tốt hơn là chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn nitơ hữu cơ, cần thiết cho sự sinh trưởng của tế bào chủ được biến nạp. Ví dụ về nguồn cacbon bao gồm glucoza, dextran, tinh bột hòa tan, và sucroza, và ví dụ về nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn nitơ hữu cơ bao gồm muối amoni, nitrat, axit amin, dịch chiết ngô, pepton, casein, phần chiết thịt, bột đậu nành, và phần chiết khoai tây. Ngoài ra, môi trường dinh dưỡng có thể, nếu muốn, bao gồm chất dinh dưỡng khác (ví dụ, muối vô cơ (ví dụ, canxi clorua, natri dihydro phosphat, hoặc magie clorua), vitamin, và kháng sinh (ví dụ, tetracyclin, neomycin, ampicillin, hoặc kanamycin).

Bản thân môi trường nuôi cấy của các tế bào chủ được biến nạp được tiến hành bằng phương pháp đã biết. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, độ pH của môi trường, và thời gian nuôi cấy được chọn một cách thích hợp. Ví dụ, khi vật chủ là tế bào động

vật, thì đối với môi trường, môi trường MEM (Science;1955;122:501.) chứa khoảng 5 đến 20% huyết thanh thai bò, môi trường MEM (Virology;1959;8:396-97.), môi trường RPMI 1640 (J. Am. Med. Assoc.;1967;199:519-24.), môi trường 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.;1950;73:1-8.), hoặc môi trường tương tự có thể được sử dụng. Độ pH của môi trường tốt hơn là khoảng từ 6 đến 8, và môi trường thường được tiến hành ở khoảng 30 đến 40°C trong khoảng 15 đến 336 giờ, và nếu cần, quá trình sục khí và khuấy trộn cũng có thể được tiến hành. Khi vật chủ là tế bào côn trùng, ví dụ về môi trường bao gồm môi trường Grace (PNAS;1985;82:8404-8.) chứa huyết thanh thai bò, và độ pH của nó tốt hơn là khoảng từ 5 đến 8. Môi trường nuôi cấy thường được tiến hành ở khoảng 20 đến 40°C trong 15 đến 100 giờ, và nếu cần, quá trình sục khí và khuấy trộn cũng có thể được tiến hành. Khi vật chủ là vi khuẩn, nấm tía, nấm men, hoặc nấm dạng sợi, thì ví dụ, môi trường lỏng chứa nguồn dinh dưỡng nêu trên là thích hợp. Môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 8 là được ưu tiên. Khi vật chủ là E. coli, ví dụ là môi trường ưu tiên bao gồm môi trường LB và môi trường M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory;1972:431.). Trong trường hợp như vậy, việc nuôi cấy có thể được tiến hành ở 14 đến 43°C trong khoảng 3 đến 24 giờ, nếu cần trong điều kiện sục khí và khuấy trộn. Khi vật chủ là vi khuẩn thuộc chi Bacillus, thì việc nuôi cấy có thể được tiến hành ở 30 đến 40°C trong khoảng 16 đến 96 giờ, nếu cần trong điều kiện sục khí và khuấy trộn. Khi vật chủ là nấm men, ví dụ là môi trường bao gồm môi trường tối thiểu Burkholder (PNAS;1980;77:4505-4508.), và độ pH của nó mong muốn là từ 5 đến 8. Việc nuôi cấy thường được tiến hành ở khoảng 20 đến 35°C trong 14 đến 144 giờ, và nếu cần, quá trình sục khí và khuấy trộn cũng có thể được tiến hành.

Việc sản xuất mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được bao gồm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể bao gồm, ngoài bước nuôi cấy tế bào chủ biến nạp được mô tả nêu trên để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, bước thu hồi, và tốt hơn là phân lập và tinh chế mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được biểu hiện. Ví dụ về phương pháp phân lập và tinh chế bao gồm

phương pháp sử dụng độ hòa tan, như phương pháp loại muối và kết tủa dung môi; phương pháp sử dụng sự khác biệt về khối lượng phân tử như thẩm tách, siêu lọc, lọc gel, hoặc điện di gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit; phương pháp sử dụng điện tích như sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký hydroxylapatit; phương pháp sử dụng ái lực riêng như sắc ký ái lực; phương pháp sử dụng sự khác nhau về tính kỵ nước như sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo, và phương pháp sử dụng sự khác nhau về điểm đẳng điện như sự hội tụ đẳng điện.

6. Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế

Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế có thể bao gồm bước gắn kết cộng hóa trị mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người với phần đánh dấu (Y-S₁-X). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể tiến hành thích hợp quá trình gắn kết giữa các thành phần trong phần đánh dấu (Y-S₁-X) bằng phương pháp đã biết. Đối với ví dụ phản ứng, sau khi phối tử (Y) được gắn kết với phần tử liên kết peptit (X) một cách trực tiếp hoặc qua thành phần đệm (S₁), phần tử liên kết peptit có thể được gắn kết với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người. Ngoài ra, sau khi mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được gắn kết với phần tử liên kết peptit (X), thì phần tử liên kết peptit cũng có thể được gắn kết với phối tử (Y) một cách trực tiếp hoặc qua thành phần đệm (S₁). Đối với nguyên liệu khởi đầu, hợp chất trong đó phối tử và thành phần đệm (S₁) được gắn kết ưu tiên cũng có thể được sử dụng.

Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ biến nạp được mô tả nêu trên để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, và bước gắn kết cộng hóa trị mảnh Fab và phần đánh dấu (Y-S₁-X). Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ biến nạp được mô tả nêu trên để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người, bước thu hồi mảnh Fab được biểu hiện, và bước gắn kết cộng hóa trị mảnh Fab và phần đánh dấu (Y-S₁-X). Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước bổ sung kim loại. Đối với tác nhân chelat hóa, phần tử liên kết peptit, thành phần đệm, số lượng phần đánh dấu, kim loại, và tương tự đã

được sử dụng, được mô tả ở đây có thể được sử dụng.

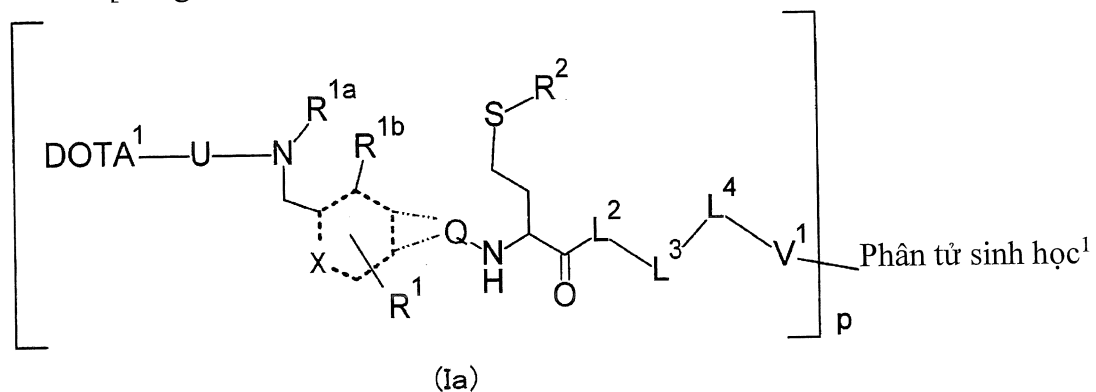
Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được tiến hành như phương pháp bao gồm hai hoặc nhiều bước được nêu cụ thể ở trên là một loạt các bước, hoặc có thể được tiến hành như phương pháp bao gồm ít nhất một step được mô tả cụ thể ở trên. Ví dụ, phương pháp bao gồm bước gắn kết mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người với phần đánh dấu (Y-S₁-X) và phương pháp bao gồm bước liên kết phối trí kim loại với mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người mà phần đánh dấu (Y-S₁-X) được gắn kết với cũng được bao gồm trong phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế. Ngoài ra, phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế cũng bao gồm phương pháp trong đó thứ tự các bước là khác nhau. Ví dụ, phương pháp gắn kết cộng hóa trị mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người với phần đánh dấu (Y-S₁-X) trong đó kim loại được liên kết phối trí với phối tử cũng được bao gồm trong phương pháp sản xuất thể tiếp hợp theo sáng chế.

Ngoài ra, thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được tạo ra theo cách tương tự, còn với phân tử sinh học được mô tả trong sáng chế thay cho mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được mô tả nêu trên.

7. Thể tiếp hợp cấu thành từ phối tử, thành phần đệm, phân tử liên kết peptit, và phân tử sinh học.

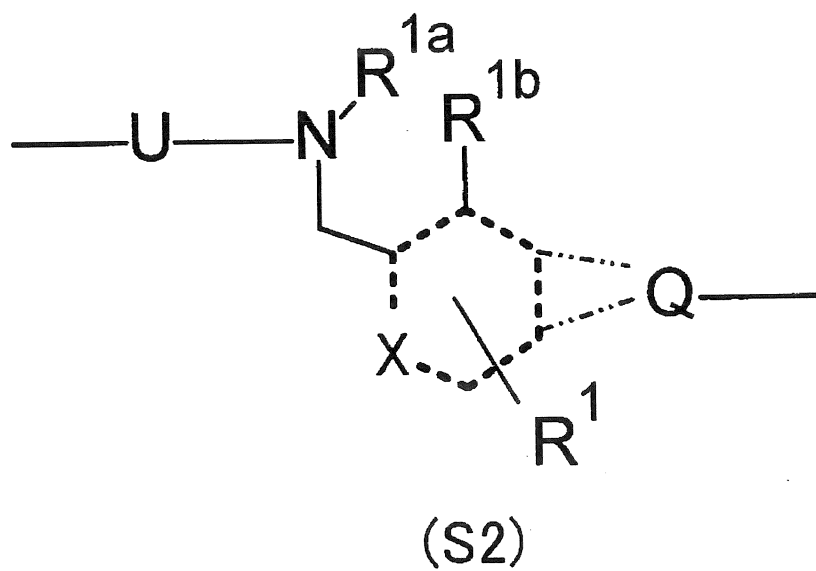
Thể tiếp hợp cấu thành từ phối tử, thành phần đệm, phân tử liên kết peptit, và phân tử sinh học theo sáng chế được thể hiện bởi công thức sau sẽ được mô tả.

[Công thức hóa học 73]



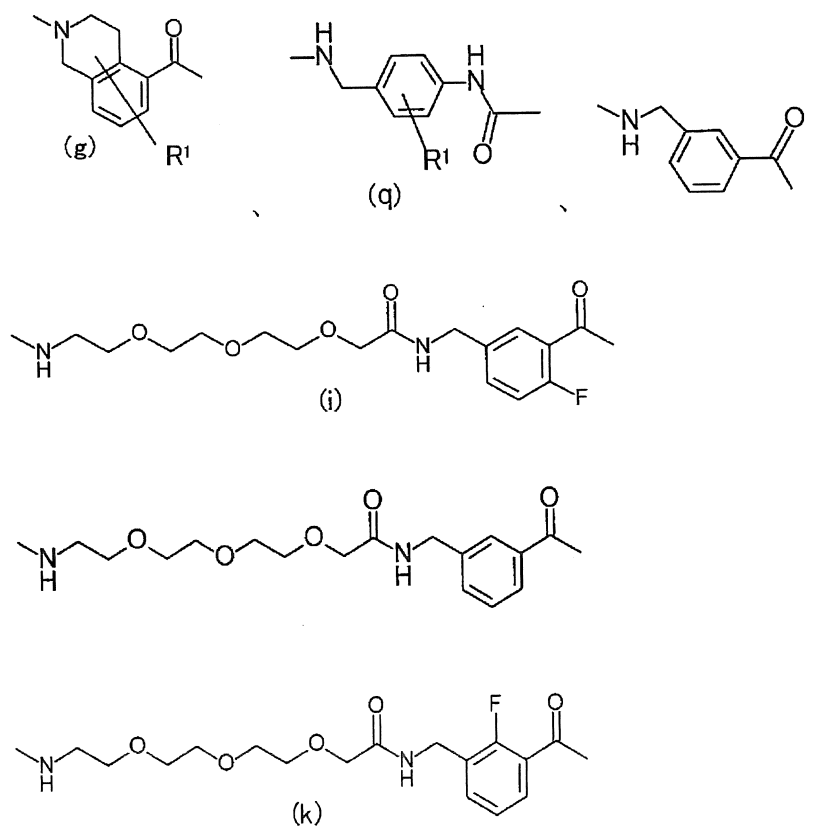
Một phương án của công thức sau (S2) tương ứng với thành phần đệm

[Công thức hóa học 74]



là

[Công thức hóa học 75]

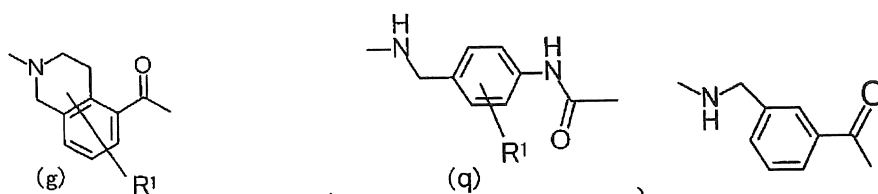


Phương án khác

là nhóm trong đó

Công thức (S2) là

[Công thức hóa học 76]

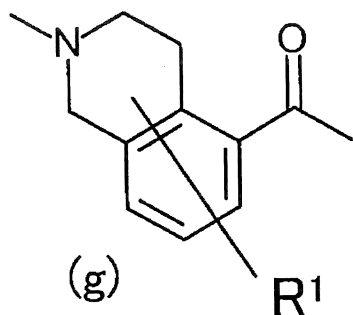


Phương án khác

là nhóm trong đó

Công thức (S2) là

[Công thức hóa học 77]

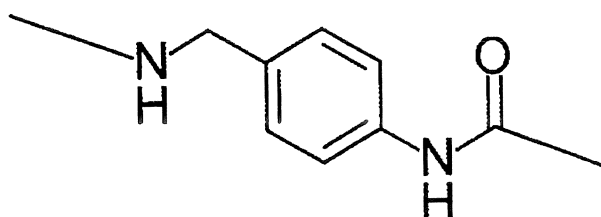


Phương án khác

là nhóm trong đó

Công thức (S2) là

[Công thức hóa học 78]



Phương án của nhóm Q trong công thức (S2) là $-C(=O)-$, $-NH-C(=O)-$, hoặc $-NH-C(=S)-$.

Phương án của nhóm Q trong công thức (S2) là $-C(=O)-$ hoặc $-NH-C(=O)-$.

Phương án của nhóm Q trong công thức (S2) là $NH-C(=O)-$.

Phương án của nhóm L^2 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là Ile, Phe, hoặc Gly.

Phương án của nhóm L^2 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là Ile.

Phương án của nhóm L^2 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là Phe.

Phương án của nhóm L^2 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là Gly.

Phương án của nhóm L^3 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là liên kết, Arg, hoặc His.

Phương án của nhóm L^3 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là liên kết.

Phương án của nhóm L^3 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là Arg.

Phương án của nhóm L^3 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là His.

Phương án của nhóm L^4 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là $NH-(CH_2)_2-$, $-NHCH(C(=O)OH)(CH_2)_4-$, hoặc liên kết.

Phương án của nhóm L^4 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là $NH-(CH_2)_2-$.

Phương án của nhóm L^4 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là $-NHCH(C(=O)OH)(CH_2)_4-$.

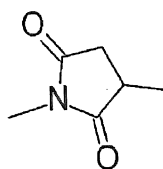
Phương án của nhóm L^4 trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là liên kết.

Phương án của nhóm V^1 trong công thức (Ia) hoặc (Ib)

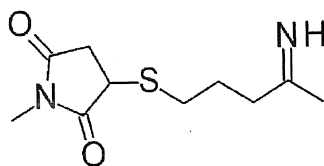
là

nhóm có công thức bất kỳ trong số các công thức (A-1) đến (A-5)

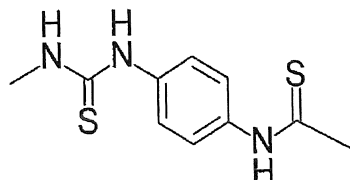
[Công thức hóa học 79]



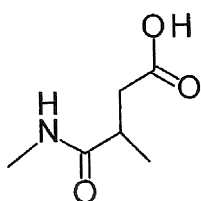
(A-1)



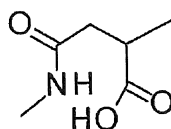
(A-2)



(A-3)



(A-4)



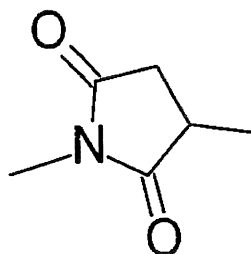
(A-5)

Phương án của nhóm V¹ trong công thức (Ia) hoặc (Ib)

là

nhóm được thể hiện bởi công thức sau (A-1)

[Công thức hóa học 80]



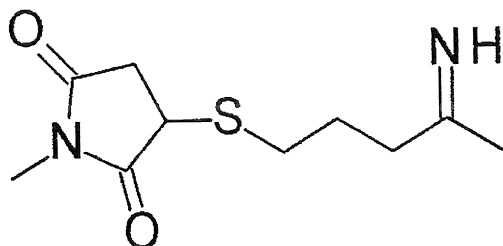
(A-1)

Phương án của nhóm V¹ trong công thức (Ia) hoặc (Ib)

là

nhóm được thể hiện bởi công thức sau (A-2)

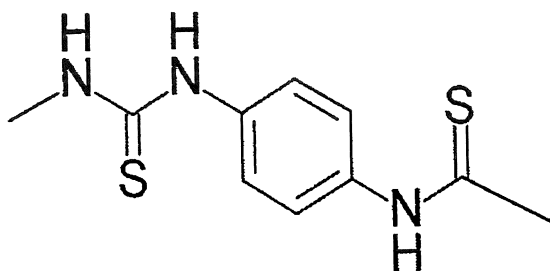
[Công thức hóa học 81]



(A-2)

Phương án của nhóm V¹ trong công thức (Ia) hoặc (Ib)
là
nhóm được thể hiện bởi công thức sau (A-3)

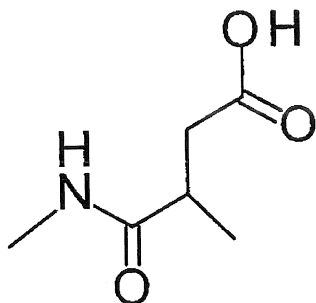
[Công thức hóa học 82]



(A-3)

Phương án của nhóm V¹ trong công thức (Ia) hoặc (Ib)
là
nhóm được thể hiện bởi công thức sau (A-4)

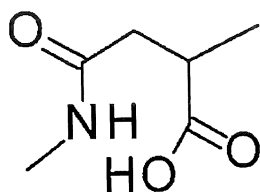
[Công thức hóa học 83]



(A-4)

Phương án của nhóm V¹ trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là nhóm được thể hiện bởi công thức sau (A-5)

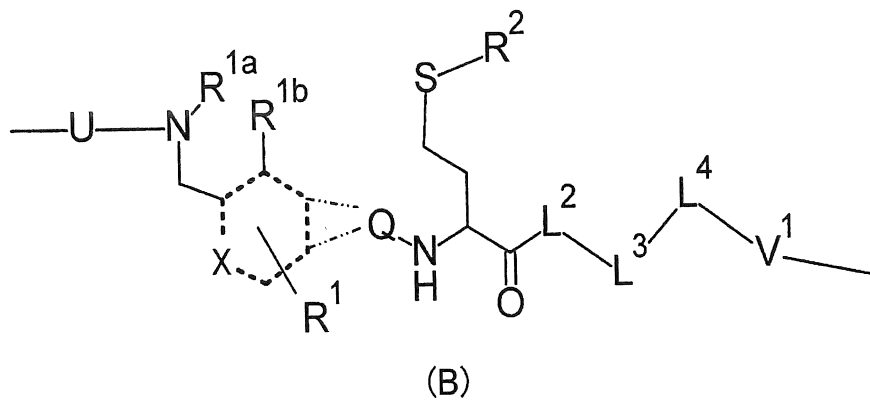
[Công thức hóa học 84]



(A-5)

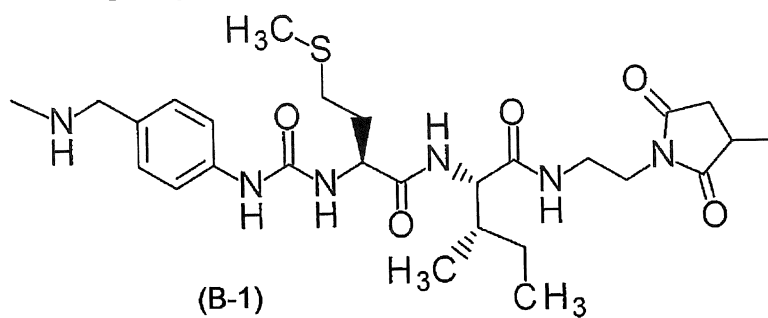
Công thức (B) sau trong công thức (Ia) hoặc (Ib) là nhóm cấu thành từ thành phần đệm và phần tử liên kết peptit.

[Công thức hóa học 85]

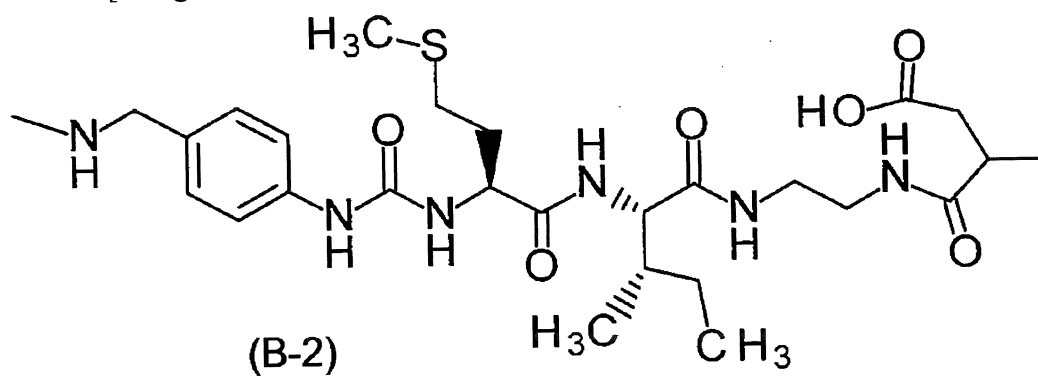


Các ví dụ của chúng bao gồm nhóm được chọn từ nhóm cấu thành từ các công thức (B-1) đến (B-7) sau.

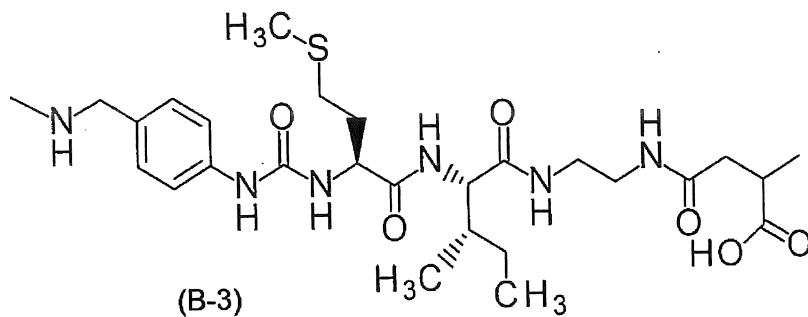
[Công thức hóa học 86]



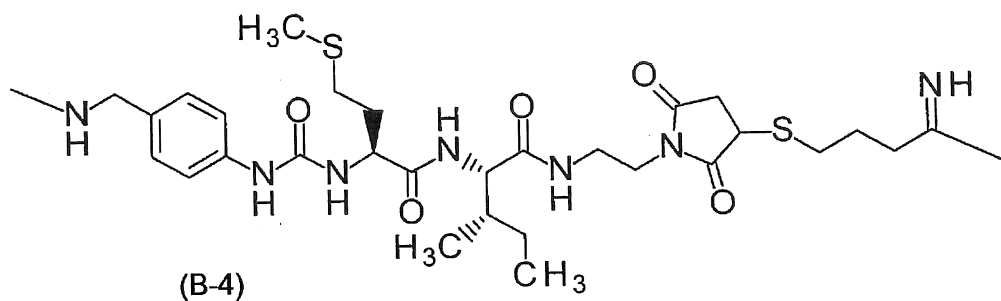
[Công thức hóa học 87]



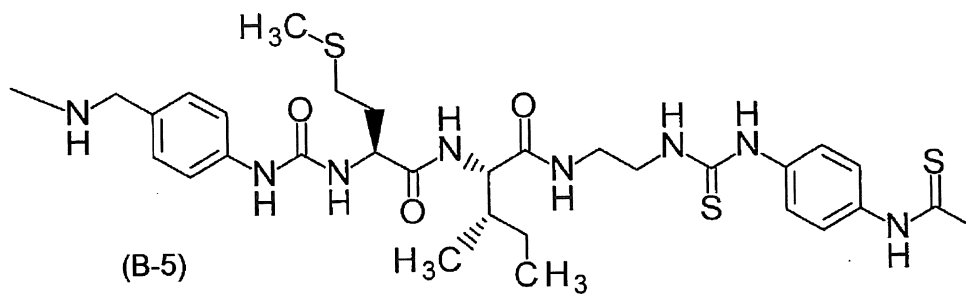
[Công thức hóa học 88]



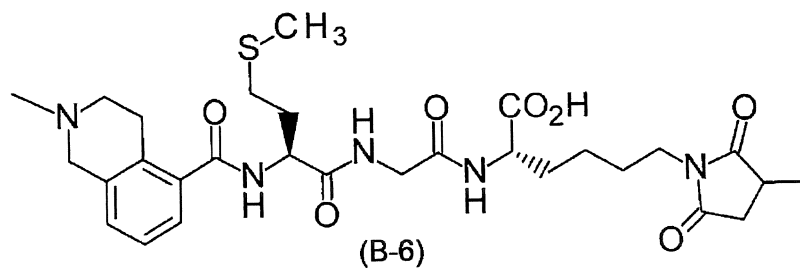
[Công thức hóa học 89]



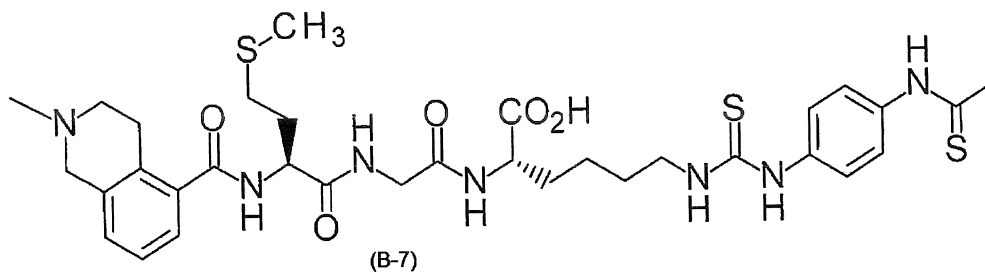
[Công thức hóa học 90]



[Công thức hóa học 91]

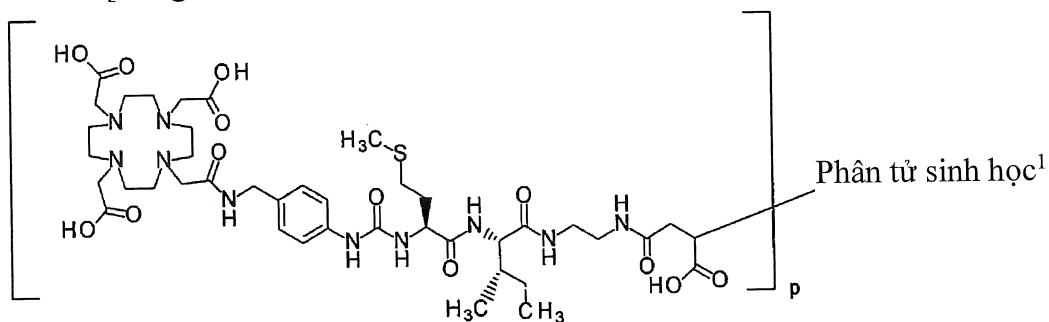


[Công thức hóa học 92]

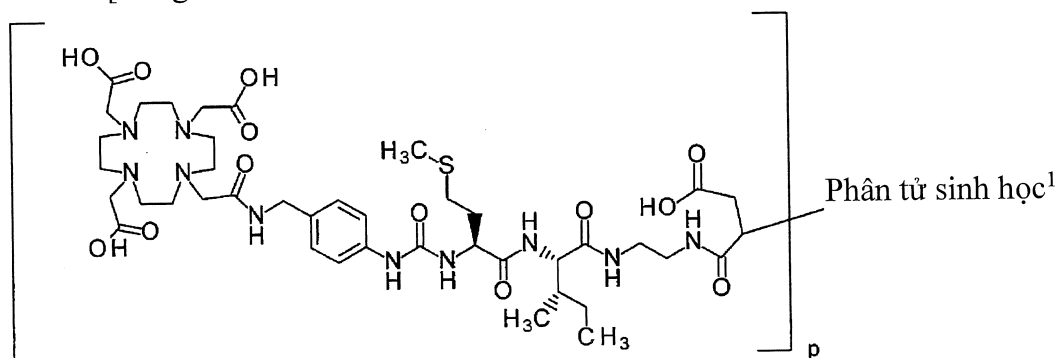


Một phương án là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức (Ia) trong đó thể tiếp hợp là thể tiếp hợp được chọn từ nhóm cấu thành từ các hợp chất có các công thức sau, p là số tự nhiên từ 1 đến 25, và phân tử sinh học¹ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p trong phân tử sinh học¹.

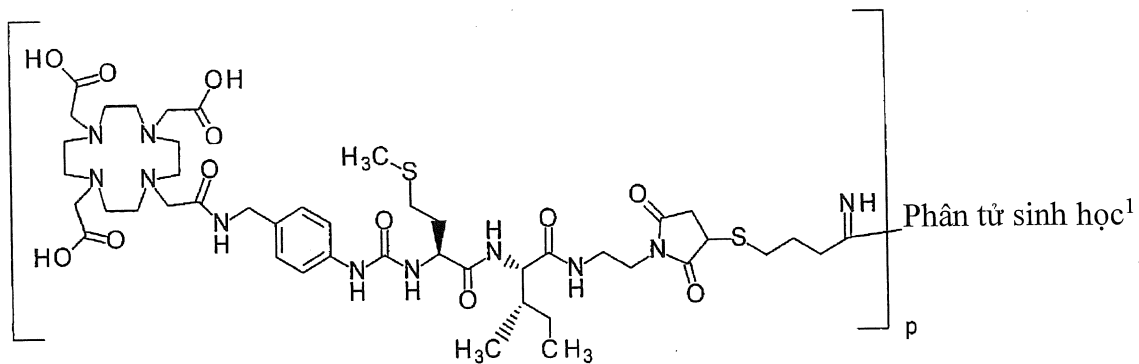
[Công thức hóa học 93]



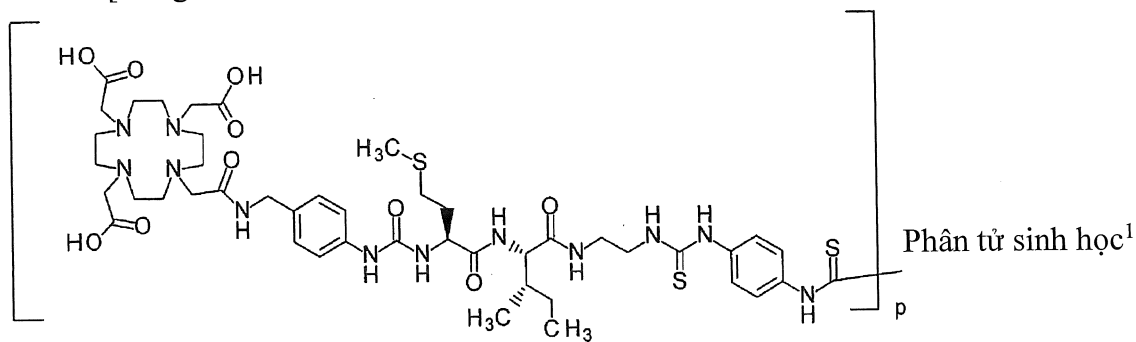
[Công thức hóa học 94]



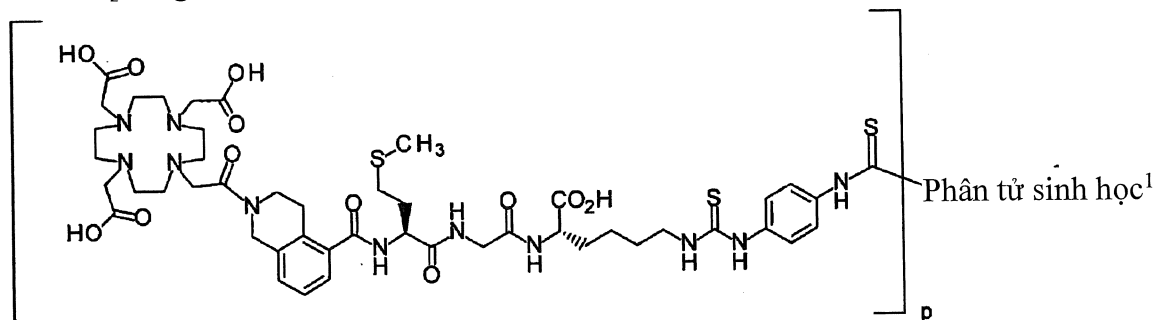
[Công thức hóa học 95]



[Công thức hóa học 96]

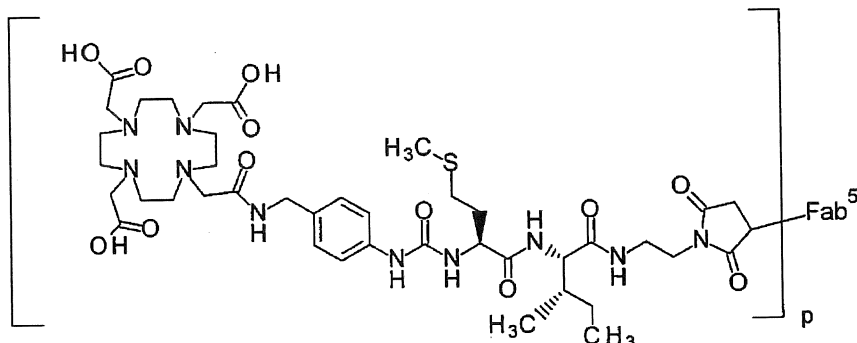


[Công thức hóa học 97]



Một phương án theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau.

[Công thức hóa học 98]

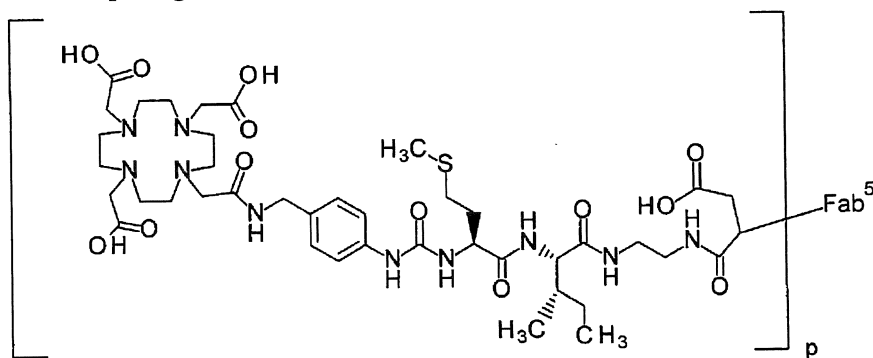


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể sau:

mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Một phương án theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau.

[Công thức hóa học 99]

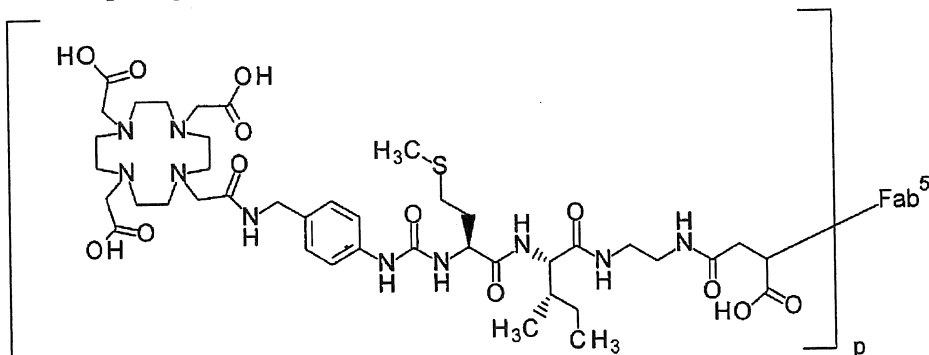


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể sau:

mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Một phương án theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau.

[Công thức hóa học 100]

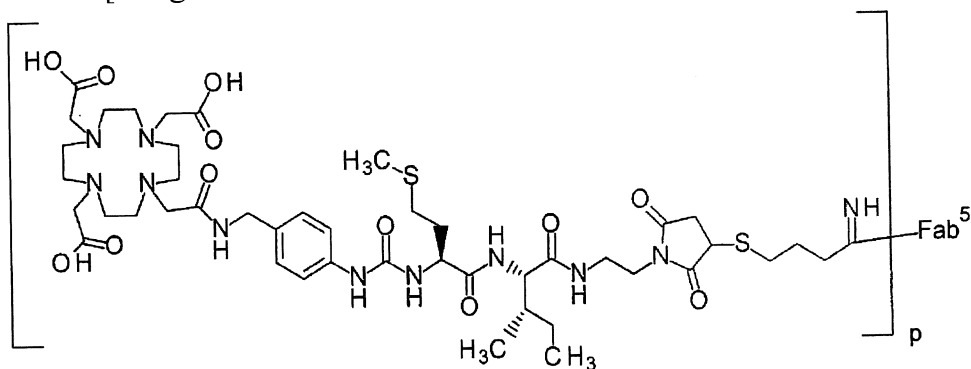


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể sau:

mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Một phương án theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau.

[Công thức hóa học 101]

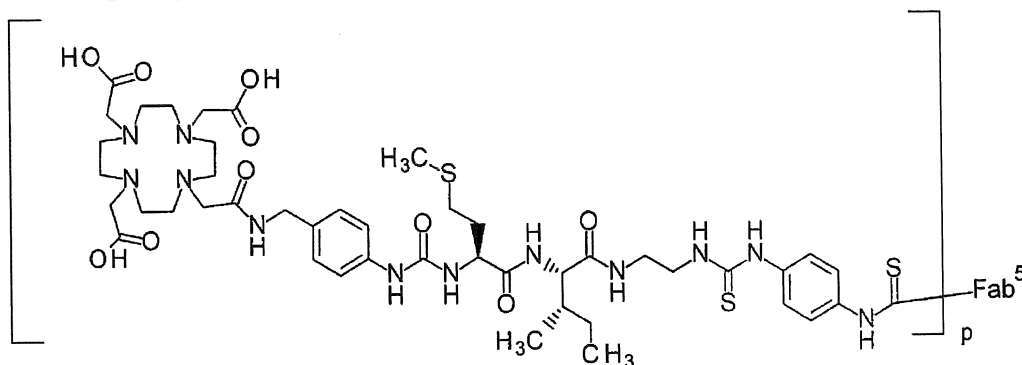


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể sau:

mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Một phương án theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau.

[Công thức hóa học 102]

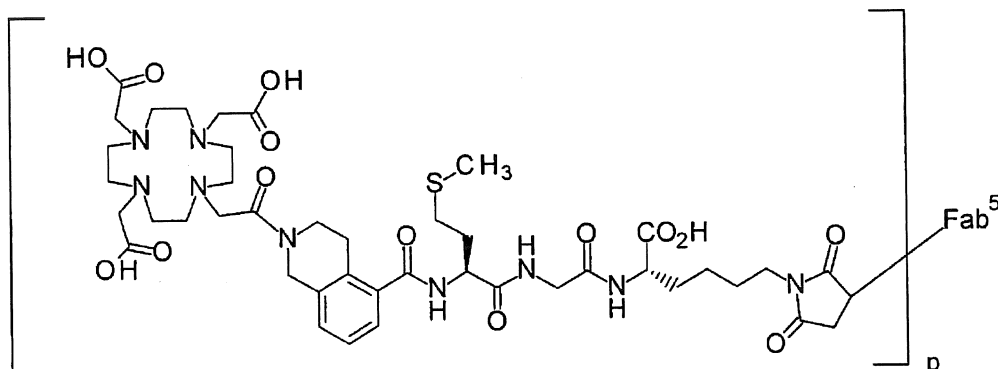


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể sau:

mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Một phương án theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau.

[Công thức hóa học 103]

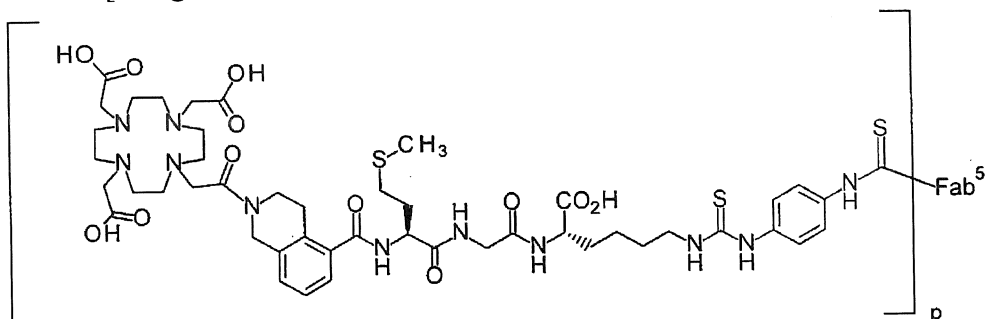


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể sau:

mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Một phương án theo sáng chế là thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau.

[Công thức hóa học 104]

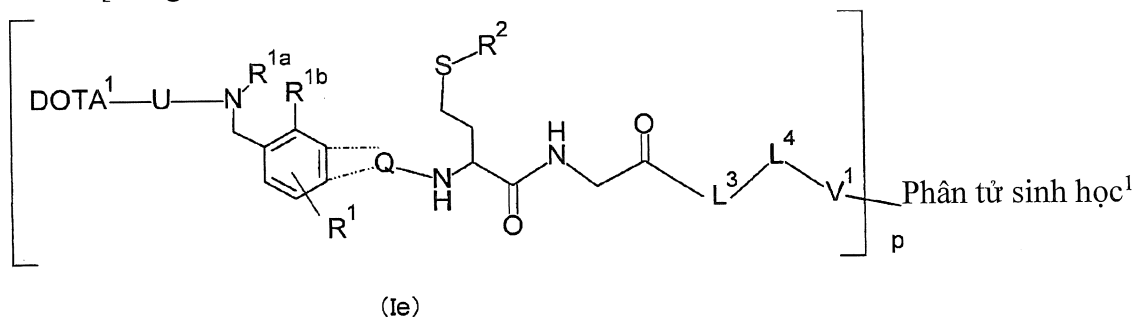


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể sau:

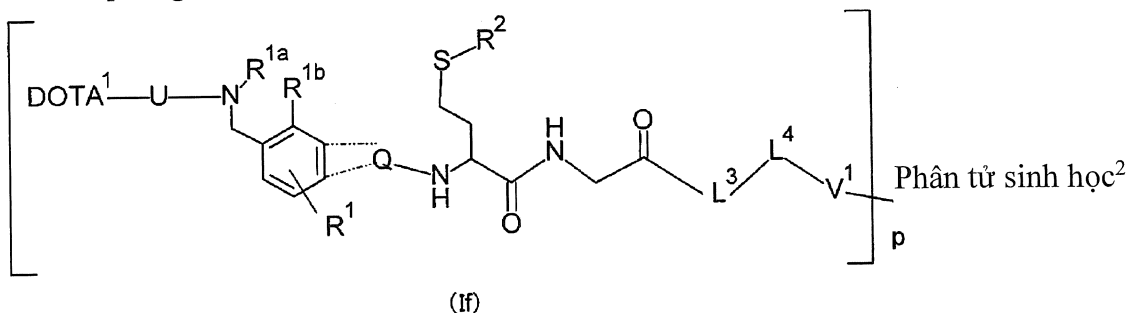
mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Ngoài ra, ví dụ về một phương án theo sáng chế bao gồm các công thức (Ie) và (If) sau.

[Công thức hóa học 105]



[Công thức hóa học 106]



Thế tiếp hợp theo sáng chế có thể có chất đồng phân hình học và chất hỗn hợp.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể có cacbon không đối xứng. Các dạng được tách

của các chất đồng phân này hoặc hỗn hợp của chúng được bao gồm trong sáng chế. Ngoài ra, dạng được đánh dấu, tức là, hợp chất trong đó một hoặc nhiều nguyên tử của hợp chất theo sáng chế được thay thế bằng chất đồng vị phóng xạ hoặc chất đồng vị không phóng xạ cũng được bao gồm trong sáng chế.

Phương án của phân tử sinh học có thể là phân tử sinh học bất kỳ với điều kiện nó có hoạt tính sinh lý, và các ví dụ của chúng bao gồm peptit, protein, hormon, thuốc, nucleotit, oligonucleotit, axit nucleic, và polysaccarit. Trong trường hợp protein, kháng thể, enzym, thụ thể, và mảnh của chúng được bao gồm.

Phương án khác của phân tử sinh học là peptit và protein.

Phương án khác của phân tử sinh học là protein.

Phương án khác của phân tử sinh học là mảnh Fab, enzym, thụ thể, hoặc mảnh của chúng chứa protein. Ví dụ, somatostatin, phối tử PSMA, peptit RGD (Arg-Gly-Asp), ATSM (Diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)), hoặc ^{211}At -AITM (4- ^{211}At -astato-N-[4-(6-(isopropylamino)pyridin-4-yl)-1,3-thiazol-2-yl]-N-methylbenzamid) tương ứng với các chất nêu trên.

Phương án khác của phân tử sinh học là kháng thể được bán trên thị trường hoặc mảnh Fab của nó.

Các ví dụ của chúng bao gồm nivolumab, pembrolizumab, bevacizumab, rituximab, pertuzumab, daratumumab, denosumab, cetuximab, ipilimumab, panitumumab, brentuximab, ramucirumab, atezolizumab, obinutuzumab, elotuzumab, avelumab, ibritumomab, alemtuzumab, gemtuzumab, và necitumumab.

Ngoài ra, phương án khác của phân tử sinh học là phân tử có thể được kỳ vọng để trị liệu hạt alpha hoặc trị liệu hạt beta.

Các ví dụ của chúng bao gồm Octreoscan, ^{131}I -MIBG (I-131 metaiodobenzylguanidin), ^{211}At -MABG (^{211}At -astato-benzylguanidin), Trastuzumab, kháng thể được làm giống như của người A33 (Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 2005 Oct; 20(5): 514-23.), Omburtamab, Tenatumomab, kháng thể CD45 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03128034; 9595; NCI-2017-00452),

Ibritumomab, và Actimab.

Ngoài ra, phương án khác của phân tử sinh học là các kháng thể đơn dòng HuM195, MX35-F(ab')₂, Murine 9.2.27, kháng nguyên Proteoglycan (MCSP), kháng nguyên CD20, kháng nguyên CD30, hoặc tương tự được bộc lộ trong các nghiên cứu về bệnh ung thư và thuốc về phân tử (Cancer studies and molecular medicine (2004), 1, 1, 1-7). Ngoài ra, phương án khác về phân tử sinh học là CD19, GD2, VE cadherin, hoặc tương tự.

Phương án của phân tử sinh học là mảnh Fab của kháng thể MUC1 (để chỉ Fab³, Fab⁴, hoặc Fab⁵), và các ví dụ bao gồm các phân tử được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế WO2018/092885.

[1M] Cụ thể, Fab³ hoặc Fab⁴ là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) và (b) sau, và mảnh Fab có mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 để chỉ Fab³, và mảnh Fab có mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 14 để chỉ Fab⁴:

(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16; và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16.

[2M] Một phương án là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người theo mục [1M], mà được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) và (b) sau:

(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ

trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 8 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10; và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

[3M] Một phương án là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người theo mục [1M], mà được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) và (b) sau:

(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16; và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 14 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 10 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16.

[4M] Một phương án là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người theo mục [3M], mà được chọn từ nhóm cấu thành từ (a) và (b) sau:

(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10; và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

[5M] Một phương án là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người theo mục [4M],

mà là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

[6M] Một phương án là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người theo mục [4M], mà là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

[7M] P10-1 hoặc P10-2 (để chỉ Fab^s), là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế WO2018/092885.

Ngoài ra, thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được cấu thành bằng kết hợp các phương án riêng rẽ được mô tả nêu trên.

7. Chế phẩm chẩn đoán và phương pháp chẩn đoán

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chẩn đoán chứa thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm kim loại (sau đây, dùng để chỉ thể tiếp hợp có thể phát hiện theo sáng chế). Chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều thể tiếp hợp theo sáng chế. Tức là, chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế có thể bao gồm một thể tiếp hợp theo sáng chế, hoặc có thể bao gồm dạng kết hợp của hai hoặc nhiều thể tiếp hợp theo sáng chế. Thể tiếp hợp có thể phát hiện theo sáng chế có thể được điều chế theo phương pháp thông thường và sử dụng làm thuốc chẩn đoán sớm hoặc thuốc chia giai đoạn (cụ thể là thuốc chẩn đoán bệnh ung thư).

Thuốc chẩn đoán sớm có nghĩa là thuốc chẩn đoán mà nhằm mục đích chẩn đoán ở giai đoạn trong đó không quan sát thấy tình trạng bệnh lý hoặc ở giai đoạn bệnh sớm. Ví dụ, trong trường hợp bệnh ung thư, thuốc chẩn đoán sớm có nghĩa là thuốc chẩn đoán được sử dụng ở giai đoạn tại đó không quan sát thấy tình trạng bệnh lý hoặc ở giai đoạn 0 hoặc giai đoạn 1.

Thuốc chia giai đoạn có nghĩa là thuốc chẩn đoán mà có thể kiểm tra tình trạng bệnh lý tiến triển trong bao lâu. Ví dụ, trong trường hợp bệnh ung thư, thuốc chia giai

đoạn có nghĩa là thuốc chẩn đoán mà có thể kiểm tra giai đoạn của nó.

Bệnh ung thư được kỳ vọng có thể được chẩn đoán bằng chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế là bệnh ung thư biểu hiện CEACAM5 của người. Theo một phương án, các ví dụ của chúng bao gồm bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến giáp, và bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của chúng. Theo một phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư trực tràng hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của bệnh ung thư trực tràng. Tốt hơn là, bệnh ung thư là bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của bệnh ung thư trực tràng, và bệnh ung thư như vậy bao gồm bệnh ung thư gan di căn. Ngoài ra, bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu hiện MUC1 người. Theo một phương án, ví dụ về bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, ung thư trực tràng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư cổ. Theo một phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư bàng quang.

Lượng thể tiếp hợp theo sáng chế bổ sung trong quá trình bào chế chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế thay đổi phụ thuộc vào mức độ triệu chứng và tuổi tác của bệnh nhân, dạng liều của chế phẩm đã sử dụng, hiệu lực gắn kết của mảnh Fab hoặc phân tử sinh học, và tương tự, và, ví dụ, khoảng 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg có thể được sử dụng tính theo khối lượng của mảnh Fab hoặc phân tử sinh học cho mỗi đơn vị thể trọng của bệnh nhân.

Ví dụ về dạng liều của chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế bao gồm chế phẩm dùng ngoài ruột như dạng tiêm hoặc truyền, và có thể được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ vào mô đích tại chỗ, tiêm dưới da, dùng trong bàng quang, hoặc dạng tương tự. Ngoài ra, trong chế phẩm, chất mang và chất phụ trợ theo các dạng liều này có thể được sử dụng trong khoảng được dụng. Các loại chất mang và chất phụ trợ được dụng không bị giới hạn cụ thể, và chất mang và chất phụ trợ đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng

chế để sản xuất chế phẩm để chẩn đoán sớm bệnh ung thư hoặc chế phẩm để xác định giai đoạn của bệnh ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp có thể phát hiện theo sáng chế để sử dụng trong chẩn đoán sớm và xác định giai đoạn của bệnh ung thư.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm bước dùng thể tiếp hợp có thể phát hiện theo sáng chế cho đối tượng. Ở đây, "đối tượng" để chỉ người hoặc động vật có vú khác cần được chẩn đoán. Theo một phương án, đối tượng là người cần được chẩn đoán. Lượng hữu hiệu của thể tiếp hợp có thể phát hiện theo sáng chế trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế có thể là lượng giống như lượng hữu hiệu của thể tiếp hợp theo sáng chế trong chế phẩm nêu trên. Trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế, thể tiếp hợp có thể phát hiện theo sáng chế có thể được dùng bằng cách tiêm trong tại mô đích tại chỗ, tiêm dưới da hoặc tương tự.

Theo phương án khác, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người để sản xuất thể tiếp hợp bao gồm mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người theo sáng chế, phần tử liên kết peptit, và/hoặc phối tử. Theo một phương án, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người để sản xuất chế phẩm chẩn đoán bao gồm thể tiếp hợp theo sáng chế.

Ngoài ra, theo một phương án khi chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế bao gồm chất đồng vị phóng xạ kim loại được tạo ra, nó có thể được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ kim loại ngay trước khi sử dụng chế phẩm, và có thể được tạo ra ở dạng chế phẩm chẩn đoán bao gồm chất đồng vị phóng xạ kim loại.

8. Dược phẩm và phương pháp điều trị

Theo sáng chế, khoảng 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg có thể được sử dụng tính theo khối lượng của một hoặc nhiều thể tiếp hợp mảnh Fab theo sáng chế bao gồm chất đồng vị phóng xạ kim loại như ^{90}Y hoặc ^{177}Lu .

Dược phẩm bao gồm thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư. Bệnh ung thư được kỳ vọng có thể được điều trị bằng dược phẩm bao gồm thể tiếp hợp theo sáng chế là bệnh ung thư biểu hiện CEACAM5 của người, và các

ví dụ của chúng bao gồm bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến giáp, và bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của chúng. Theo cách khác, bệnh ung thư được kỳ vọng là có thể được điều trị bằng dược phẩm bao gồm thể tiếp hợp theo sáng chế là bệnh ung thư biểu hiện MUC1 người, và các ví dụ của chúng bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, ung thư trực tràng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, hoặc bệnh ung thư cổ. Theo một phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư bàng quang.

Sáng chế bao gồm dược phẩm bao gồm thể tiếp hợp theo sáng chế để điều trị bệnh ung thư trực tràng hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của ung thư trực tràng. Ngoài ra, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư trực tràng hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của ung thư trực tràng, chứa bước dùng lượng hữu hiệu điều trị của thể tiếp hợp theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế bao gồm phương pháp cảm ứng quá trình chết tế bào của tế bào ung thư của bệnh ung thư trực tràng hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của ung thư trực tràng, chứa bước dùng lượng hữu hiệu điều trị của thể tiếp hợp theo sáng chế.

Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư có thể được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư. Ví dụ, dược phẩm để điều trị bệnh ung thư trực tràng hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của ung thư trực tràng cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm thể tiếp hợp theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư trực tràng hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của ung thư trực tràng. Hơn nữa, sáng chế bao gồm việc sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế để sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh ung thư trực tràng hoặc bệnh ung thư do kết quả của việc di căn của ung thư trực tràng.

Theo phương án khác, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người để sản xuất dược phẩm bao gồm thể tiếp hợp theo sáng chế.

Theo các phương án nêu trên, phân tử sinh học có thể được sử dụng thay cho mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người. Thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được tạo ra ở dạng chế phẩm chẩn đoán hoặc được phẩm đổi với bệnh liên quan đến phân tử sinh học.

Nhìn chung, sáng chế được mô tả, và các ví dụ cụ thể được đề cập để hiểu rõ hơn sẽ được đưa ra ở đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dự định để giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các chữ viết tắt sau có thể được sử dụng trong các ví dụ sau và trong các bảng được đưa ra sau đó.

Gd/DOTA: DOTA 3 nhánh được đánh dấu bằng Gd, Gd/DOTA 4 nhánh: DOTA 4 nhánh được đánh dấu bằng Gd, MS: phép đo phổ khối, ESI+: giá trị m/z (phương pháp ion hóa ESI, nếu không có quy định cụ thể khác $[M+H]^+$), ESI-: giá trị m/z (phương pháp ion hóa ESI, nếu không có quy định cụ thể khác $[M-H]^-$), APCI/ESI+: giá trị m/z (phương pháp ion hóa APCI/ESI, APCI/ESI có nghĩa là phép đo đồng thời APCI và ESI. Nếu không có quy định cụ thể khác $[M+H]^+$), APCI/ESI-: giá trị m/z (phương pháp ion hóa APCI/ESI. Nếu không có quy định cụ thể khác $[M+H]^-$), Ex-No: số thể tiếp hợp, SNo: Số ví dụ sản xuất, Str: công thức cấu trúc hóa học, Me: metyl, Et: etyl, tBu: tert-butyl, 1,3-Ph: 1,3-phenylen, 1,4-Ph: 1,4-phenylen, diph-Ala: diphenylalanin, và naph-Ala: 3-(2-naphtyl)alanin.

(Ví dụ 1) Tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng CEACAM5 của người)

T84.66, là kháng thể CEACAM5 kháng người có nguồn gốc từ chuột, được làm giống như của người bằng cách viện dẫn tới phương pháp được bộc lộ trong tài liệu (Protein Eng. Des. Sel.;2004;17:481-489), và sau đó mô hình phân tử của kháng thể được làm giống như của người được xây dựng theo tài liệu (Proteins: Structure, Function, và Bioinformatics;2014;82:1624-1635) được sử dụng để thiết kế kháng thể có vùng biến đổi trong đó ái lực được kỳ vọng là không bị suy yếu thậm chí bằng cách

gắn kết phần đánh dấu.

Gen của mảnh chuỗi nặng được tạo ra bằng cách nối gen mã hóa trình tự tín hiệu (Protein Engineering; 1987; 1:499-505) với bên 5' của gen vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể, và gen vùng Fab của IgY1 người (cấu thành từ trình tự nucleotit của các nucleotit 364 đến 678 của SEQ ID NO: 1) với bên 3', và gen mảnh chuỗi nặng này được chèn vào vector GS pEE6.4 (Lonza). Ngoài ra, gen chuỗi nhẹ được tạo ra bằng cách nối gen mã hóa trình tự tín hiệu với bên 5' của vùng biến đổi của gen chuỗi nhẹ của kháng thể, và gen vùng ổn định của IgK người (cấu thành từ trình tự nucleotit của các nucleotit 337 đến 657 của SEQ ID NO: 3) với bên 3', và gen chuỗi nhẹ này được chèn vào vector GS pEE12.4 (Lonza). Các vector pEE được mô tả nêu trên mà gen mảnh chuỗi nặng và gen chuỗi nhẹ của kháng thể lần lượt được chèn vào được tách giới hạn bởi enzym bằng NotI và PvuI, và việc nối được tiến hành sử dụng kit nối TAKARA Ligation Kit Ver2.1 (Takara Bio Inc.) để xây dựng cấu trúc vector GS vào cả hai gen mảnh chuỗi nặng và gen chuỗi nhẹ được chèn vào.

Bằng cách sử dụng vector GS được mô tả nêu trên mà cả hai gen mảnh chuỗi nặng và gen chuỗi nhẹ được chèn vào, quá trình biểu hiện kháng thể được tiến hành bằng hai phương pháp, biểu hiện tạm thời và biểu hiện cơ định. Đối với biểu hiện tạm thời, các tế bào Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) được nuôi cấy tới khoảng 3 triệu tế bào/mL trong môi trường biểu hiện Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.) được chuyển nhiễm vector GS được mô tả nêu trên vào cả hai gen mảnh chuỗi nặng và gen chuỗi nhẹ được chèn vào, sử dụng kit chuyển nhiễm ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific Inc.), và được nuôi cấy trong 5 đến 7 ngày. Dịch nổi môi trường được tinh chế sử dụng KappaSelect (GE Healthcare Japan Corporation) để thu được mảnh Fab. Đối với biểu hiện cơ định, các tế bào CHOK1SV (Lonza) được chuyển nhiễm vector GS được mô tả nêu trên vào cả hai gen mảnh chuỗi nặng và gen chuỗi nhẹ được chèn vào đuôi thẳng bằng PvuI, bằng phương pháp điện di sử dụng Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Vào ngày sau khi chuyển nhiễm, metionin sulfoximin được bổ sung và các tế bào được nuôi cấy trong 5 đến 7 ngày. Các tế bào được cấy vào môi

trường bán rắn chứa metyl xenluloza, và sau khi tạo khuẩn lạc, các tế bào có mức độ biểu hiện mảnh Fab cao thu được sử dụng ClonePix FL (Molecular Devices, LLC). Dịch nuôi cấy của các tế bào được tinh chế bằng cách sử dụng Capto L (GE Healthcare Japan Corp.), Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Japan Corp.), và BioPro S75 (YMC Co., Ltd.) để thu được mảnh Fab.

Trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab đã được điều chế của kháng thể CEACAM5 kháng người (để chỉ PB009-01 hoặc Fab²) được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, và trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: Trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của PB009-01 được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, và trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 4. Vùng biến đổi của chuỗi nặng của PB009-01 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 121 của SEQ ID NO: 2, và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng cấu thành từ lần lượt trình tự axit amin của axit amin 31 đến 35, 50 đến 66, và 99 đến 110, của SEQ ID NO: 2. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của PB009-01 cấu thành từ trình tự axit amin gồm axit amin 1 đến 112 của SEQ ID NO: 4, và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ cấu thành lần lượt từ trình tự axit amin của axit amin 24 đến 38, 54 đến 60, và 93 đến 101, của SEQ ID NO: 4.

Các vùng biến đổi và trình tự CDR được xác định theo cách đánh số Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda).

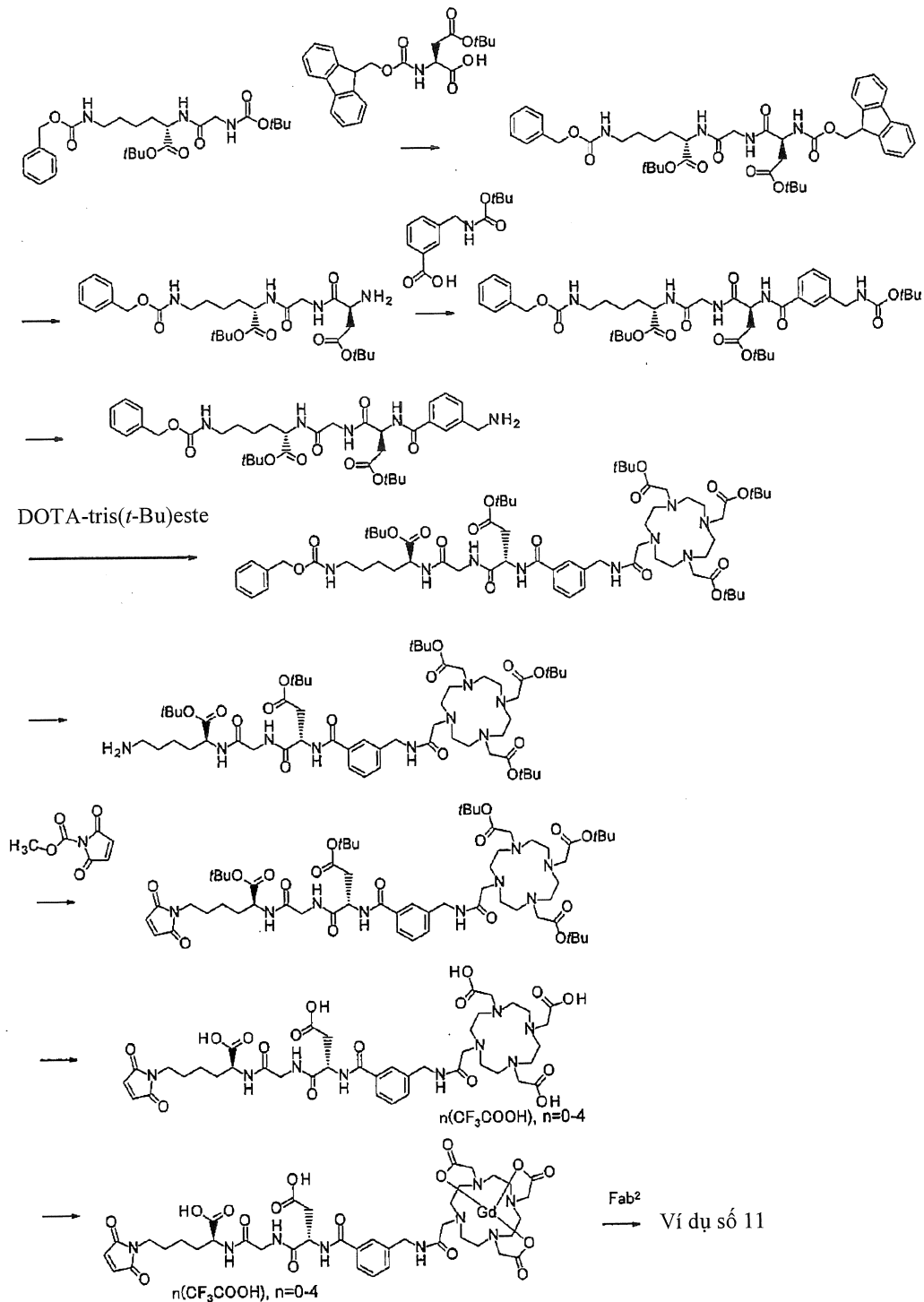
(Ví dụ 2: Điều chế thể tiếp hợp mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người)

Ví dụ theo sáng chế bộc lộ ví dụ tạo ra thể tiếp hợp. Trong việc thể hiện mỗi Ví dụ tạo ra trong Ví dụ theo sáng chế, "Ví dụ 2" được thể hiện bởi một dấu nối sau "số thể tiếp hợp". Ví dụ, "Ví dụ 2-11" chỉ ra rằng đây là Ví dụ tạo ra thể tiếp hợp 11 trong Ví dụ theo sáng chế. Ngoài ra, Fab² trong Ví dụ theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người (PB009-01/Fab²) thu được trong Ví dụ 1, và "p-Fab" chỉ ra rằng Fab² được gắn kết với phần đánh dấu p kèm theo bởi [] hoặc () qua nhóm amin p của nó để tạo ra thể tiếp hợp. Trong một vài ví dụ trong số các ví dụ sau, số lượng của

phần đánh dấu (Y-S₁-X) gắn kết với Fab² của mỗi thể tiếp hợp mà được xác nhận bằng cách phân tích MS được mô tả, nhưng kết quả không chỉ ra rằng thể tiếp hợp có số lượng phần đánh dấu được gắn kết không phải số lượng nêu trên không được bao gồm. Sẽ dễ dàng hiểu được rằng có thể vẫn có thể tiếp hợp có số lượng phần đánh dấu được gắn kết mà sự có mặt của chúng không thể được xác nhận do độ chính xác của thiết bị phân tích MS. Ngoài ra, trong các công thức cấu trúc trong Ví dụ theo sáng chế, công thức cấu trúc của DOTA mà Gd được gắn kết về mặt sơ đồ chỉ ra rằng DOTA được đánh dấu bằng Gd.

Ví dụ 2-11 Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Asp-Gly-Lys*-Z₂(#N)]p-Fab²))

[0241] [Công thức hóa học 107]



i) Tổng hợp tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat

Axit trifloaxetic (sau đây, được viết tắt là TFA) (3mL) được bổ sung vào dung

dịch gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)glyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate (1,00 g) trong diclometan (6mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, sau đó dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung, và hỗn hợp thu được được chiết hai lần bằng diclometan. Các lớp hữu cơ gom lại được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, và sau đó được làm khô qua natri sulfat khan, được lọc, và sau đó được cô. O⁴-tert-butyl hydro N-[(9H-fluoren-9-ylmetoxy)carbonyl]-L-aspartat (920 mg), diclometan (10mL), diisopropyletylamin (sau đây, được viết tắt là DIPEA) (2mL), 1-(Dimetylamino)-N,N-dimetyl-1-[(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yl)oxy]metanimini hexafluoridophosphat(1-) (sau đây, được viết tắt là HATU) (1,2 g) được bổ sung vào phần cặn này, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung, và hỗn hợp thu được được chiết hai lần bằng diclometan. Các lớp hữu cơ gom lại được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, và sau đó được làm khô qua natri sulfat khan, được lọc, và sau đó được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,86 g). MS (ESI+); 809,5 [M+Na]⁺

(ii) Tổng hợp tert-butyl O⁴-tert-butyl-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate

Morpholin (6mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[(9H-fluoren-9-ylmetoxy)carbonyl]-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate (2,86 g) trong tetrahydrofuran (sau đây, được viết tắt là THF) (10mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được làm lạnh trong bể nước đá, sau đó chất rắn thu được được lọc, và phần cặn được rửa bằng metanol. Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 4% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,04 g). MS (ESI+); 565,5

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-(3-[[[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl]benzoyl])-O⁴-tert-butyl-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate

Hỗn hợp gồm tert-butyl O⁴-tert-butyl-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (570 mg), diclometan (6mL), axit 3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoic (305 mg), DIPEA (520 μ L), và HATU (575 mg) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 43 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 80% etyl axetat/hexan) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (712 mg). MS (ESI+); 798,6

(iv) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(aminometyl)benzoyl]-O⁴-tert-butyl-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat

TFA (2mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl N-(3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoyl)-O⁴-tert-butyl-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (712 mg) trong diclometan (2mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 7 giờ. Triethylamin và amino silicagel được bổ sung, hỗn hợp thu được được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (amino silicagel, gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 2% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (495 mg). MS (ESI+); 698,4

(v) Tổng hợp tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat

Hỗn hợp gồm tert-butyl N-[3-(aminometyl)benzoyl]-O⁴-tert-butyl-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (495 mg), N,N-dimetylformamit (sau đây, được viết tắt là DMF) (5mL), axit [4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetic (sau đây, được viết tắt là DOTA-tris(t-Bu)este) (446 mg), DIPEA (400 μ L), và HATU (404 mg) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 66 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 20% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (387 mg). MS (ESI+);

1275,5 [M+Na]⁺

(vi) Tổng hợp tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L- α -aspartylglyxyl-L-lysinat

Hỗn hợp gồm tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L- α -aspartylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (387 mg), 10% paladi trên cacbon (hàm lượng nước là 50%, 65 mg), và etanol (4mL) được khuấy trong điều kiện khí hydro (1 at) ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Hỗn hợp được lọc sử dụng Xelit và được cô. 10% paladi trên cacbon (50% hàm lượng ẩm với nước, 650 mg) và etanol (8mL) được bổ sung phần lắng cặn, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện khí hydro (1 at) ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ. Hỗn hợp được lọc sử dụng Xelit và sau đó được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (336 mg). MS (ESI⁺); 1140,5 [M+Na]⁺

(vii) Tổng hợp tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L- α -aspartylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

Dung dịch chứa metyl 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-carboxylat (56 mg) và THF (5mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L- α -aspartylglyxyl-L-lysinat (336 mg) và dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa (2,5mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ. Dung dịch nước natri hydroxit 1M (60 μ L) được bổ sung trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và sau đó hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Etyl axetat và dung dịch nước axit xitric 10% được bổ sung, và sau đó lớp hữu cơ được tách ra. Lớp nước được chiết bằng 10% metanol/cloroform, và lớp hữu cơ thu gom được làm khô qua natri sulfat khan và được lọc. Phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh

chế bằng sắc ký cột silicagel (gradien dung môi; 0 → 20% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (341 mg). MS (ESI+); 1198,5

(viii) Tổng hợp N-[3-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-α-aspartylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxin

TFA (2mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl O⁴-tert-butyl-N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-α-aspartylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat (341 mg) trong diclometan (2mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradien dung môi; 0 → 20% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (99,6 mg). MS (ESI+); 918,3

(ix) Tổng hợp [N-{3-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]benzoyl}-L-α-aspartylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini

Dung dịch nước natri hydro cacbonat (0,1 M, 800 μL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm N-[3-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-α-aspartylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxin (20,0 mg), nước (2mL), và gadolini clorua (6 mg), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Dung dịch nước natri hydro cacbonat (0,1 M, 60 μL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch nước axit etylendiaminetetraaxetic (sau đây, được viết tắt là EDTA) (0,5 M, 300 μL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradien dung môi; 0 → 25% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (12,0 mg). MS (ESI-); 1071,4

(x) Tổng hợp thể tiếp hợp số 11

[N-{3-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)methyl]benzoyl}-L-α-aspartylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini (1 mg) được hòa tan trong DMSO (40 μL). 40 μL dung dịch thu được được phân tán, chất đệm borat 0,1 M (40 μL) được bổ sung, và dung dịch nước natri cacbonat 0,1M được bổ sung sao cho để tạo độ pH là 6,6.

Dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào 4,45 mg/mL chất đệm borat Fab² (160 μL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. Dung dịch nước EDTA 0,05M (40 μL) được bổ sung, và sau đó hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 10 phút. Hỗn hợp được tinh chế qua cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL (Merck Millipore). Dung dịch thu hồi được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat lặp lại 7 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Asp-Gly-Lys*-Z₂(#N)] có khối lượng phân tử 1073 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-12 Tổng hợp ([Gd/DOTA 4 nhánh-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=S)-Gly-Phe-Lys*-Z₂(#N)]p-Fab²)

[illegible]

-122-

tert-butyl N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate monohydrochloride (2,1 g), Et₃N (2,4mL), và HATU (2,5 g) lần lượt được bổ sung vào hỗn hợp lỏng chứa N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanine (1,5 g) trong diclometan (30mL), và hỗn hợp thu được được phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng.

Hỗn hợp phản ứng được cô và sau đó được tinh chế qua cột silicagel (gradient dung môi; 10 → 50% ethyl acetate/hexane) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (3,16 g). MS (ESI): 606,4 [M+Na]⁺

(ii) Tổng hợp tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-lysinate

Hỗn hợp gồm ethanol (60mL) của tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate (3150 mg), và 10% palladium trên cacbon (hàm lượng nước là 50%, 1000 mg) được khuấy trong điều kiện khí hydro (1 at) ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ rưỡi. Các nguyên liệu ban đầu được giữ lại, và do đó hệ thống được súc bằng argon, sau đó hỗn hợp được lọc qua xelit, và phần lọc được cô. Phần cặn lắng được hòa tan trong methanol (60mL), 10% palladium trên cacbon (50% hàm lượng ẩm với nước, 1000 mg) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện khí hydro (1 at) ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Đã xác nhận được rằng không xuất hiện nguyên liệu ban đầu, sau đó hệ thống được súc bằng argon, hỗn hợp được lọc qua xelit, và phần lọc được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2520 mg). MS (ESI): 450,4

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleucinate

Dung dịch chứa methyl 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylate (340 mg) trong THF (12mL) được bổ sung vào huyền phù chứa tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-lysinate (825 mg) trong dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa (6mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ, và sau đó dung dịch nước natri hydroxit 1M (0,36mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được pha loãng bằng ethyl acetate và nước và sau đó được axit hóa bằng

dung dịch nước axit xitric 10%. Lớp hữu cơ được tách ra, được rửa bằng dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa và nước muối bão hòa, được làm khô trên magie sulfat, và được lọc, và sau đó phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần lắng cặn được tinh chế qua cột silicagel (gradient dung môi; 0 → 8% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (743 mg). MS (ESI): 552,4 [M+Na]⁺

(iv) Tổng hợp tert-butyl L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat)

TFA (2mL) được bổ sung từng giọt vào dung dịch gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (325 mg) trong diclometan (4mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (418 mg). MS (ESI): 430,4

(v) Tổng hợp tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

N-(tert-butoxycarbonyl)glyxin (118 mg), trietylamin (sau đây, được viết tắt là TEA) (0,26mL), và HATU (256 mg) được bổ sung lần lượt vào hỗn hợp gồm tert-butyl L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat) (415 mg) trong diclometan (10mL), và hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm và sau đó được tinh chế qua cột silicagel (gradient dung môi; 0 → 30% axeton/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (206 mg). MS (ESI): 609,4 [M+Na]⁺

(vi) Tổng hợp tert-butyl glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat)

Sử dụng tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (205 mg), sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (223 mg) thu được theo cách tương tự như trong Ví dụ 2-12 (iv) nêu trên. MS (ESI): 487,4

(vii) Tổng hợp glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin mono(trifloaxetat)

TFA (1mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat) (9 mg) trong diclometan (1mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (8 mg). MS (ESI): 431,3

(viii) Tổng hợp N-[(4-{[1,4,7,10-tetrakis(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl]metyl}phenyl)carbamoithiyl] glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin

DIPEA (35 μ L) được bổ sung vào hỗn hợp gồm glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin mono(trifloaxetat) (8 mg) và axit 2,2',2'',2'''-{2-[(4-isothioxyanatophenyl)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetrayl}tetraaxetic (được viết tắt là p-SCN-Bn-DOTA) (8 mg) trong DMF (1mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Hỗn hợp được pha loãng bằng dung dịch nước TFA 1% (khoảng 5mL) và được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi 5 $\rightarrow$ 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (13 mg). MS (ESI): 982,3

(ix) Tổng hợp hydro [N-{[4-({1,4,7,10-tetrakis[(carboxy- κ O)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl- κ^4 N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}metyl)phenyl]carbamoithiyl}glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(4-)]gadolinat(1-)

N-[(4-{[1,4,7,10-tetrakis(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl]metyl}phenyl)carbamoithiyl]glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin (12 mg) được pha loãng bằng nước (5mL), và gadolini clorua (4 mg) được bổ sung. Độ pH của hỗn hợp được điều chỉnh đến 5 đến 6 bằng 0,1 M natri hydro cacbonat, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch nước EDTA 0,5M (80 μ L) được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp thu được được khuấy

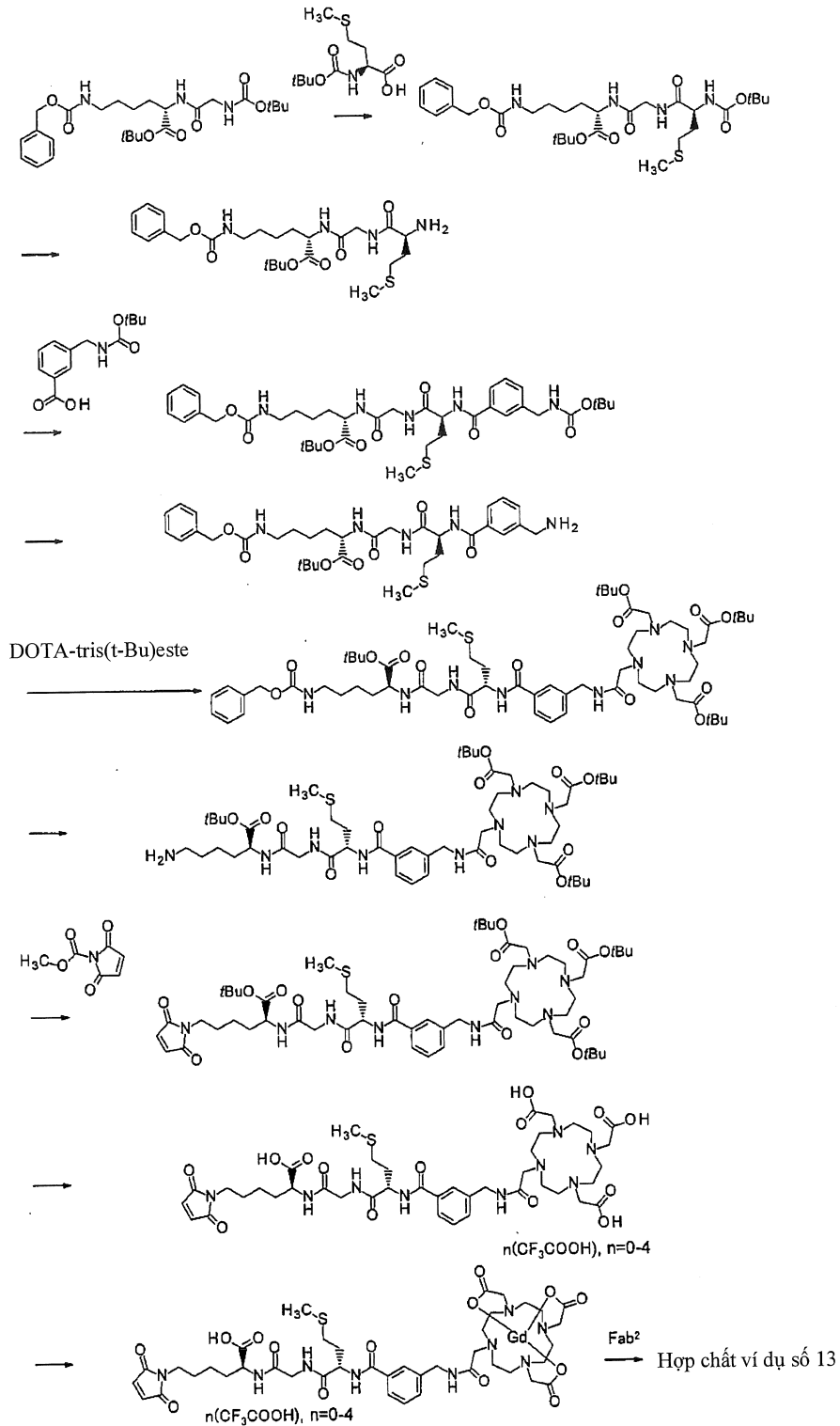
ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. TFA (10 μ L) được bổ sung, và sau đó hỗn hợp thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi 5 $\rightarrow$ 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (5 mg). MS (ESI): 1137,0

(x) Tổng hợp thể tiếp hợp số 12

Sử dụng hydro [N-{[4-({1,4,7,10-tetrakis[(carboxy- κ O)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl- κ^4 N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰})metyl]phenyl]carbamoithiyl}glyxyl-L-phenylalanyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(4-)]gadolinat(1-), thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước (x) của Ví dụ 2-11 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOXA 4 nhánh-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=S)-Gly-Phe-Lys*-Z₂(#N)] có khối lượng phân tử 1136 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-13 Tổng hợp ([Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)]p-Fab²))

[Công thức hóa học 109]



(i) Tổng hợp tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat

TFA (3mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)glyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate (1,00 g) trong diclometan (6mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, sau đó dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung, và hỗn hợp thu được được chiết hai lần bằng diclometan. Các lớp hữu cơ gom lại được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, và sau đó được làm khô qua natri sulfat khan, được lọc, và sau đó được cô. N-(tert-butoxycarbonyl)-L-methionin (556 mg), diclometan (10mL), DIPEA (2mL), và HATU (1,16 g) được bổ sung vào cặn này, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Phản ứng dung dịch được cô, sau đó dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung vào phần cặn, và hỗn hợp thu được được chiết hai lần bằng diclometan. Các lớp hữu cơ gom lại được rửa bằng dung dịch nước natri hydroxit 1M và dung dịch nước natri clorua bão hòa, và sau đó được làm khô qua natri sulfat khan, được lọc, và sau đó được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,70 g). MS (ESI+); 625,5

(ii) Tổng hợp tert-butyl L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate

TFA (4mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate (1,70 g) trong diclometan (10mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 7 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (amino silicagel, gradien dung môi; 0 → 4% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (663 mg). MS (ESI+); 525,4

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-(3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate

Hỗn hợp gồm tert-butyl L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate (663 mg), diclometan (6mL), axit 3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoic (480 mg), DIPEA (700 μ L), và HATU (960 mg) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng

trong 39 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 → 100% ethyl axetat/hexan) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (935 mg). MS (ESI+); 758,5

(iv) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(aminometyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat

TFA (2mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl N-(3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (935 mg) trong diclometan (2mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Et₃N và amino silicagel được bổ sung, hỗn hợp thu được được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (amino silicagel, gradient dung môi; 0 → 10% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (260 mg). MS (ESI+); 658,5

(v) Tổng hợp tert-butyl N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat

Sử dụng tert-butyl N-[3-(aminometyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (260 mg), hợp chất nêu ở đề mục (353 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (v) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI-); 1210,4

(vi) Tổng hợp tert-butyl N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-L-lysinat

Sử dụng tert-butyl N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (353 mg), hợp chất nêu ở đề mục (245 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (vi) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI): 1078,8

(vii) Tổng hợp tert-butyl N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

Sử dụng tert-butyl N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-

tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-L-lysinat (245 mg), hợp chất nêu ở đề mục (139 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (vii) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI): 1158,8

(viii) Tổng hợp N-[3-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin

Sử dụng tert-butyl N-[3-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (341 mg), hợp chất nêu ở đề mục (38,2 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (viii) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI): 934,4

(ix) Tổng hợp [N-{3-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]benzoyl}-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini

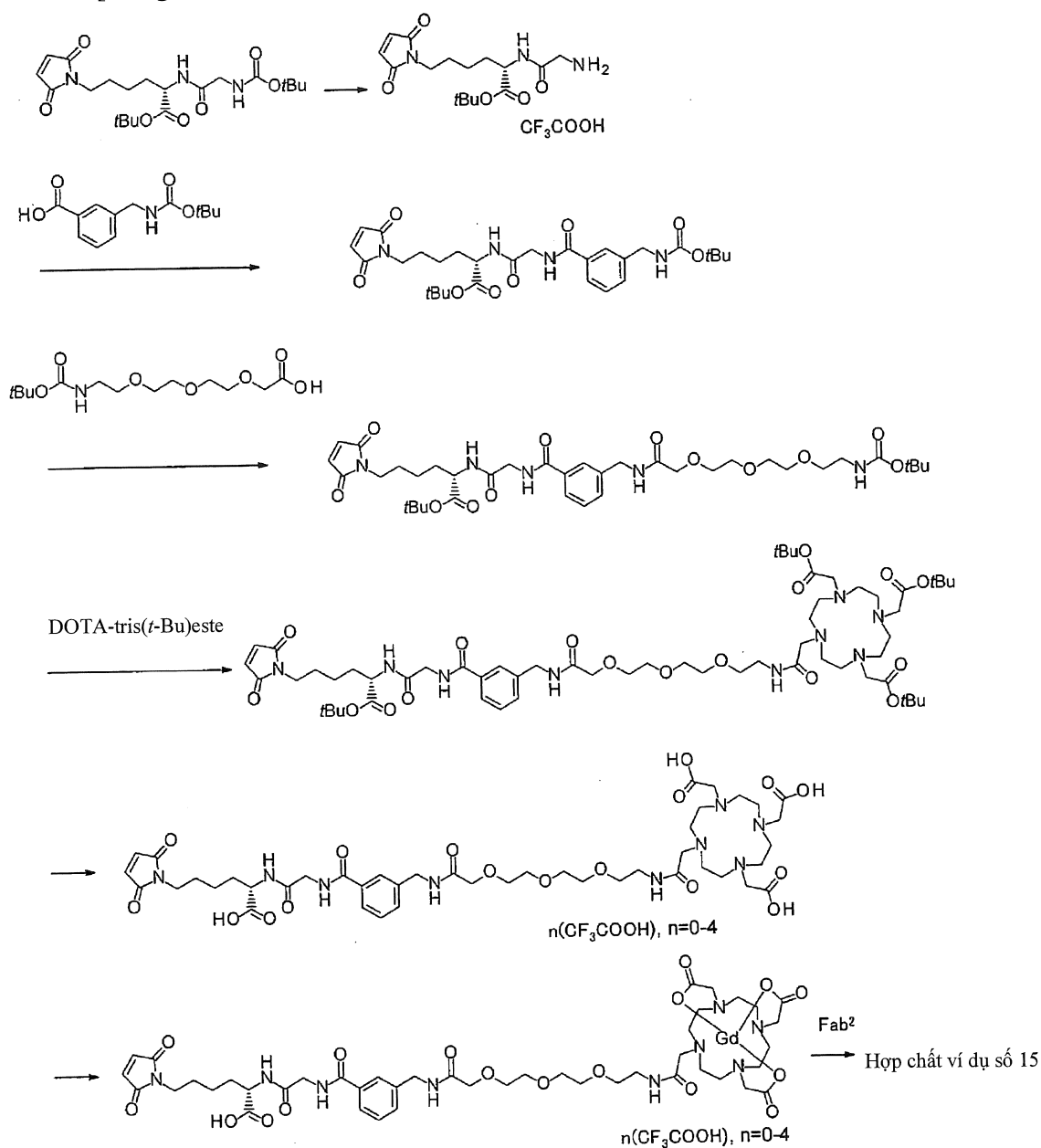
Sử dụng N-[3-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin (28 mg), hợp chất nêu ở đề mục (13,8 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (ix) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI): 1089,2

(x) Tổng hợp thể tiếp hợp số 13

Sử dụng [N-{3-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]benzoyl}-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini, thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước (x) của Ví dụ 2-11 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)] có khối lượng phân tử 1089 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-15 Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Lys*-Z₂(#N)]p-Fab²)

[Công thức hóa học 110]



(i) Tổng hợp tert-butyl glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat)

TFA (4mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat

(400 mg) trong diclometan (4mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện làm lạnh bằng băng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (642 mg). MS (ESI+); 340,4

(ii) Tổng hợp tert-butyl N-(3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoyl)glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

Axit 3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoic (228 mg), DIPEA (1,5mL), và HATU (345 mg) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat) (642 mg) và diclometan (6mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 → 4% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (489 mg). MS (ESI+); 573,4

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(17,17-dimetyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoyl]glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

TFA (2mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-(3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoyl)glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (489 mg), anisol (280 μ L), và diclometan (5mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó diclometan (7mL) được bổ sung, và axit 2,2-dimetyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-oic (289 mg), DIPEA (1,5mL), và HATU (487 mg) được bổ sung trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 → 1% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (427 mg). MS (ESI+); 762,5

(iv) Tổng hợp tert-butyl N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl}benzoyl)glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

TFA (1,3mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-[3-(17,17-dimethyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoyl]glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (427 mg), anisol (200 μ L), và diclometan (4mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó DMF (6mL) được bổ sung, và DOTA-tris(t-Bu) este (353 mg), DIPEA (0,96mL), và HATU (320 mg) được bổ sung trong điều kiện làm lạnh bằng nước đá, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 10% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (863 mg). MS (ESI): 1238,9 [M+Na]⁺

(v) Tổng hợp N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl}benzoyl)glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin

Sử dụng tert-butyl N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl}benzoyl)glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (863 mg), hợp chất nêu ở đề mục (40,0 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (viii) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI): 992,5

(vi) Tổng hợp [N-{3-[3-oxo-15-(oxo- κ O)-16-{4,7,10-tris[(carboxy- κ O)methyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]- κ^4 N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl]benzoyl}glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5)-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini

Sử dụng N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl}benzoyl)glyxyl-

6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin (40 mg), hợp chất nêu ở đề mục (15,9 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (ix) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI-); 1145,0

(vii) Tổng hợp thể tiếp hợp số 15

[0262] Sử dụng [N-{3-[3-oxo-15-(oxo-κO)-16-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl]benzoyl}glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5)-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini, thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước (x) của Ví dụ 2-11 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Lys*-Z₂(#N)] có khối lượng phân tử 1147 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-24 Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)]p-Fab²))

Tổng hợp thể tiếp hợp số 24 (tiếp hợp qua iminothiolan)

Chất đệm borat 0,1 M (5 μL) gồm 2 mg/mL 2-iminothiolan (sau đây, được viết tắt là 2-IT) được bổ sung vào 4,45 mg/mL chất đệm borat Fab² (160 μL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 40 phút. 2-IT dư được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL lặp lại 3 lần, và cuối cùng được cô.

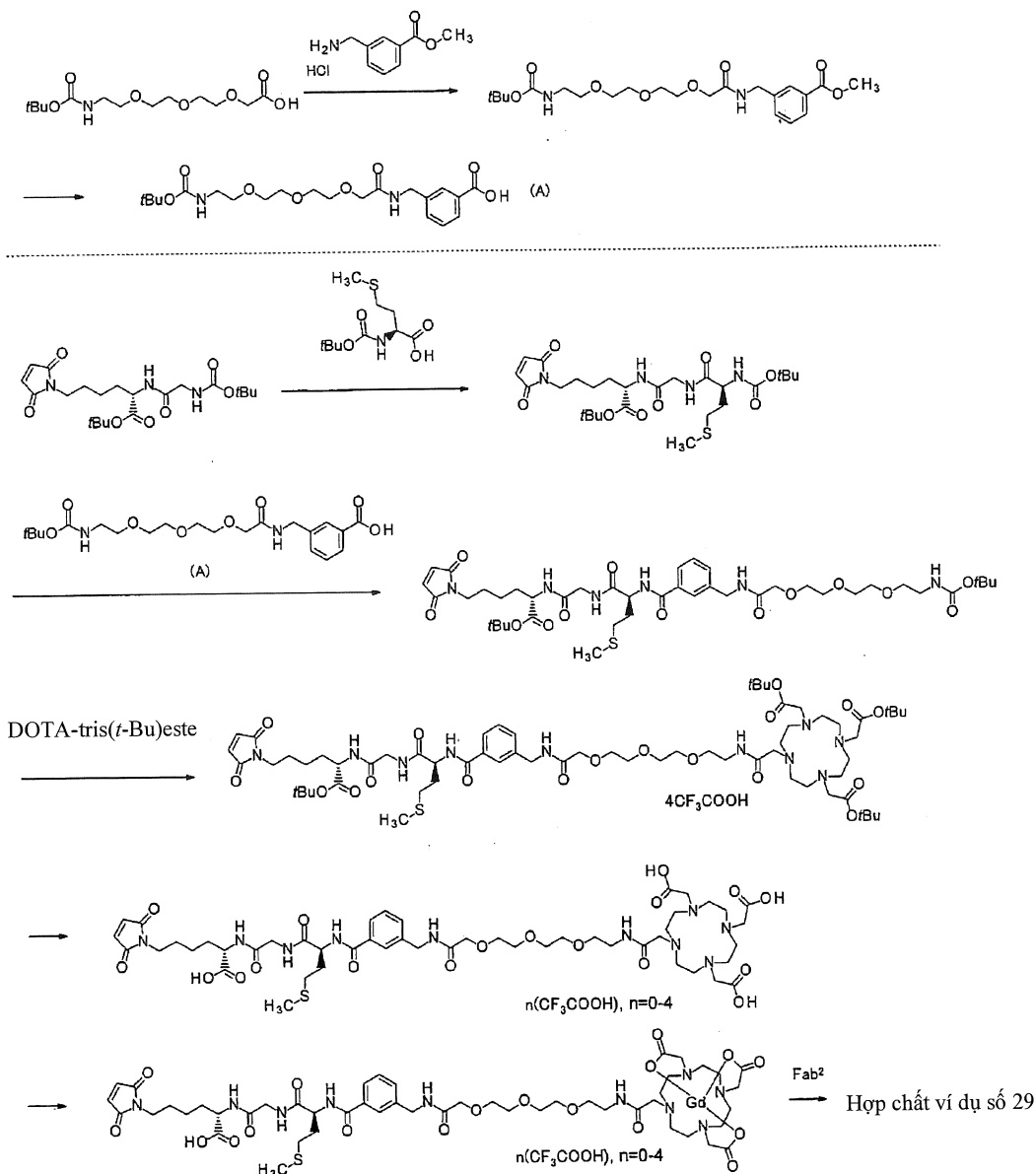
[N-{3-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]benzoyl}-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-13 (ix) được hòa tan trong DMSO (40 μL). Chất đệm borat 0,1 M (40 μL) được bổ sung vào dung dịch thu được, và dung dịch nước natri cacbonat 0,1M được bổ sung để tạo ra độ pH = 6,0.

Dung dịch liên kết được điều chế được bổ sung vào phân lọc thu được chứa

kháng thể, và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. Dung dịch nước muối đệm phosphat chứa EDTA (độ pH = 6,0) được bổ sung, và sau đó hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 10 phút. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL. Dung dịch thu hồi được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat 7 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)] có khối lượng phân tử 1190 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-29 Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)]p-Fab²)

[Công thức hóa học 111]



(i) Tổng hợp methyl 3-(17,17-dimethyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoat

Methyl 3-(aminometyl)benzoat monohydroclorua (286 mg), HATU (590 mg), và Et₃N (900 μ L) được bổ sung vào dung dịch gồm axit 2,2-dimetyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-oic (396 mg) trong diclometan (10mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và phần lỏng còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradien

dung môi; 2 → 6% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (598 mg).

MS (ESI+); 455,2

(ii) Tổng hợp axit 3-(17,17-dimetyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoic

Dung dịch nước natri hydroxit 1M (4mL) và nước (5mL) được bổ sung vào dung dịch gồm metyl 3-(17,17-dimetyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoat (597 mg) trong THF (15mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Phản ứng dung dịch được pha loãng bằng nước, 10% axit xitric được bổ sung, sau đó hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat, và lớp hữu cơ thu gom được rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô qua magie sulfat khan và được lọc, và sau đó phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (662 mg). MS (ESI+); 441,1

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

TFA (3mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (1,63 g) và diclometan (5mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm. DIPEA (5mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm N-(tert-butoxycarbonyl)-L-methionin (1,11 g), diclometan (8mL), và HATU (2,12 g), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Dung dịch chứa phần lắng cặn thu được trong phản ứng trước đó trong diclometan (4mL) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradien dung môi; 0 → 5% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,63 g). MS (APCI/ESI+); 571,3

(iv) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(17,17-dimetyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-

1-yl)-L-norleuxinat

TFA (2mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (150 mg) và diclometan (2mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm. DIPEA (360 μ L) được bổ sung vào hỗn hợp gồm axit 3-(17,17-dimetyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoic (120 mg), diclometan (3mL), và HATU (150 mg), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Dung dịch chứa phần lắng cặn thu được trong phản ứng trước đó trong diclometan (2mL) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 5% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (113 mg). MS (ESI+); 893,4

(v) Tổng hợp tert-butyl N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclo-dodecan-1-yl)]-5,8,11-trioxa-2,14-diaza-hexadecan-1-yl}benzoyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat tetrakis(trifloaxetat)

TFA (2mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-[3-(17,17-dimetyl-3,15-dioxo-5,8,11,16-tetraoxa-2,14-diazaoctadecan-1-yl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (113 mg) và diclometan (2mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ và sau đó được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. DIPEA (0,22mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm DOTA-tris(t-Bu)este (80 mg), HATU (80 mg), và dimetylaxetamit (sau đây, được viết tắt là DMAc) (1mL) ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp thu được được khuấy trong 10 phút, sau đó hỗn hợp gồm sản phẩm thô thu được trước đó trong DMAc (1mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo

(gradien dung môi; 0 → 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (178 mg). MS (ESI-); 1345,8

(vi) Tổng hợp N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl}benzoyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin

Sử dụng tert-butyl N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl}benzoyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat tetrakis(trifloaxetat) (178 mg), hợp chất nêu ở đề mục (60,0 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (viii) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (APCI/ESI+); 1123,4

[0266] (vii) Tổng hợp [N-{3-[3-oxo-15-(oxo-κO)-16-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl]benzoyl}-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini

Sử dụng N-(3-{3,15-dioxo-16-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl}benzoyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin (40 mg), hợp chất nêu ở đề mục (10,3 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (ix) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI): 1278,3

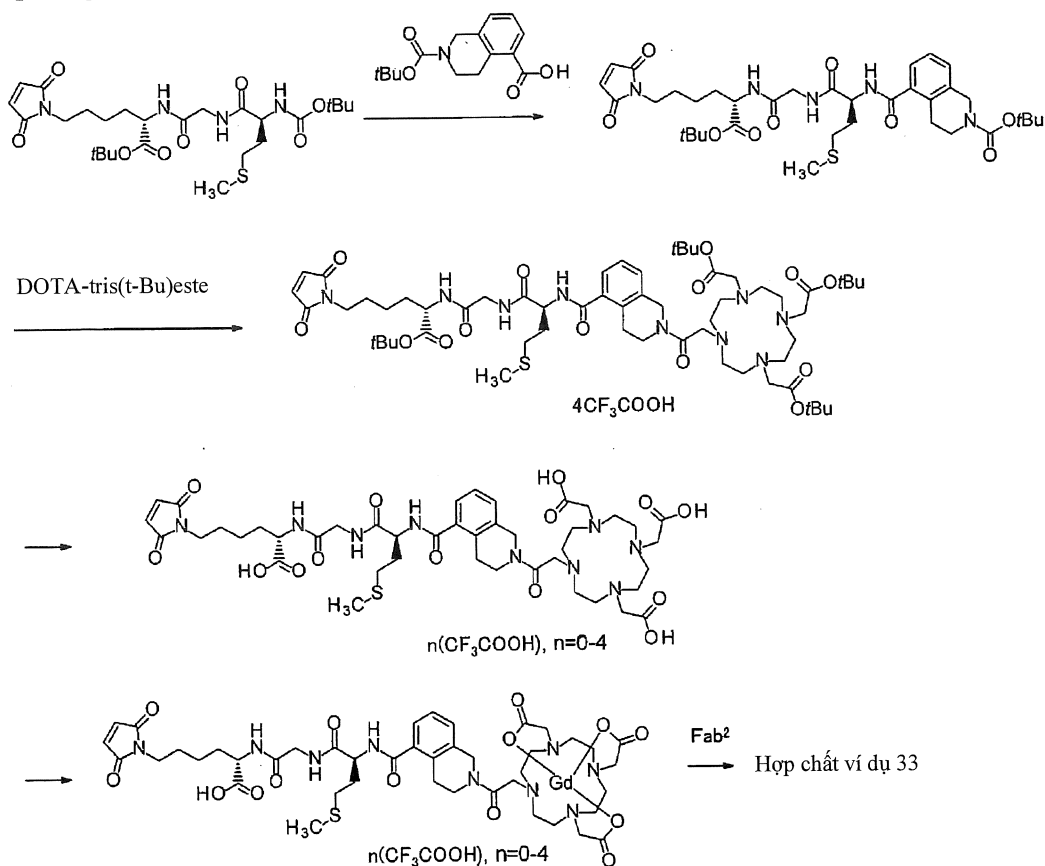
(viii) Tổng hợp thể tiếp hợp số 29

Sử dụng [N-{3-[3-oxo-15-(oxo-κO)-16-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}-5,8,11-trioxa-2,14-diazahehexadecan-1-yl]benzoyl}-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini, thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước (x) của Ví dụ 2-11 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)] có khối lượng phân tử 1278 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này

được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-33 Tổng hợp ([Gd/DOTA-[2,5-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)]p-Fab²)

[Công thức hóa học 112]



(i) Tổng hợp tert-butyl N-[2-(tert-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carboxyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat

TFA (2mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (150 mg) và diclometan (2mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm. Dung dịch chứa phần lắng cặn thu được trong phản ứng trước đó trong diclometan (2mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm axit 2-(tert-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carboxylic (88 mg), diclometan (2mL), HATU (150 mg), và

DIPEA (360 μ L), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 6% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (231 mg). MS (APCI/ESI+); 752,2 [M+Na]⁺

(ii) Tổng hợp tert-butyl N-(2-{[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat tetrakis(trifloaxetat)

Sử dụng tert-butyl N-[2-(tert-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (231 mg), hợp chất nêu ở đề mục (222 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (v) của Ví dụ 2-29 nêu trên. MS (ESI-); 1182,7

(iii) Tổng hợp N-(2-{[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin

Sử dụng tert-butyl N-(2-{[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat tetrakis(trifloaxetat) (222 mg), hợp chất nêu ở đề mục (53 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (viii) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (APCI/ESI+); 960,2

[0269] (iv) Tổng hợp {N-[2-(2-{[4,7,10-tris[(carboxy- κ O)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]- κ^4 N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰]axetyl- κ O)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)} gadolini

Sử dụng N-(2-{[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin (22 mg), hợp chất nêu ở đề mục (7,0 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (ix) của Ví dụ 2-11 nêu trên. MS (ESI): 1115,3

(v) Tổng hợp thể tiếp hợp số 33

Sử dụng hợp chất ở mục (iv), thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước (x) của Ví dụ 2-11 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOA-[2,5-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#N)] có khối lượng phân tử 1115 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

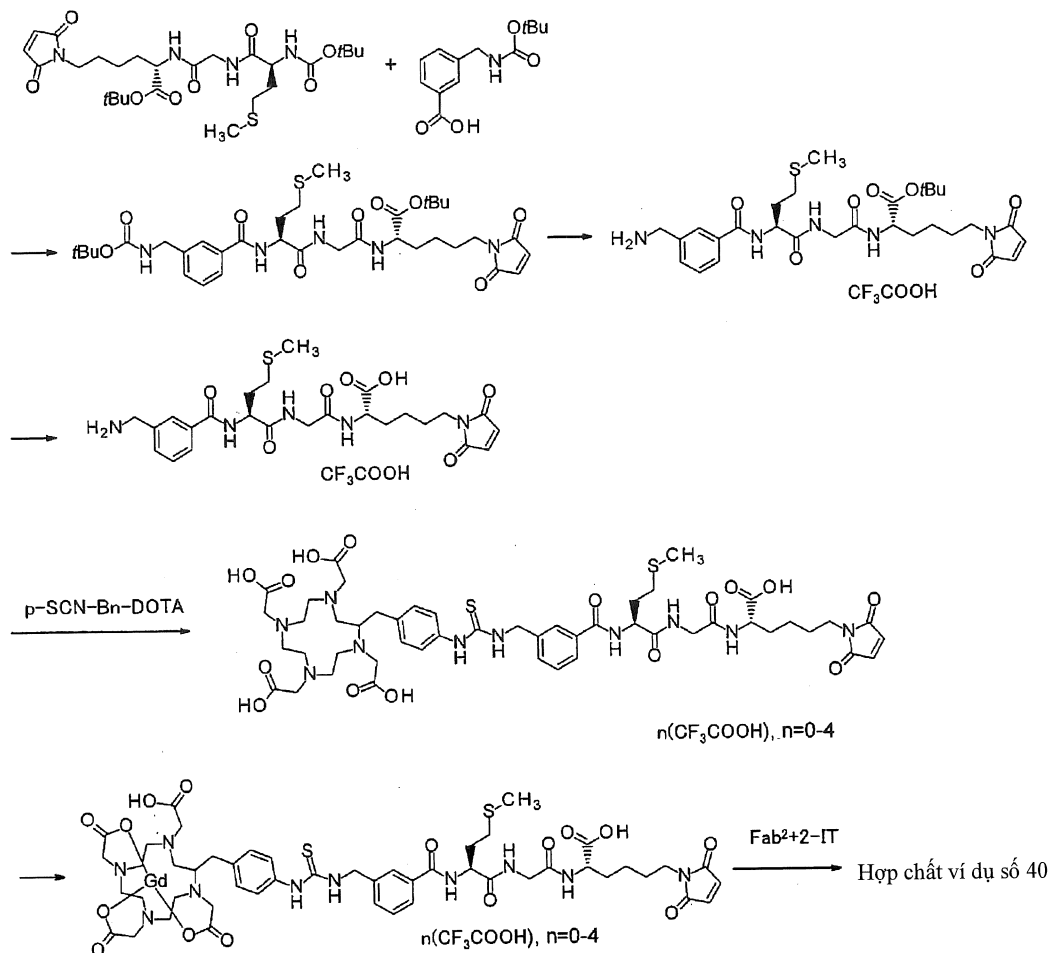
Ví dụ 2-35 Tổng hợp ([Gd/DOA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)]p-Fab²)

Tổng hợp thể tiếp hợp số 35

Sử dụng [N-{3-[3-oxo-15-(oxo-κO)-16-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}-5,8,11-trioxa-2,14-diazahexadecan-1-yl]benzoyl}-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(3-)]gadolini được tổng hợp trong Ví dụ 2-29 (vii), thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước của Ví dụ 2-24 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOA-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)] có khối lượng phân tử 1380 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa.

Ví dụ 2-40 Tổng hợp [Gd/DOA 4 nhánh-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)]p-Fab²)

[Công thức hóa học 113]



(i) Tổng hợp tert-butyl N-(3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl} benzoyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat

Sử dụng tert-butyl N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat (690 mg), hợp chất nêu ở đề mục (710 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (i) của Ví dụ 2-33 nêu trên. MS (ESI): 726,5 [M+Na]⁺

(ii) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(aminometyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat)

Sử dụng tert-butyl N-(3-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl} benzoyl)-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat (41 mg), sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (42 mg) thu được theo cách tương tự như trong Ví

dụ 2-12 (iv) nêu trên. MS (ESI): 604,3

(iii) Tổng hợp N-[3-(aminometyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin mono(trifloaxetat)

TFA (2mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-[3-(aminometyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat mono(trifloaxetat) (41 mg) trong diclometan (4mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm và sau đó được làm khô đẳng phí bằng toluen để thu được sản phẩm thô (43 mg). 16 mg sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi; 5 → 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (11 mg). MS (ESI): 548,2

(iv) Tổng hợp N-[3-({[(4-{[1,4,7,10-tetrakis(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl]metyl}phenyl)carbamoithieryl]amino}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin

Sử dụng N-[3-(aminometyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin mono(trifloaxetat) (11 mg), hợp chất nêu ở đề mục (17 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (viii) của Ví dụ 2-12 nêu trên. MS (ESI): 1099,5

(v) Tổng hợp hydro [N-{3-[(4-{[1,4,7,10-tetrakis[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl]-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}metyl)phenyl]carbamoithieryl]amino)metyl]benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(4-)]gadolinat(1-)

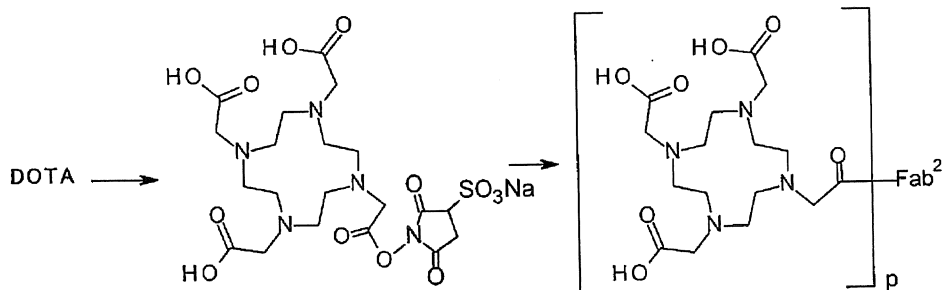
Sử dụng N-[3-({[(4-{[1,4,7,10-tetrakis(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl]metyl}phenyl)carbamoithieryl]amino}metyl)benzoyl]-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin (16 mg), hợp chất nêu ở đề mục (6 mg) thu được theo cách tương tự như ở bước (ix) của Ví dụ 2-12 nêu trên. MS (ESI): 1254,6

(vi) Tổng hợp thể tiếp hợp số 40

Sử dụng hydro [N-{3-[(4-{(1,4,7,10-tetrakis[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-2-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰)}methyl)phenyl]carbamothioyl}amino)methyl]benzoyl}-L-metionylglyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinato(4-)]gadolinat(1-), thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước của Ví dụ 2-24 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA 4 nhánh-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=S)-NH-CH₂-(1,3-Ph)-C(=O)-Met-Gly-Lys*-Z₂(#S)] có khối lượng phân tử 1355 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-47 Tổng hợp ([Gd/DOTA]p-Fab²)

[Công thức hóa học 114]

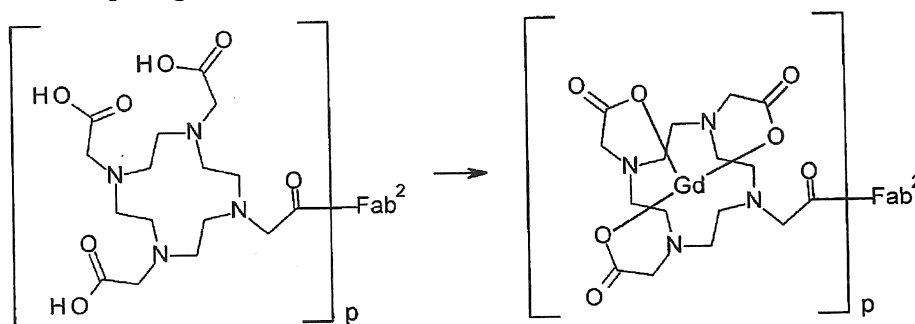


Dung dịch nước natri hydroxit 1M (80 µL) được bổ sung vào dung dịch đã trộn gồm axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic (DOTA) (16 mg) và nước (810 µL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng để điều chỉnh độ pH đến 6. Natri 1-hydroxy-2,5-dioxopyrrolidin-3-sulfonat (2,3 mg) được hoà tan trong nước (117 µL) được bổ sung vào dung dịch thu được (239 µL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng. Sau đó, dung dịch nước 3-{[(etylimino)metyliden]amino}-N,N-dimetylpropan-1-amin monohydroclorua (sau đây, được viết tắt là EDC HCl) (8,3 µL, 25 mg/mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy trong 30 phút trong điều kiện làm lạnh bằng băng để điều chế dung dịch N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. Trước khi bổ sung Fab², dung dịch nước dinatri hydro phosphat ở 0,2M (độ pH = 9) (40 µL) được bổ sung

để điều chỉnh độ pH đến 7.

(i) Dung dịch N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA đã được điều chế (200 μL) được bổ sung vào dung dịch nước dinatri hydro phosphat ở 0,1M (390 μL) 17,8 mg/mL Fab^2 (60 μL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 4°C trong 23 giờ. Phần tử liên kết dư được rửa bằng dung dịch đệm phosphat 10mM sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL lặp lại 3 lần, được rửa bằng chất đệm amoni axetat 0,3M, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp.

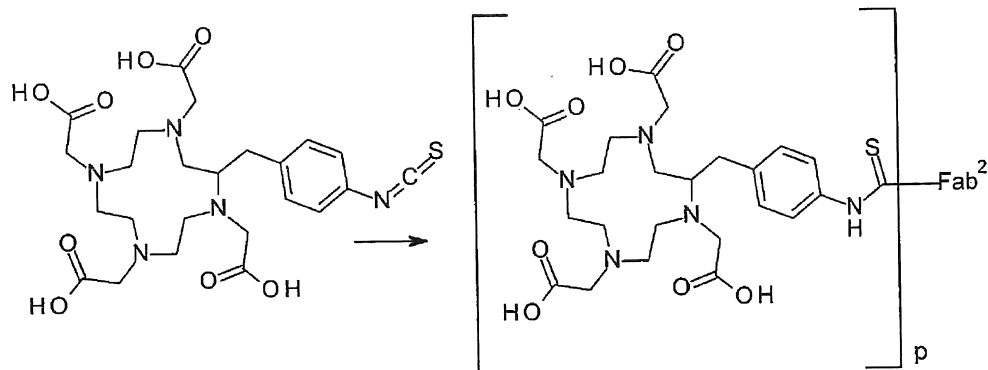
[Công thức hóa học 115]



(ii) Chất đệm amoni axetat 0,3M chứa thể tiếp hợp được điều chế trong (i) được pha loãng bằng cùng một chất đệm, và độ pH được điều chỉnh đến 6,62 sử dụng chất đệm axetat 0,25M, dung dịch nước GdCl_3 (35 μL) được điều chế thành 0,057 M được bổ sung vào dung dịch Fab^2 được điều chế thành 2,8 mg/ml, và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 0,5 giờ. Sau khi phản ứng, EDTA 0,05M (525 μL) được bổ sung, và sau đó hỗn hợp thu được được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL. Dung dịch thu hồi được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat 5 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một hoặc hai $[\text{Gd}/\text{DOTA}]$ có khối lượng phân tử 542 được gắn kết với một Fab^2 có khối lượng phân tử 47,9 kDa.

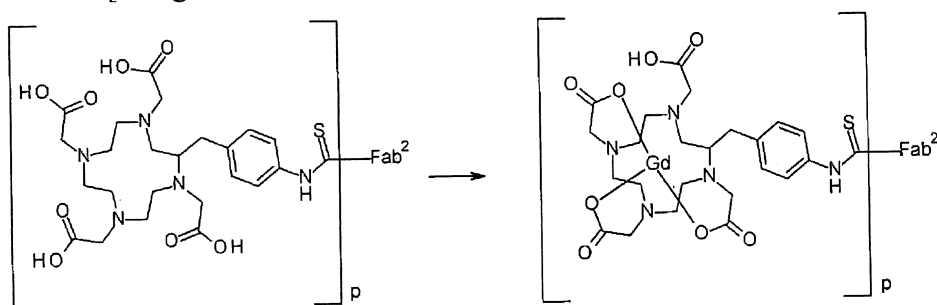
Ví dụ 2-48 Tổng hợp ($[\text{Gd}/\text{DOTA} \text{ 4 nhánh-CH}_2\text{-(1,4-Ph)-NH-C(=S)]_p\text{-Fab}^2$)

[Công thức hóa học 116]



(i) Để liên kết DOTA, là tác nhân chelat hóa, với Fab^2 , p-SCN-Bn-DOTA (Macrocylics, Inc.) được sử dụng. Dung dịch natri cacbonat 0,1M (độ pH=9,0) được bổ sung vào dung dịch Fab^2 được điều chế thành 2,54 mg/mL bằng dung dịch nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4) và glycerin để điều chỉnh độ pH thành 8,8 đến 9,5. P-SCN-Bn-DOTA được bổ sung vào đó, và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi phản ứng, phản ứng sản phẩm được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL để tinh chế thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là thể tiếp hợp trong đó một hoặc hai [DOTA 4 nhánh- CH_2 -(1,4-Ph)- NH-C(=S)] có khối lượng phân tử 553 được gắn kết với một trong số Fab^2 có khối lượng phân tử 47,9 kDa.

[Công thức hóa học 117]

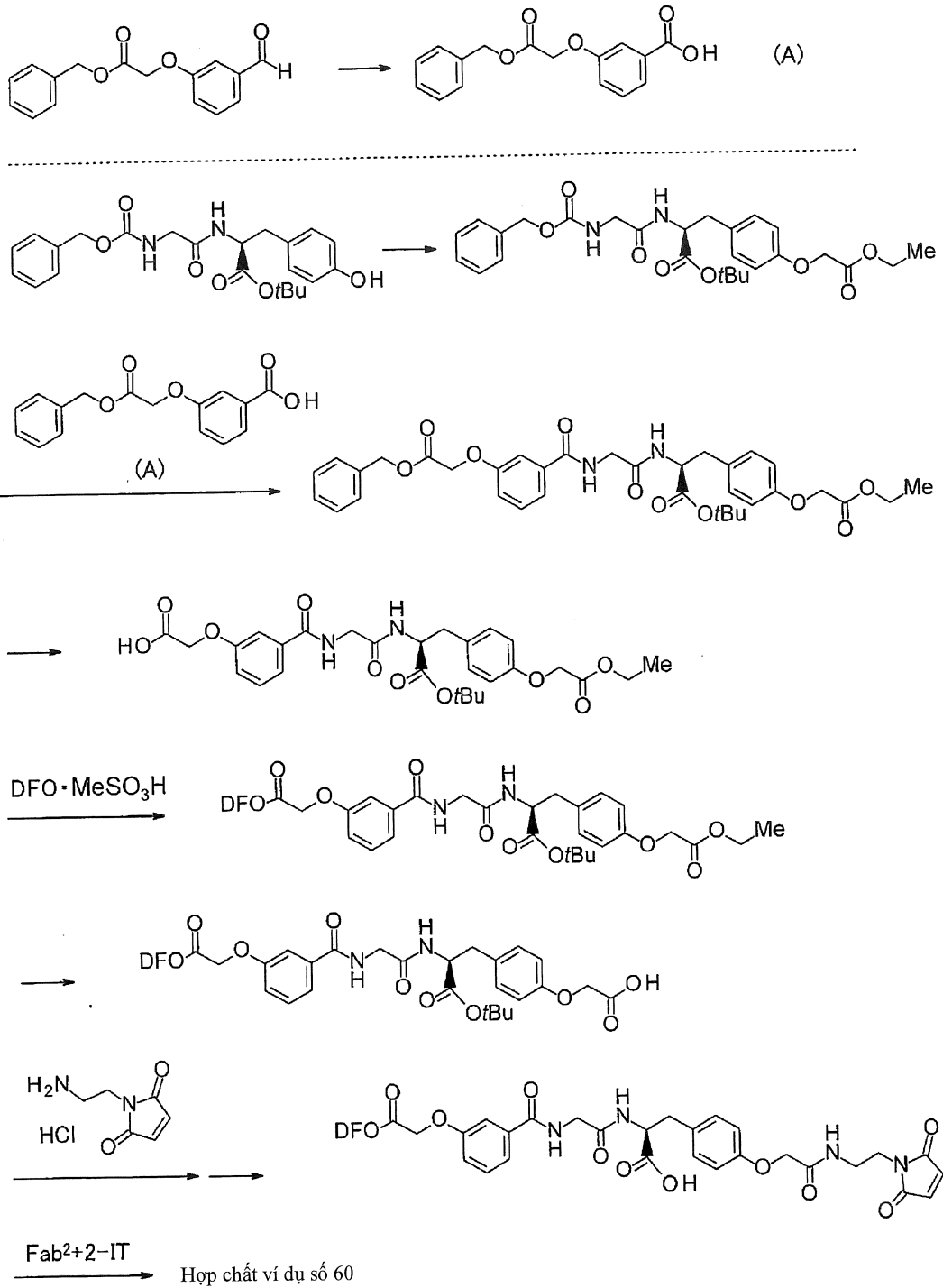


(ii) Sử dụng thể tiếp hợp được điều chế ở mục (i), thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước (ii) của Ví dụ 2-47 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA 4 nhánh- CH_2 -(1,4-Ph)- NH-C(=S)] có khối lượng phân tử 706 được gắn kết với một trong số Fab^2 có khối

lượng phân tử 47,9 kDa.

Ví dụ 2-60 Tổng hợp ([DFO-C(=O)-CH₂O-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)]_p-Fab²)

[Công thức hóa học 118]



(i) Tổng hợp axit 3-[2-(benzyloxy)-2-oxoetoxy]benzoic

2-metylbut-2-en (6mL), natri dihydro phosphat dihydrat (3,35 g), và natri clorua (3,64 g) được bổ sung vào hỗn hợp gồm benzyl (3-formylphenoxy)axetat (2,90 g), 2-metylpropan-2-ol (60mL), và nước (30mL) ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp thu được được khuấy trong 2 giờ. Etyl axetat và axit clohydric 1M (60mL) được bổ sung phản ứng lỏng, và hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa, được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc. Phần lọc được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,93 g).

MS (ESI-); 285,1

(ii) Tổng hợp tert-butyl N-[(benzyloxy)carbonyl]glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat

tert-butyl N-[(benzyloxy)carbonyl]glyxyl-L-tyrosinat (2,49 g) được hòa tan trong axeton (50mL), và etyl bromaxetat (2,05 g) và kali cacbonat (2,41 g) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Chất không hòa tan được lọc bỏ, phần lọc được cô, và phần cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (etyl axetat:hexan = 30:70 → 60:40) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,99 g). MS (ESI): 537,4 [M+Na]⁺

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-{3-[2-(benzyloxy)-2-oxoetoxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat

Tert-butyl N-[(benzyloxy)carbonyl]glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat (2,75 g) được hòa tan trong etanol (55mL), 10% paladi trên cacbon (hàm lượng nước là 50%, 550 mg) được bổ sung trong môi trường agon, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện khí hydro (1 at) qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hệ thống được sục bằng agon, sau đó chất không hòa tan được lọc bỏ, phần lọc được cô, phần cặn lỏng được hòa tan trong diclometan (55mL), axit 3-[2-(benzyloxy)-2-oxoetoxy]benzoic (1,99 g), HATU (2,84 g), và Et³N (1,5mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Phản ứng lỏng được cô và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (etyl axetat:hexan = 30:70 → 70:30) để thu được hợp chất nêu ở đề

mục (3,07 g). MS (ESI-); 647,4

(iv) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(carboxymethoxy)benzoyl]glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat

Tert-butyl N-{3-[2-(benzyloxy)-2-oxoetoxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat (3282 mg) được hòa tan trong THF (66mL), 10% paladi trên cacbon (50% hàm lượng ẩm với nước, 328 mg) được bổ sung trong môi trường agon, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện khí hydro qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng lỏng được lọc qua xelit, và phần lọc được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,54 g). MS (ESI-); 557,4

(v) Tổng hợp tert-butyl N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat

DMF (5mL) và Et₃N (0,16mL) được bổ sung N⁴-{5-[axetyl(hydroxy)amino]pentyl}-N¹-(5-{4-[(5-aminopentyl)(hydroxy)amino]-4-oxobutanamido}pentyl)-N¹-hydroxybutanediamit monometanesulfonat (DFO.MeSO₃H) (500 mg), tert-butyl N-[3-(carboxymethoxy)benzoyl]glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat (446 mg), EDC HCl (175 mg), và 1H-benzotriazol-1-ol (sau đây, được viết tắt là HOBt) (123 mg), và hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch nước TFA 0,1% (1mL) và TFA (0,03mL) được bổ sung phản ứng lỏng, và hỗn hợp thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 → 0:100) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (548 mg). MS (ESI-); 1099,7

(vi) Tổng hợp tert-butyl N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(carboxymetyl)-L-tyrosinat

Metanol (5mL) và DMF (5mL) được bổ sung tert-butyl N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-etoxy-2-oxoetyl)-L-tyrosinat (500 mg) và được gia nhiệt

nhẹ để hòa tan, dung dịch nước natri hydroxit 1M (600 μ L) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch nước natri hydroxit 1M (600 μ L) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. TFA (90 μ L) được bổ sung trong điều kiện làm lạnh bằng băng, metanol được chưng cất trong điều kiện áp suất giảm, và dung dịch thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 $\rightarrow$ 0:100) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (315 mg). MS (ESI-); 1071,6

(vii) Tổng hợp tert-butyl N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-tyrosinat

DMF (4mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(carboxymethyl)-L-tyrosinat (269 mg), EDC HCl (58 mg), và HOBt (41 mg), hơn nữa, 1-(2-aminoethyl)-1H-pyrol-2,5-dion monohydroclorua (44 mg) và Et₃N (35 μ L) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Dung dịch nước TFA 0,1% (1mL) được bổ sung vào phản ứng lỏng, và hỗn hợp thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 $\rightarrow$ 0:100) để thu được hỗn hợp gồm nguyên liệu ban đầu axit carboxylic và hợp chất nêu ở đề mục (155 mg, khoảng 6:4). Hỗn hợp này được hòa tan trong DMSO (1mL) và DMF (2mL), EDC HCl (22 mg) và HOBt (15 mg) được bổ sung, hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, sau đó 1-(2-aminoethyl)-1H-pyrol-2,5-dion monohydroclorua (15,5 mg), và Et₃N (12 μ L) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch nước TFA 0,1% (1mL) được bổ sung vào phản ứng lỏng, và hỗn hợp thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 $\rightarrow$ 10:90) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (118 mg). MS (ESI-); 1193,6

(viii) Tổng hợp N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-

pyrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-tyrosin

Tert-butyl N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-tyrosinat (118 mg) được hòa tan trong TFA (1,2mL), và dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Phản ứng lỏng được cô, DMF (1,5mL) và nước (0,5mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 → 10:90) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (82 mg). MS (ESI-); 1137,5

(ix) Tổng hợp thể tiếp hợp số 60

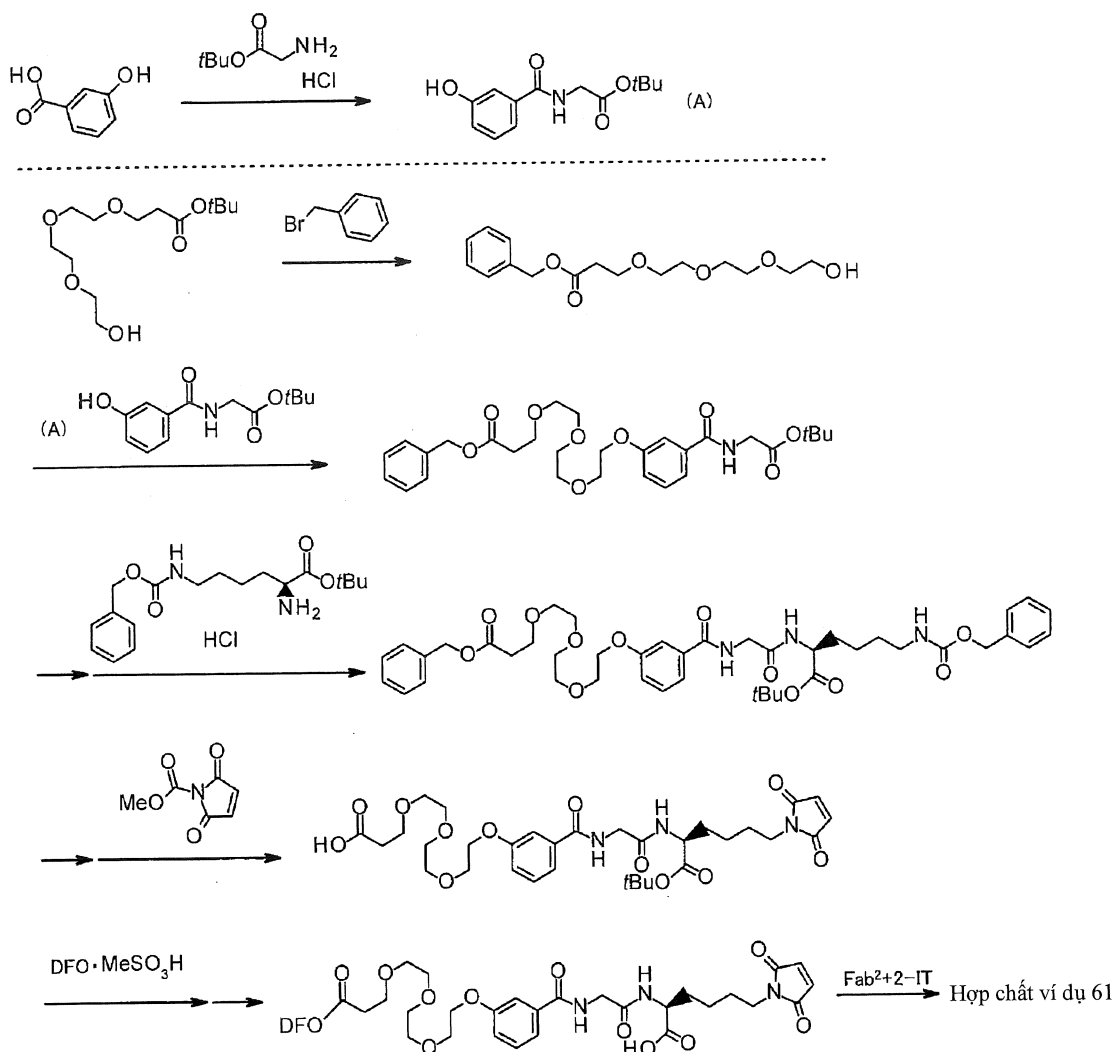
Dung dịch 2-IT được điều chế với chất đệm borat 0,1 M được bổ sung vào dung dịch Fab² được điều chế đến 4,45 mg/mL bằng chất đệm borat 0,1 M, và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 30 phút. 2-IT dư được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat chứa EDTA (độ pH = 6,0) sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng. N-{3-[(9,20,31-trihydroxy-2,10,13,21,24,32-hexaoxo-3,9,14,20,25,31-hexaazatritriacontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-O-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-tyrosin được hòa tan trong DMF được bổ sung vào phần lọc thu được, và hỗn hợp thu được được pha loãng bằng chất đệm borat 0,1 M (độ pH = 8,5) và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Chất phản ứng dư được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat chứa EDTA (độ pH = 6,0) sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL, được lặp lại 3 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng.

Sau đó, dung dịch 2-iodoaxetamit được điều chế đến 10 mg/mL bằng dung dịch nước muối đệm phosphat (độ pH = 6,0) được bổ sung vào dịch nổi bề mặt thu được, và sau đó hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 30 phút. Iodoaxetamit dư được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL lặp lại 3 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để tinh chế thể tiếp hợp gắn kết Fab². Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn

hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [DFO-C(=O)-CH₂O-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Tyr*-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)] có khối lượng phân tử 1241 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa.

Ví dụ 2-61 Tổng hợp ([DFO-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Lys*-Z₂(#S)]_p-Fab²)

[Công thức hóa học 119]



(i) Tổng hợp tert-butyl N-(3-hydroxybenzoyl)glyxinat

HATU (3,3 g) và DIPEA (3mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm axit 3-hydroxybenzoic (1,0 g) và tert-butyl glyxinat monohydroclorua (1,2 g) trong DMF (10mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt

độ trong phòng trong 1 giờ. Nước và etyl axetat được bổ sung vào hỗn hợp, hỗn hợp thu được được tách lớp và chiết hai lần, lớp hữu cơ được rửa bằng nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa, sau đó được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc, sau đó phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm, etyl axetat được bổ sung vào chất rắn thu được, hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng, sau đó chất không hòa tan được thu gom bằng cách lọc, và phần lọc được cô. Phần lỏng còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat = 95/5 → 50/50), các phân đoạn của sản phẩm mong muốn được thu gom, được cô, và được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,23 g). MS (ESI): 274,2 [M+Na]⁺

(ii) Tổng hợp benzyl 3-{2-[2-(2-hydroxyetoxy)etoxy]etoxy}propanoat

hydro clorua 4M/dioxan (10mL) được bổ sung vào tert-butyl 3-{2-[2-(2-hydroxyetoxy)etoxy]etoxy}propanoat (3,0 g) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và sau đó hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô và sau đó đẳng phí được làm khô hai lần bằng toluen, sau đó metanol (20mL) và dung dịch nước natri hydroxit 1M (13mL) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ rưỡi. Hỗn hợp được cô, sau đó THF (10mL), metanol (10mL), và benzyl bromua (1,8mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Hỗn hợp được cô, và phần lỏng còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (hexan/etyl axetat = 95/5 → 0/100 → cloroform/metanol = 90/10) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,19 g). MS (ESI): 313,2

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-{3-[(3-oxo-1-phenyl-2,6,9,12-tetraoxatetradecan-14-yl)oxy]benzoyl}glyxinat

Tert-butyl N-(3-Hydroxybenzoyl)glyxinat (915 mg), benzyl 3-{2-[2-(2-hydroxyetoxy)etoxy]etoxy}propanoat (1,38 g), diethyl azodicarboxylat (40% dung dịch toluen, khoảng 2,2 M, 3,4mL), và THF (20mL) được bổ sung, sau đó triphenylphosphin (2,0 g) được bổ sung từng phần ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ bề là 60°C. Magie clorua (1,5 g) và toluen (20mL) được

bổ sung, và hỗn hợp thu được được gia nhiệt và được khuấy ở nhiệt độ bề là 60°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được để nguội đến nhiệt độ trong phòng, sau đó chất rắn đã kết tủa được lấy ra bằng cách lọc, và dung môi được chưng cất. Phần lỏng còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (silicagel; hexan/ethyl axetat = 95/5 → 20/80) và sau đó được tinh chế lại bằng sắc ký cột silicagel (amino silicagel; hexan/ethyl axetat = 95/5 → 50/50) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,12 g). MS (ESI): 546,4

(iv) Tổng hợp N-{3-[(3-oxo-1-phenyl-2,6,9,12-tetraoxatetradecan-14-yl)oxy]benzoyl}glyxin

Tert-butyl N-{3-[(3-Oxo-1-phenyl-2,6,9,12-tetraoxatetradecan-14-yl)oxy]benzoyl}glyxinat (1,11 g) được hòa tan trong hydro clorua 4M/dioxan (5mL) ở nhiệt độ trong phòng, và dung dịch thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ. Hỗn hợp được cô và được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,12 g). MS (ESI): 490,3

(v) Tổng hợp tert-butyl N-{3-[(3-oxo-1-phenyl-2,6,9,12-tetraoxatetradecan-14-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat

HATU (1,2 g) và DIPEA (1,4mL) được bổ sung vào dung dịch gồm N-{3-[(3-oxo-1-phenyl-2,6,9,12-tetraoxatetradecan-14-yl)oxy]benzoyl}glyxin (1300 mg), tert-butyl N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat monohydroclorua (1,0 g) trong DMF (20mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Nước và ethyl axetat được bổ sung vào hỗn hợp để tách lớp và chiết, lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối bão hòa, sau đó được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc, và sau đó phần lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần lỏng còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (amino silicagel; hexan/ethyl axetat = 90/10 → 0/100) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,14 g). MS (ESI): 808,5

(vi) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(2-{2-[2-(2-carboxyetoxy)etoxy]etoxy}benzoyl)glyxyl-L-lysinat

10% paladi trên cacbon (50% hàm lượng ẩm với nước, 200 mg) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-{3-[(3-oxo-1-phenyl-2,6,9,12-tetraoxatetradecan-14-

yl)oxy]benzoyl}glyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (1,12 g), Et₃N (20 µL), và ethanol (20mL) ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện khí hydro qua đêm ở nhiệt độ này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút hoặc lâu hơn trong hệ thống mở, sau đó phản ứng lỏng được lọc qua xelit, và phân lọc được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (825 mg). MS (ESI): 584,5

(vii) Tổng hợp tert-butyl N-[3-(2-{2-[2-(2-carboxyetoxy)etoxy]etoxy}etoxy)benzoyl]glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat

Metyl 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylat (150 mg) và Et₃N (500 µL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm tert-butyl N-[3-(2-{2-[2-(2-carboxyetoxy)etoxy]etoxy}etoxy)benzoyl]glyxyl-L-lysinat (350 mg), THF (3mL), và DMF (1mL) ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ bể là 60°C trong 4 ngày. Hỗn hợp được làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng, và sau đó TFA (300 µL) và nước (500 µl) được bổ sung để bão hòa hỗn hợp. Lượng thích hợp của nước và DMF được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 → 0:100). Các phân đoạn của sản phẩm mong muốn được thu gom, được cô, và được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (250 mg). MS (ESI): 664,5

(viii) Tổng hợp tert-butyl N-{3-[(19,30,41-trihydroxy-12,20,23,31,34,42-hexaoxo-3,6,9-trioxa-13,19,24,30,35,41-hexaazatritetracontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat

EDC HCl (140 mg), HOBt (100 mg), và DIPEA (200 µL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm N⁴-{5-[axetyl(hydroxy)amino]pentyl}-N¹-(5-{4-[(5-aminopentyl)(hydroxy)amino]-4-oxobutaneamido}pentyl)-N¹-hydroxybutanediamit monometanesulfonat (DFO.MeSO₃H) (240 mg), tert-butyl N-[3-(2-{2-[2-(2-carboxyetoxy)etoxy]etoxy}etoxy)benzoyl]glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-L-norleuxinat (243 mg) trong DMF (3mL) và DMSO (1mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ.

TFA (100 μ L) và nước (500 μ L) được bổ sung, và dung dịch thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 $\rightarrow$ 10:90) và được làm đông khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (207 mg). MS (ESI): 1228,5 [M+Na]⁺

(ix) Tổng hợp N-{3-[(19,30,41-trihydroxy-12,20,23,31,34,42-hexaoxo-3,6,9-trioxa-13,19,24,30,35,41-hexaazatritetracontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin

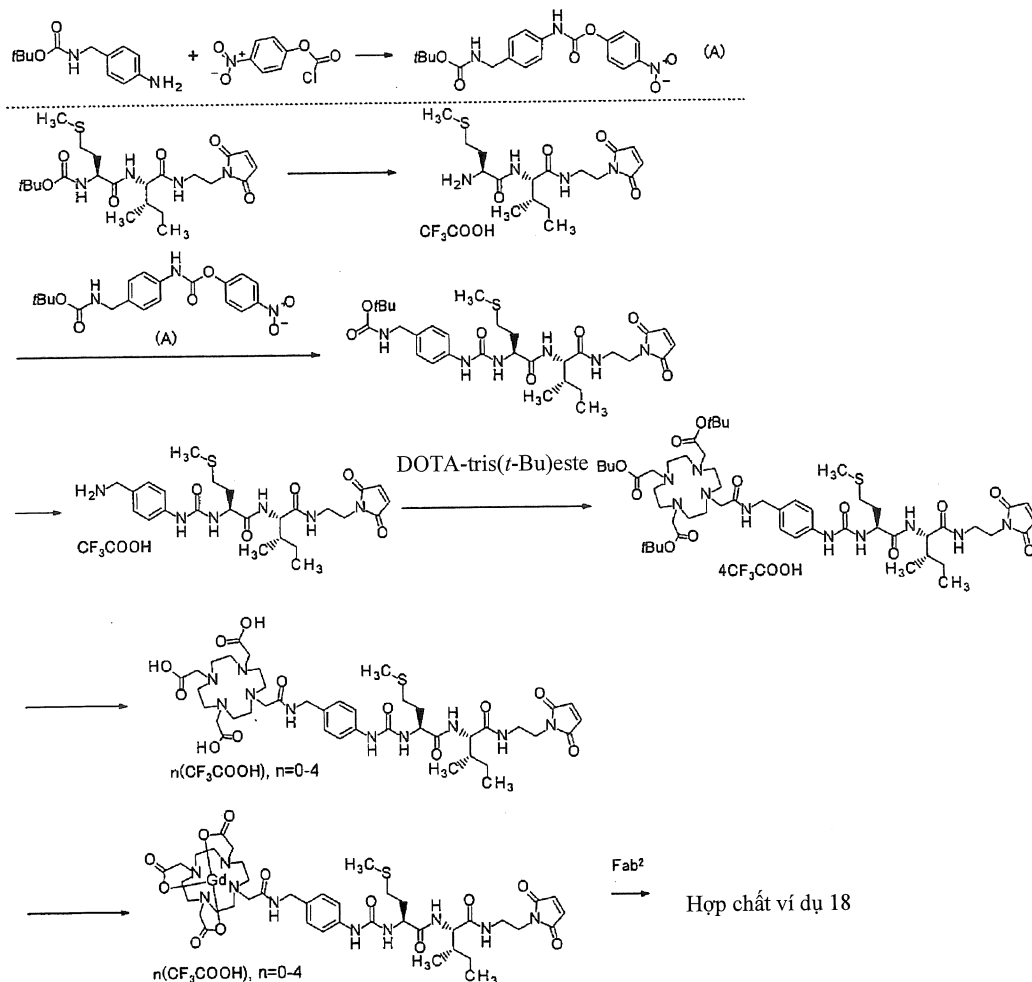
TFA (1mL) được bổ sung vào tert-butyl N-{3-[(19,30,41-trihydroxy-12,20,23,31,34,42-hexaoxo-3,6,9-trioxa-13,19,24,30,35,41-hexaazatritetracontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxinat (202 mg) ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô, DMF (4mL) và nước (500 μ L) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (dung dịch nước TFA 0,1%:axetonitril = 95:5 $\rightarrow$ 10:90) và được làm đông khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (137 mg). MS (ESI-); 1148,7

(x) Tổng hợp thể tiếp hợp số 61

Sử dụng N-{3-[(19,30,41-trihydroxy-12,20,23,31,34,42-hexaoxo-3,6,9-trioxa-13,19,24,30,35,41-hexaazatritetracontan-1-yl)oxy]benzoyl}glyxyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-L-norleuxin, thể tiếp hợp thu được theo cách tương tự như ở bước (ix) của Ví dụ 2-60 nêu trên. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [DFO-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-(1,3-Ph)-C(=O)-Gly-Lys*-Z₂(#S)] có khối lượng phân tử 1252 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-18 Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)]p-Fab²)

[Công thức hóa học 120]



(i) Tổng hợp 4-nitrophenyl (4-{{(tert-butoxycarbonyl)amino}metyl}phenyl)carbamát

Dung dịch chứa 4-nitrophenyl carbonocloridat (952 mg) trong diclometan (10mL) được làm lạnh bằng nước đá trong điều kiện khí nitơ, dung dịch đã trộn gồm tert-butyl [(4-aminophenyl)metyl]carbamát (1000 mg) và pyridin (430 μ L) trong diclometan (10mL) được bổ sung từng giọt, và sau đó hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và phần lỏng còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 10 $\rightarrow$ 100% etyl axetat/hexan) để thu được sản phẩm thô. Etyl axetat được bổ sung vào sản phẩm thô, và hỗn hợp thu được được khuấy để nghiền nhỏ phần rắn. Phần rắn được thu lại bằng cách lọc, được rửa bằng etyl axetat, và sau đó được làm khô trong điều kiện áp

suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (861 mg). MS (ESI): 410,3 [M+Na]⁺

(ii) Tổng hợp L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit mono(trifloaxetat)

TFA (2mL) được bổ sung từng giọt vào dung dịch gồm N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit (257 mg) trong diclometan (4mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, diisopropyl ete được bổ sung, tiến hành lắng gạn hai lần, và chất rắn đã kết tủa được rửa để thu được sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (248 mg). MS (ESI): 385,3

(iii) Tổng hợp N-[(4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}phenyl)carbamoyl]-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit

TEA (59 μ L) được bổ sung vào dung dịch đã trộn gồm 4-nitrophenyl 4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}phenyl)carbamate (54 mg) và L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit mono(trifloaxetat) (70 mg) trong diclometan (5mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và phần lắng cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 2 $\rightarrow$ 6% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (55 mg). MS (ESI): 633,5

[0292] (iv) Tổng hợp N-{[4-(aminometyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit mono(trifloaxetat)

TFA (2mL) được bổ sung từng giọt vào dung dịch gồm N-[(4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}phenyl)carbamoyl]-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit (54 mg) trong diclometan (4mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, diisopropyl ete được bổ sung, tiến hành lắng gạn hai lần, và chất rắn đã kết tủa được rửa để thu được sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (65 mg). MS (ESI): 555,4 [M+Na]⁺

(v) Tổng hợp N-{[4-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit tetrakis(trifloaxetat)

HATU (66 mg) và DIPEA (45 μ L) được bổ sung vào dung dịch đã trộn gồm N-{[4-(aminometyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit mono(trifloaxetat) (64 mg) và DOTA-tris(t-Bu) este (50 mg) trong DMAc (2mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch nước TFA 1% (khoảng 4mL) và axetonitril (khoảng 1mL) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, sau đó dung dịch đã được pha loãng của nó được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi; 20 $\rightarrow$ 100% 0,1% TFA axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (92 mg). MS (ESI): 1109,4 [M+Na]⁺

(vi) Tổng hợp N-{[4-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit tetrakis(trifloaxetat)

TFA (4mL) được bổ sung vào dung dịch gồm N-{[4-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit tetrakis(trifloaxetat) (90 mg) trong diclometan (4mL), và hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi; 5 $\rightarrow$ 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (57 mg). MS (ESI): 919,4

(vii) Tổng hợp N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy- κ O)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl- κ^4 N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido- κ O)metyl]phenyl}carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini

Gadolini clorua (8 mg) được bổ sung vào hỗn hợp gồm N-{[4-({2-[4,7,10-

tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl]axetamido)metyl]phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamit tetrakis(trifloaxetat) (22 mg) và nước (3mL), dung dịch nước natri hydro cacbonat 0,1M được bổ sung để điều chỉnh độ pH từ 5 đến 6, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. TFA (10 µL) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, và sau đó dung dịch của nó được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi 5 → 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (16 mg). MS (ESI-); 1072,1

(viii) Tổng hợp thể tiếp hợp số 18

[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]phenyl}carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-18 (vii) được hòa tan trong DMSO (40 µL). Chất đệm borat 0,1 M (40 µL) được bổ sung vào dung dịch thu được, và độ pH được điều chỉnh đến 7,3 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M và chất đệm axetat 0,25M.

40 µL dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào chất đệm borat chứa 4,45 mg/mL Fab² (160 µL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL. Dung dịch thu hồi được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat 7 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)] có khối lượng phân tử 1074 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

(Ví dụ 2-66. Tổng hợp ([Gd/DOXA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4 và/hoặc A-5)]p-Fab²))

(i) Tổng hợp thể tiếp hợp số 66

[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)methyl]phenyl} carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)ethyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-18 (vii) được hòa tan trong DMSO (40 μL). Chất đệm borat 0,1 M (40 μL) được bổ sung vào dung dịch thu được, và độ pH được điều chỉnh đến 6,5 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M.

Dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào chất đệm borat chứa 4,45 mg/mL Fab² (320 μL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. 10 μL EDTA 0,05M được bổ sung, và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 10 phút. Sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL, hỗn hợp được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, và dung dịch thu được được thu hồi.

Dung dịch đệm bis tris propan 20mM (độ pH = 9,5) được bổ sung vào dung dịch thu hồi, được pha loãng tới lượng gấp 5 lần, được mang trên cột HiTrap Q 5mL (GE Healthcare), và để ở nhiệt độ trong phòng trong 6 giờ. Cột được rửa sử dụng dung dịch đệm bis tris propan 20mM (độ pH = 9,5) và dung dịch nước natri clorua 1M, và dung dịch trợ được thu hồi. Dung dịch đệm được trao đổi với dung dịch nước muối đệm phosphat sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL, sau đó dung dịch được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4 và/hoặc A-5)] có khối lượng phân tử 1092 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó bốn phân tử này được gắn kết vào đó.

(Ví dụ 2-67. Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)]p-Fab²))

(i) Tổng hợp thể tiếp hợp số 67

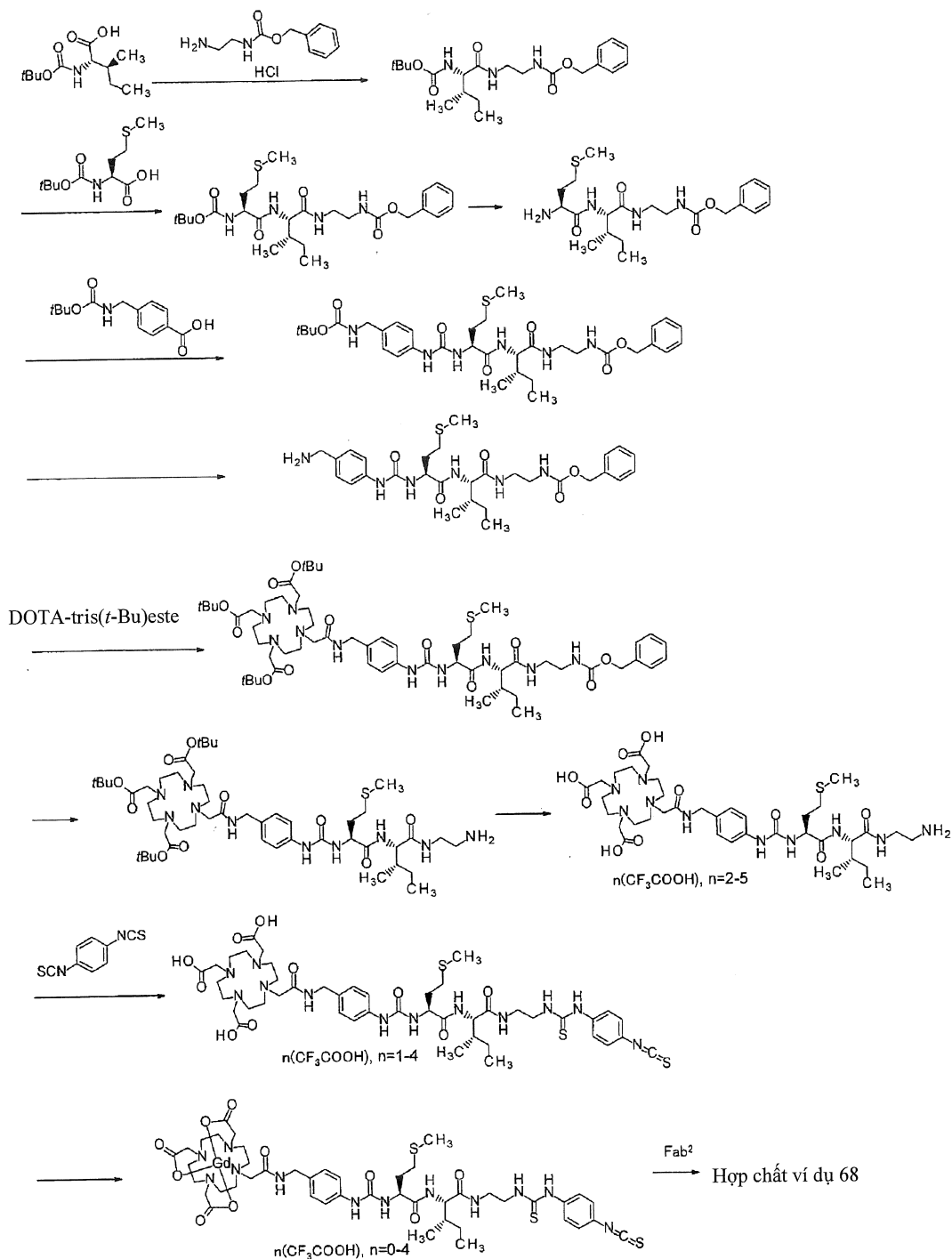
[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)methyl]phenyl} carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)ethyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (2 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-18 (vii) được hòa tan trong DMSO (80 μL), chất đệm borat 0,1 M (80 μL) được bổ sung, và sau đó độ pH được điều chỉnh đến 7,3 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M.

2 mg/mL dung dịch 2-IT (10 μL) được điều chế sử dụng chất đệm borat 0,1 M được bổ sung vào chất đệm borat chứa 4,45 mg/mL Fab² (320 μL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 40 phút. 2-IT dư được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL và được cô tới 200 μL, sau đó dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung, và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. EDTA 0,05M (10 μL) được bổ sung, hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 10 phút, sau đó Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp.

Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)] có khối lượng phân tử 1175 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-68 Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)]p-Fab²))

[Công thức hóa học 121]



(I) Tổng hợp N¹-(2-[(benzyloxy)carbonyl]amino)etyl)-N²-(tert-butoxycarbonyl)-L-isoleuxinamit

DIPEA (6,6mL) và benzyl (2-aminoetyl) carbamat monohydroclorua (3,29 g)

lần lượt được bổ sung vào dung dịch đã trộn gồm N-(tert-butoxycarbonyl)-L-isoleuxin (3,00 g) và HATU (5,92 g) trong diclometan (30mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp thu được được chiết hai lần bằng diclometan. Các lớp hữu cơ gom lại được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, và sau đó được làm khô qua natri sulfat khan, được lọc, và sau đó được cô. 200mL dung dịch ethyl axetat/diclometan (1:2) được bổ sung vào phần cặn, và sau đó hỗn hợp thu được được cô để tạo ra 100mL dung dịch, mà sau đó được làm lạnh bằng nước đá. Chất rắn đã kết tủa được thu gom bằng cách lọc và được rửa bằng ethyl axetat/diclometan (1:1) dung dịch để thu được chất rắn. Phần lọc được cô lại và sau đó làm lạnh bằng nước đá, và chất rắn đã kết tủa được thu gom bằng cách lọc và được rửa bằng dung dịch ethyl axetat/diclometan (1:1) để thu được chất rắn. Chất rắn thu được được kết hợp và được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (4,10 g). MS (ESI): 408,3

(ii) Tổng hợp N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionyl-N¹-(2-
{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-L-isoleuxinamit

TFA (7,51mL) được bổ sung vào dung dịch gồm N¹-(2-
{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-N²-(tert-butoxycarbonyl)-L-isoleuxinamit
(2,00 g) trong diclometan (10mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, sau đó N-(tert-butoxycarbonyl)-L-methionin (1,35 g), DIPEA (4,2mL), diclometan (20mL), và HATU (2,24 g) được bổ sung cặn này, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Chất rắn đã kết tủa được thu gom bằng cách lọc, được rửa bằng diclometan và metanol, và sau đó được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,58 g). MS (ESI): 539,4

(iii) Tổng hợp L-metionyl-N¹-(2-
{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-L-isoleuxinamit

TFA (3mL) được bổ sung từng giọt vào dung dịch gồm N-(tert-butoxycarbonyl)-L-metionyl-N¹-(2-
{[(benzyloxy)carbonyl]amino}ethyl)-L-

isoleuxinamit (1,05 g) trong diclometan (6mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, diclometan và dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung, và hỗn hợp thu được được chiết hai lần bằng diclometan. Các lớp hữu cơ gom lại được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, và sau đó được làm khô qua natri sulfat khan, được lọc, và sau đó được cô để thu được sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (690 mg). MS (ESI): 439,4

(iv) Tổng hợp N-[(4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}phenyl)carbamoyl]-L-metionyl-N¹-(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit

Diphenyl phosphoraziat (680 µL) được bổ sung vào dung dịch đã trộn gồm axit 4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}benzoic (395 mg), TEA (660 µL), và toluen (20mL) trong môi trường agon, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó khuấy ở nhiệt độ bể là 100°C trong 2 giờ. Phản ứng dung dịch được để nguội đến nhiệt độ trong phòng, dung dịch chứa L-metionyl-N¹-(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit (690 mg) trong THF (7mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Phản ứng dung dịch được cô trong điều kiện áp suất giảm, dung dịch nước natri hydro cacbonat và etyl axetat được bổ sung, và chất rắn thu được được lọc, được rửa bằng etyl axetat, và sau đó được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục (790 mg). MS (ESI): 687,5

(v) Tổng hợp N-{[4-(aminometyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit

TFA (2mL) được bổ sung từng giọt vào dung dịch gồm N-[(4-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]metyl}phenyl)carbamoyl]-L-metionyl-N¹-(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit (790 mg) trong diclometan (3mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, và dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung. Chất rắn đã kết tủa được thu gom bằng cách lọc,

được rửa bằng nước, và sau đó được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (720 mg). MS (ESI): 587,6

(vi) Tổng hợp N-{[4-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit

HATU (280 mg) được bổ sung vào dung dịch đã trộn gồm N-{[4-(aminometyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit (360 mg), DOTA-tris(t-Bu) este (386 mg), và DIPEA (320 μ L) trong DMAc (2mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradient dung môi; 0 $\rightarrow$ 20% metanol/cloroform) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (683 mg). MS (ESI+); 1141,9

[0299] (vii) Tổng hợp N-{[4-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-aminoetyl)-L-isoleuxinamit

Hỗn hợp gồm N-{[4-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit (683 mg), 10% paladi trên cacbon (50% hàm lượng ẩm với nước, 382 mg), và metanol (10mL) được khuấy trong điều kiện khí hydro (1 at) ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ chất không hòa tan và sau đó được cô. 10% paladi trên cacbon (hàm lượng nước là 50%, 382 mg) và metanol (10mL) được bổ sung phần lắng cặn, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện khí hydro (1 at) ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ chất không hòa tan và sau đó được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (417 mg). MS (ESI+); 1007,7

(viii) Tổng hợp N-{[4-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-aminoetyl)-L-isoleuxinamit pentakis(trifloaxetat)

Dung dịch đã trộn gồm N-{[4-({2-[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-aminoethyl)-L-isoleuxinamit (417 mg), nước (210 µL), tri(propan-2-yl)silan (210 µL), và TFA (8mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi; 0 → 33% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (255 mg). MS (ESI+); 839,7

(ix) Tổng hợp N-{[4-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-{[(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithioyl]amino}etyl)-L-isoleuxinamit tetrakis(trifloaxetat)

TEA (200 µL) được bổ sung vào dung dịch gồm N-{[4-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-(2-aminoethyl)-L-isoleuxinamit pentakis(trifloaxetat) (255 mg) trong DMAc (2mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 10 phút. Dung dịch chứa 1,4-diisothioxyanatobenzen (174 mg) trong DMAc (2mL) được bổ sung vào dung dịch, và hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ. Phản ứng dung dịch được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi; 0 → 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (136 mg). MS (ESI+); 1031,4

(x) Tổng hợp N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]phenyl}carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-{[(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithioyl]amino}etyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini

Gadolini clorua (10 mg) và dung dịch nước natri hydro cacbonat 0,1M (1,7mL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm N-{[4-({2-[4,7,10-tris(carboxymetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido}metyl)phenyl]carbamoyl}-L-metionyl-N¹-[2-

{[(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithiyl]amino}ethyl]-L-isoleuxinamit

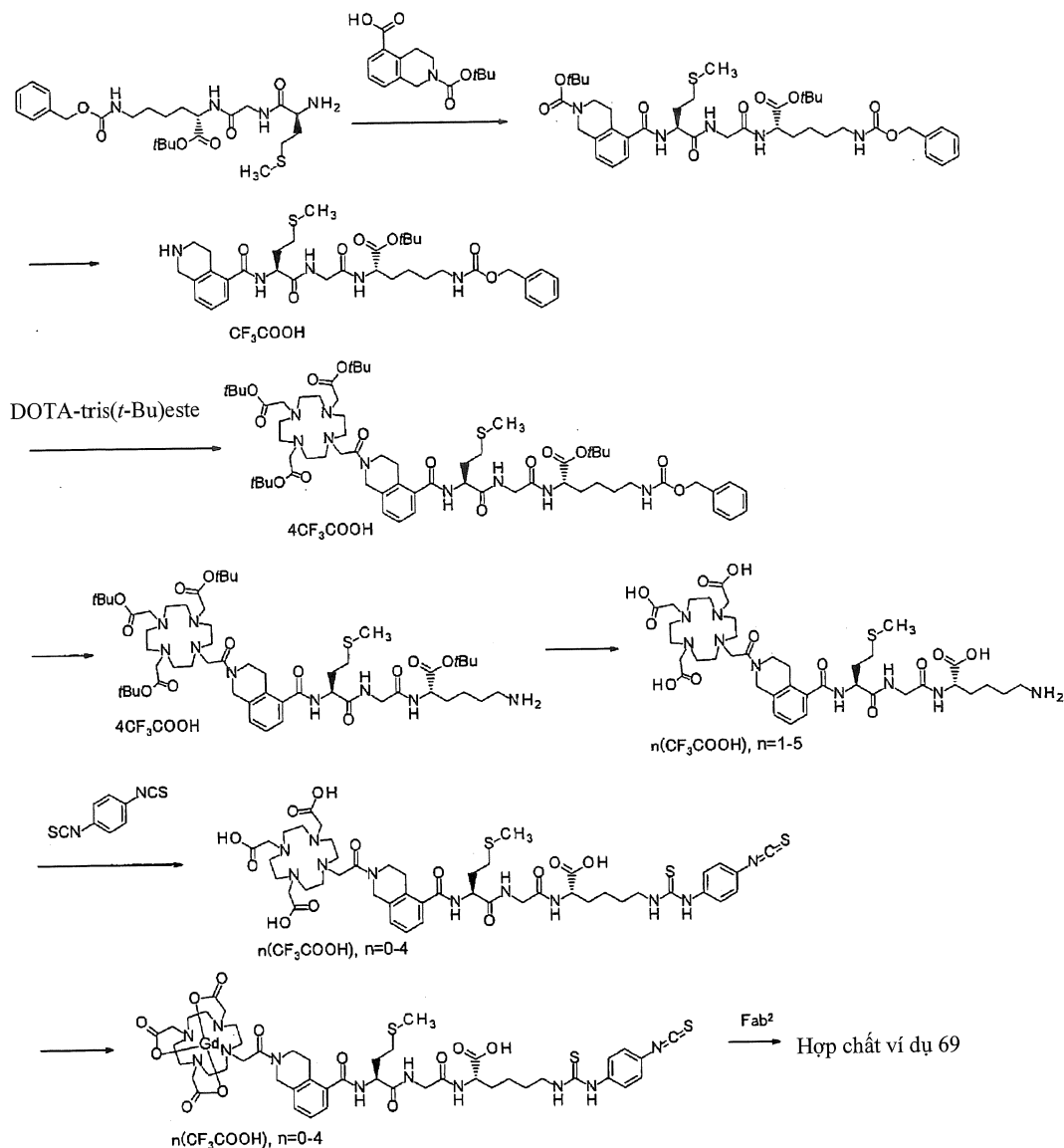
tetrakis(trifloaxetat) (36 mg) và nước (1,8mL) để điều chỉnh độ pH đến 5,4, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradien dung môi; 0 → 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (33,0 mg). MS (ESI-); 1184,3 (xi) Tổng hợp thể tiếp hợp số 68

[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)methyl]phenyl}carbamoithiyl)-L-metionyl-N¹-[2-{[(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithiyl]amino}ethyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-68 (x) được hòa tan trong DMSO (310 μL).

30 μL dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào dung dịch nước muối đệm phosphat Fab² 4,45 mg/mL (320 μL), độ pH được điều chỉnh đến khoảng 9,0 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M, và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)] có khối lượng phân tử 1187 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 2-69 Tổng hợp ([Gd/DOTA-[2,5-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-Ph)-NH-C(=S)]p-Fab²)

[Công thức hóa học 122]



(i) Tổng hợp tert-butyl N-[2-(tert-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carboxyl]-L-metionylglycyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate

TEA (0,24mL) và HATU (241 mg) được bổ sung dung dịch đã trộn gồm tert-butyl L-metionylglycyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinate (303 mg) và axit 2-(tert-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carboxylic (160 mg) trong diclometan (10mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phân cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (gradien dung môi; 0 → 4% metanol/cloroform) để

thu được hợp chất nêu ở đề mục (191 mg). MS (ESI+); 784,4

(ii) Tổng hợp tert-butyl N-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat mono(trifloaxetat)

TFA (1mL) được bổ sung từng giọt vào dung dịch gồm tert-butyl N-[2-(tert-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (190 mg) trong diclometan (3mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ và sau đó được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô là hợp chất nêu ở đề mục (262 mg). MS (ESI): 684,5

(iii) Tổng hợp tert-butyl N-(2-{[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat tetrakis(trifloaxetat)

HATU (184 mg) và DIPEA (124 μ L) được bổ sung vào dung dịch gồm DOTA-tris(t-Bu) este (138 mg) trong DMAc (1mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Dung dịch chứa tert-butyl N-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat mono(trifloaxetat) (261 mg) trong DMAc (1mL) được bổ sung vào dung dịch phản ứng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch nước TFA 1% (khoảng 1mL), và sau đó dung dịch thu được được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradien dung môi; 20 $\rightarrow$ 100% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (231 mg). MS (ESI+); 1260,7 [M+Na]⁺

(iv) Tổng hợp tert-butyl N-(2-{[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-L-lysinat tetrakis(trifloaxetat)

Hỗn hợp gồm tert-butyl N-(2-{[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat tetrakis(trifloaxetat) (230 mg),

10% paladi trên cacbon (50% hàm lượng ẩm với nước, 300 mg), và metanol (10mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ chất không hòa tan, và sau đó phần lọc được cô. 10% paladi trên cacbon (50% hàm lượng ẩm với nước, 300 mg) và metanol (10mL) được bổ sung phần lắng cặn, và sau đó hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện khí hydro (3 atm) ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp được lọc để loại bỏ chất không hòa tan và sau đó được cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (152 mg). MS (ESI+); 1104,5

(v) Tổng hợp N-(2-{[4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-L-lysine pentakis(trifloaxetat)

TFA (1,5mL) được bổ sung vào dung dịch gồm tert-butyl N-(2-{[4,7,10-tris(2-tert-butoxy-2-oxoetyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-L-lysine tetrakis(trifloaxetat) (152 mg) trong diclometan (1mL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi; 0 → 33% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (76 mg). MS (ESI+); 880,4

(vi) Tổng hợp N-(2-{[4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithiyl]-L-lysine tetrakis(trifloaxetat)

TFA (60 µL) được bổ sung vào dung dịch gồm N-(2-{[4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-L-lysine pentakis(trifloaxetat) (76 mg) và 1,4-diisothioxyanatobenzen (50 mg) trong DMAc (1mL) trong điều kiện làm lạnh bằng băng, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Phản ứng dung dịch được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradient dung môi; 0 → 50% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (46 mg). MS (ESI-); 1070,6

(vii) Tổng hợp {N-[2-({4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetyl-κO)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithiyl]-L-lysinato(3-)}gadolini

Gadolini clorua (8 mg) và dung dịch nước natri hydro cacbonat 0,1M (700 μL) được bổ sung vào hỗn hợp gồm N-(2-{[4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetyl}-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl)-L-metionylglyxyl-N⁶-[(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithiyl]-L-lysine tetrakis(trifloaxetat) (16 mg) và nước (800 μL), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo (gradien dung môi; 0 → 40% axetonitril/dung dịch nước TFA 0,1%) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (7,4 mg). MS (ESI-); 1225,3

[0304] (viii) Tổng hợp thể tiếp hợp số 69

{N-[2-({4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetyl-κO)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(4-isothioxyanatophenyl)carbamoithiyl]-L-lysinato(3-)}gadolini (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-69 (vii) được hòa tan trong DMSO (310 μL).

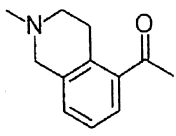
30 μL dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào dung dịch nước muối đệm phosphat chứa 4,45 mg/mL Fab² (320 μL), độ pH được điều chỉnh đến khoảng 9,0 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M, và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-[2,5-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-Ph)-NH-C(=S)] có khối lượng phân tử 1228 được gắn kết với một Fab² có khối lượng phân tử 47,9 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, thể tiếp hợp trong

đó ba phân tử này được gắn kết vào đó, thể tiếp hợp trong đó bốn phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó năm phân tử này được gắn kết vào đó.

Các thể tiếp hợp thu được trong ví dụ tạo ra nêu trên được thể hiện trong các bảng 1 và 2.

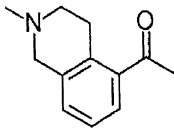
[Bảng 1]

(Y-S₁-X)_p-F a b²

Ví dụ số	Y	S ₁	X
11	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Asp-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
12	Gd/DOTA 4 nhánh	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-	-Gly-Phe-Lys*-Z ₂ (#N)-
13	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
15	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
18	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=O)-	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
24	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
29	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
33	Gd/DOTA		-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
35	Gd/DOTA	-NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
40	Gd/DOTA 4 nhánh	-CH ₂ -(1, 4-Ph)-NH-C(=S)-NH-CH ₂ -(1, 3-Ph)-C(=O)-	-Met-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
47	Gd/DOTA	—	—

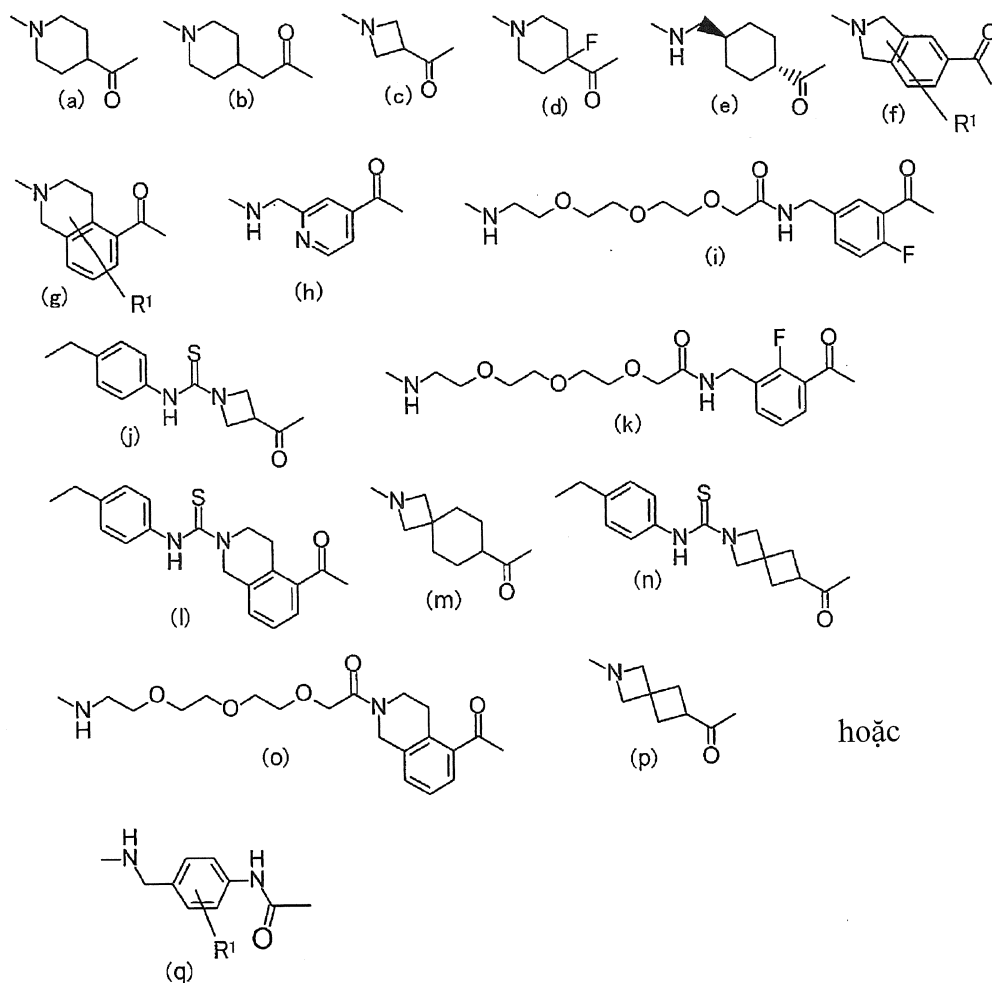
[Bảng 2]

$$(Y-S_1-X)_p-F a b^2$$

Ví dụ số	Y	S ₁	X
48	Gd/DOTA 4 nhánh	$-\text{CH}_2-(1, 4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$	—
60	DFO	$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{O}-(1, 3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Gly-Tyr}^*-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}$ $\text{H}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1(\#S)-$
61	DFO	$-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-(1, 3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$ —	$-\text{Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#S)-$
66	Gd/DOTA	$-\text{NH}-\text{CH}_2-(1, 4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Met-Ile-NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A-4 and/or A-5})-$
67	Gd/DOTA	$-\text{NH}-\text{CH}_2-(1, 4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Met-Ile-NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{Z}_1(\#S)-$
68	Gd/DOTA	$-\text{NH}-\text{CH}_2-(1, 4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Met-Ile-NH}-(\text{CH}_2)_2-(\text{A-3})-$
69	Gd/DOTA		$-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_3-$

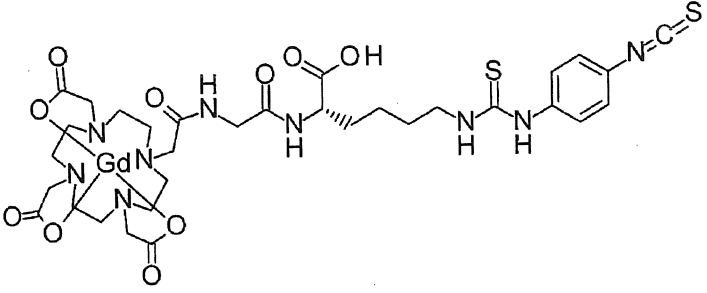
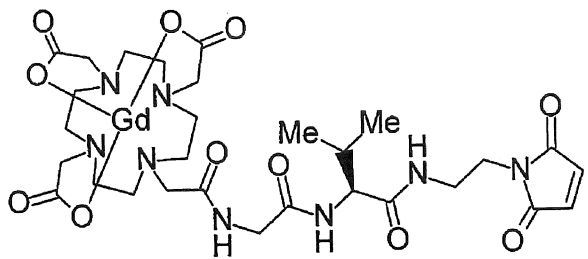
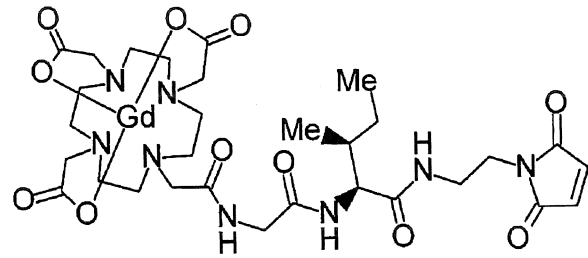
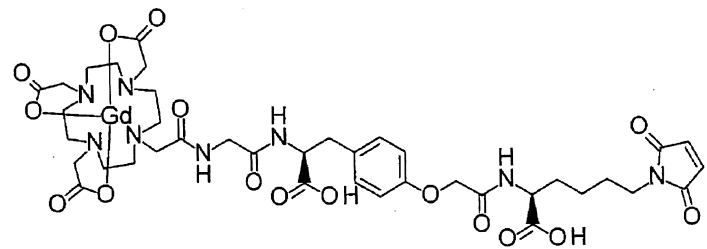
Trong các bảng nêu trên và các bảng 15 đến 18 được đưa ra dưới đây, - là liên kết, và các ký hiệu (a) đến (q) trong cột S₁ biểu thị thành phần đệm lần lượt được thể hiện bởi công thức (a) đến (q) sau.

[Công thức hóa học 123]

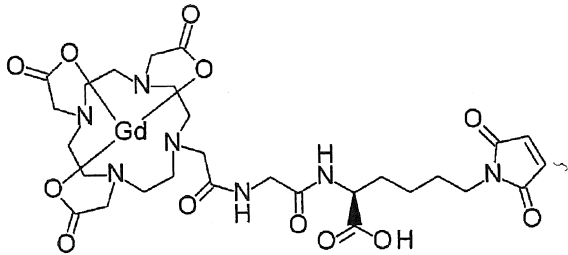
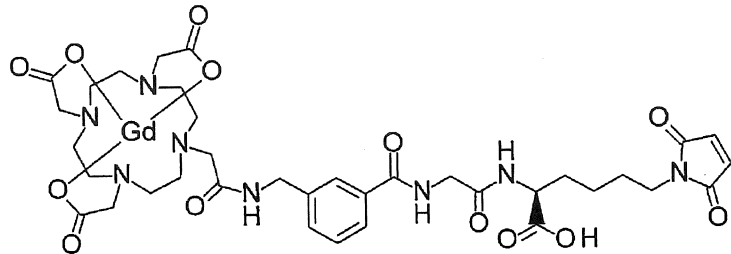
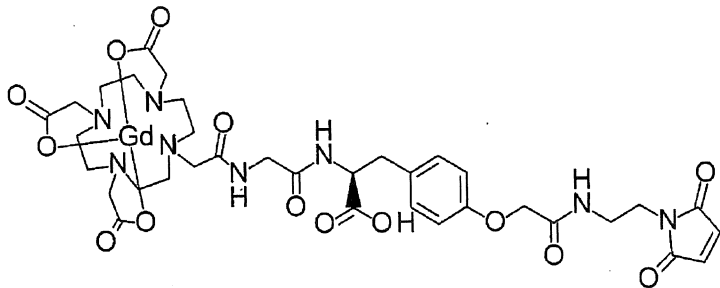
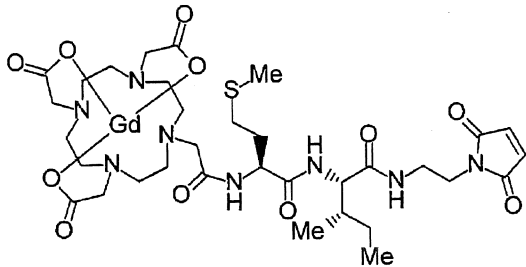


Các hợp chất của Ví dụ tạo ra số A1 đến A43 và B1 đến B4 trong các bảng 3 đến 14 được tổng hợp sử dụng các phương pháp tương tự như trong các ví dụ tạo ra nêu trên hoặc các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và các hợp chất này được sử dụng để thu được các thể tiếp hợp được thể hiện trong các Bảng 15 đến 18 dưới đây.

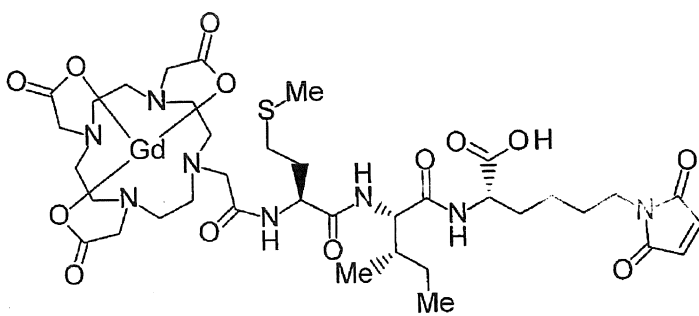
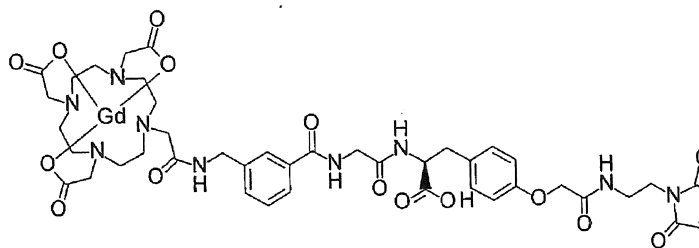
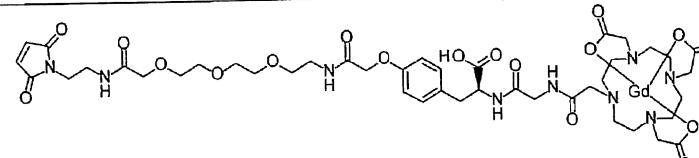
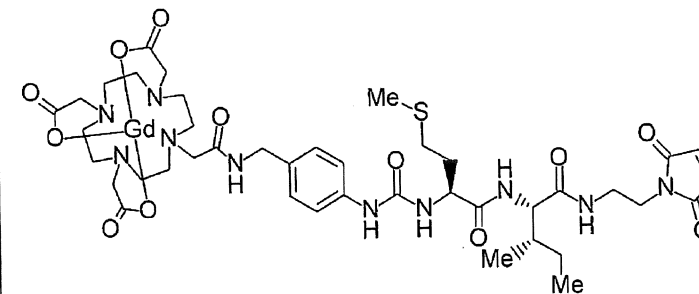
[Bảng 3]

Số	Cấu trúc	MS
A1		ESI+; 937,8
A2		ESI+; 838,4
A3		ESI+; 852,4
A4		ESI+; 1046,1

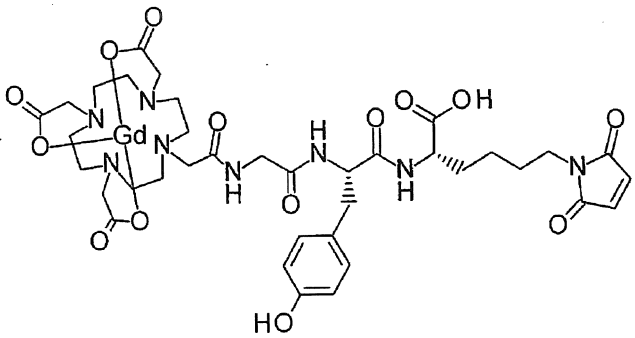
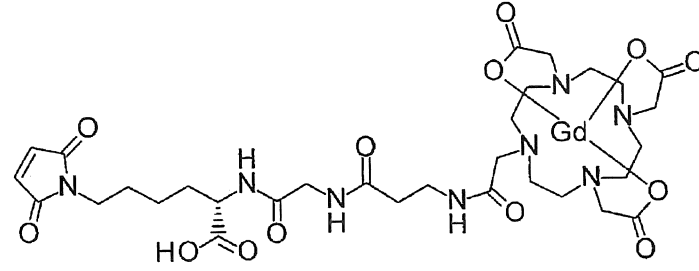
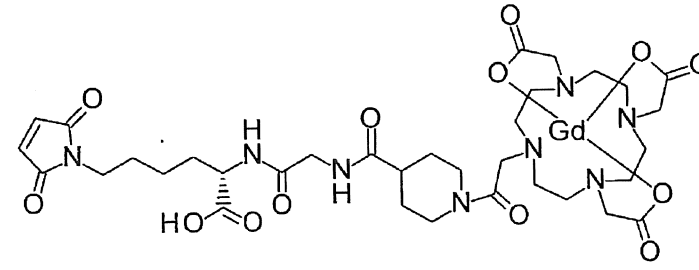
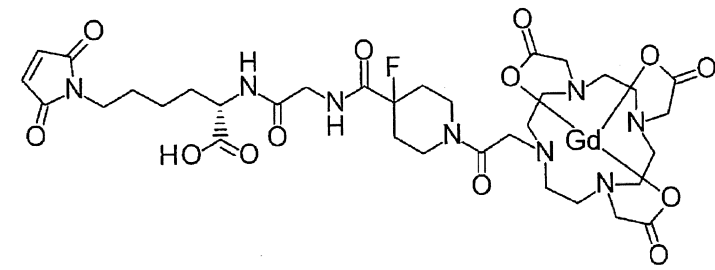
[Bảng 4]

Số	Cấu trúc	MS
A5		ESI+; 825,1
A6		ESI+; 958,4
A7		ESI+; 959,8
A8		ESI+; 926,2

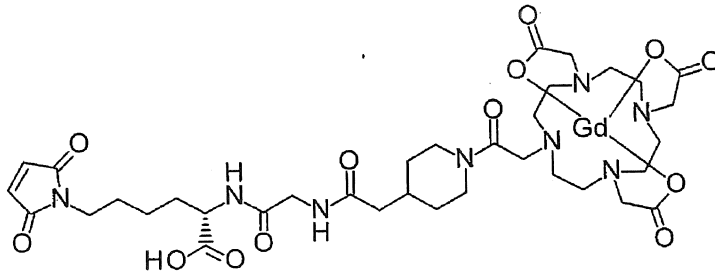
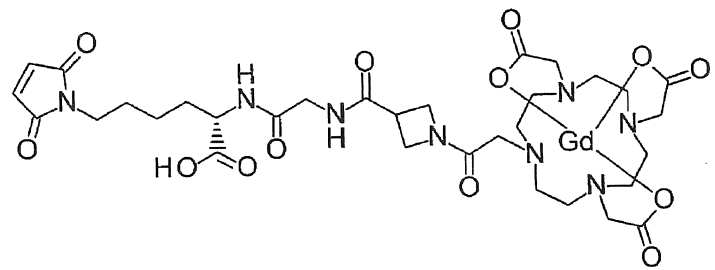
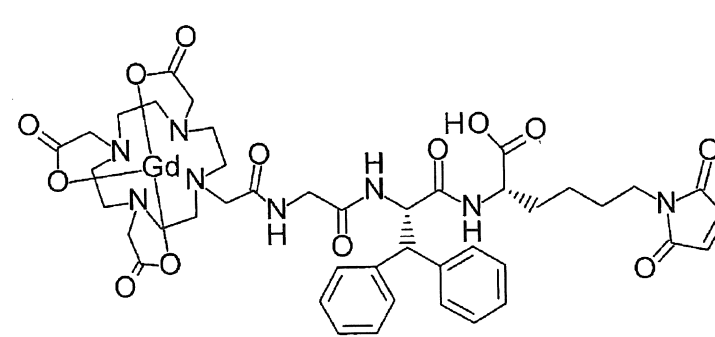
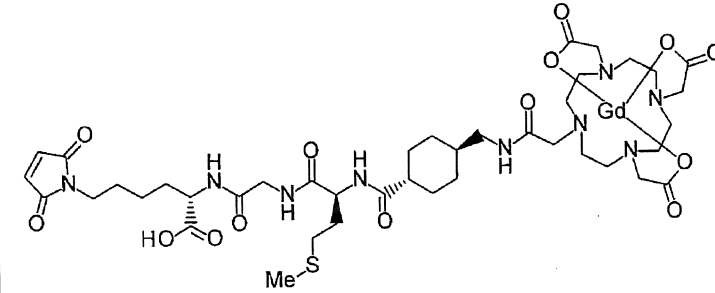
[Bảng 5]

Số	Cấu trúc	MS
A9		ESI-; 1010,2
A10		ESI-; 1090,7
A11		APCI/ESI+; 1149,9
A12		ESI-; 1072,1

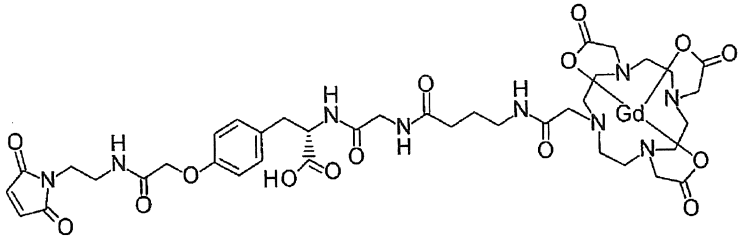
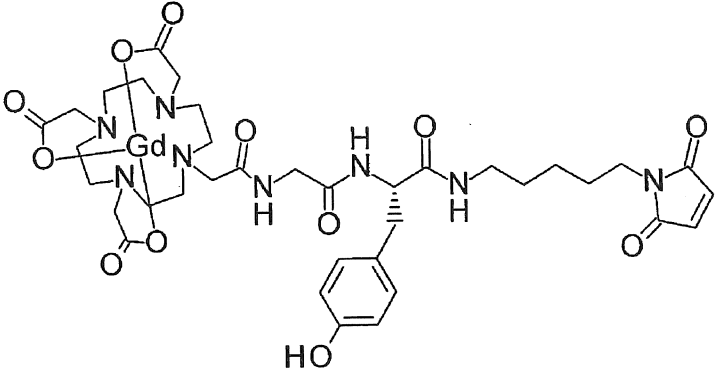
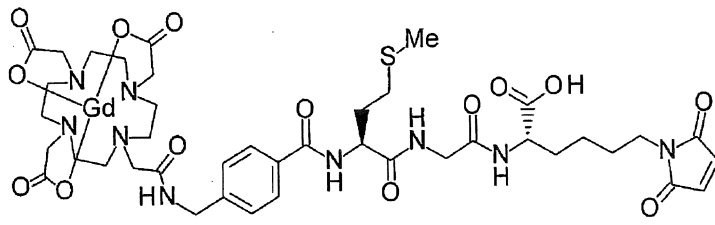
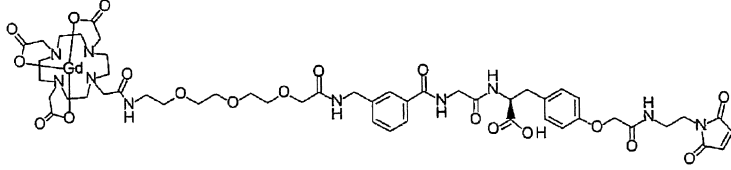
[Bảng 6]

Số	Cấu trúc	MS
A13		ESI+; 988,4
A14		ESI+; 896,1
A15		ESI+; 936,3
A16		ESI+; 954,3

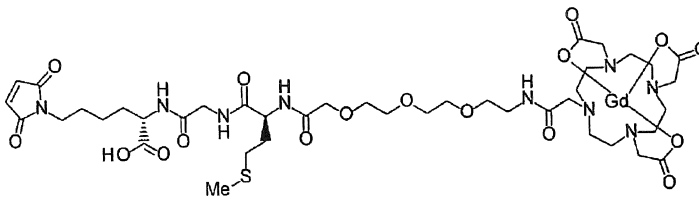
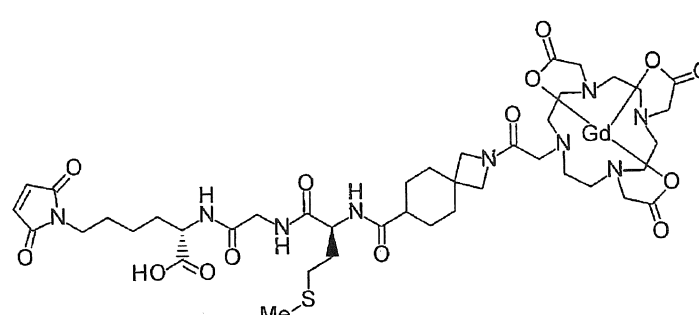
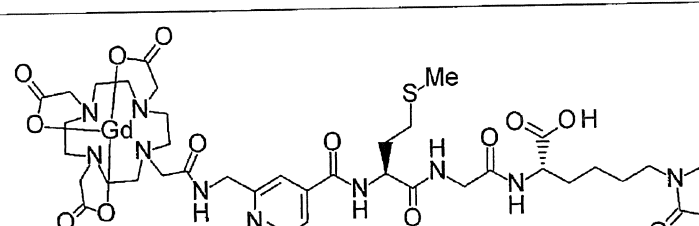
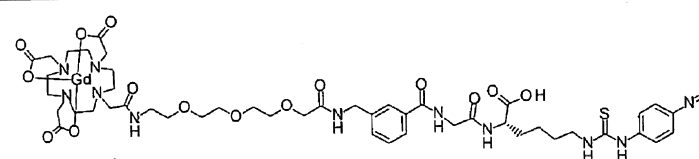
[Bảng 7]

Số	Cấu trúc	MS
A17		ESI+; 950,3
A18		ESI+; 908,2
A19		ESI+; 1048,4
A20		ESI+; 1095,3

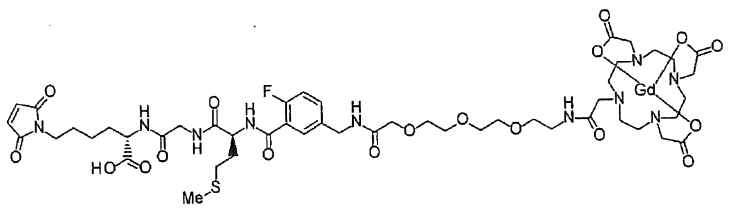
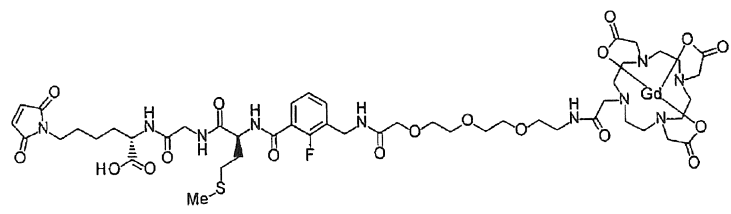
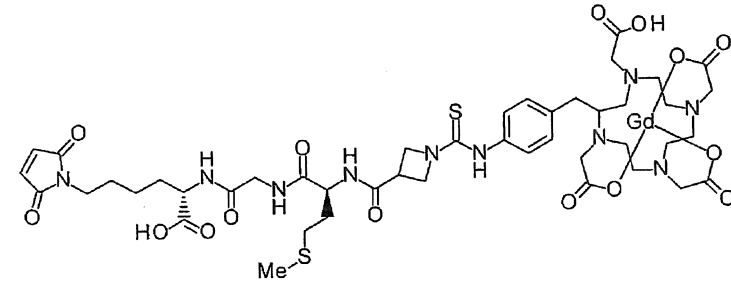
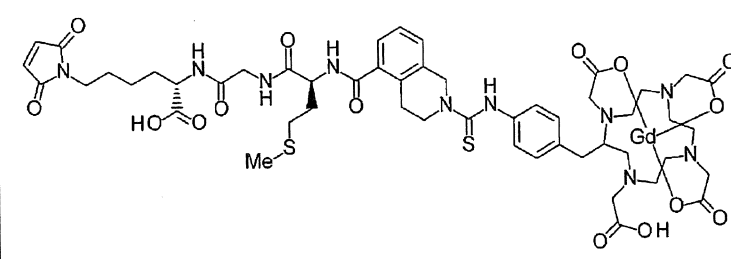
[Bảng 8]

Số	Cấu trúc	MS
A21		APCI/ESI+; 1045,1
A22		ESI+; 944,2
A23		ESI+; 1089,1
A24		ESI-; 1280,4

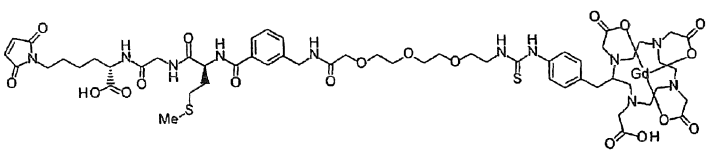
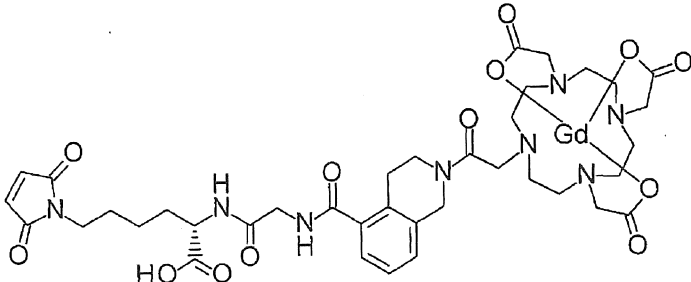
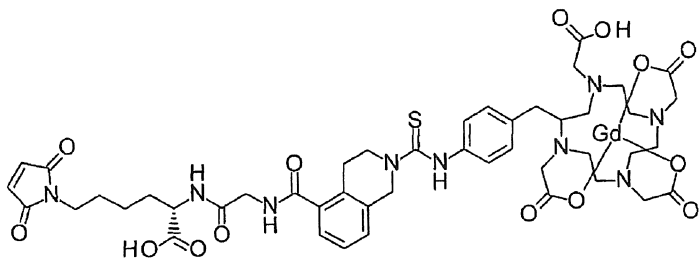
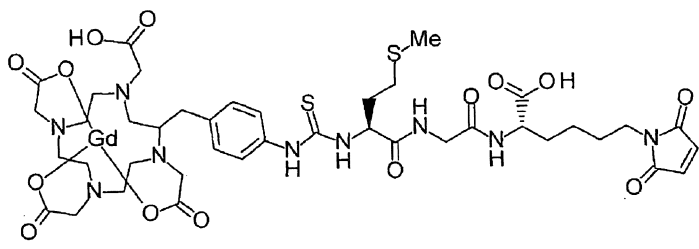
[Bảng 9]

Số	Cấu trúc	MS
A25		ESI-; 1143,5
A26		ESI+; 1107,3
A27		ESI+; 1090,4
A28		ESI+; 1259,5

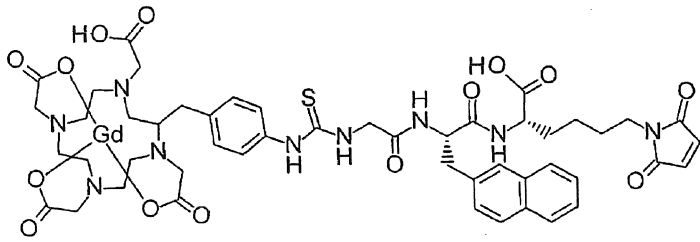
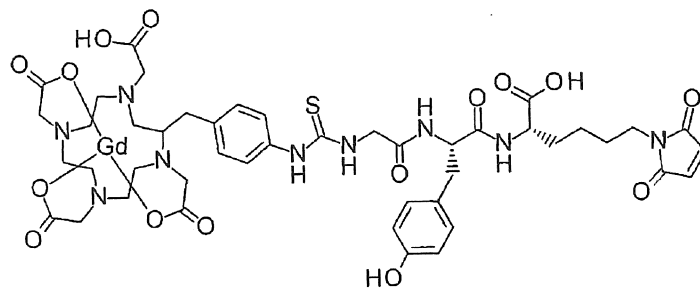
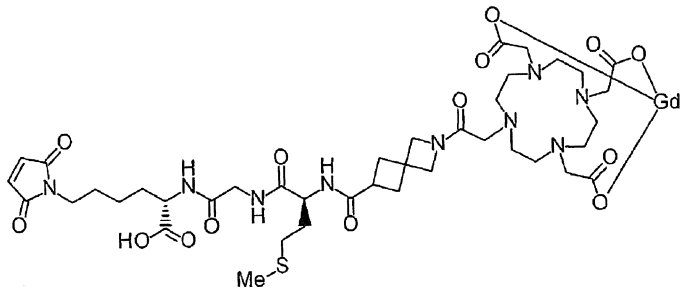
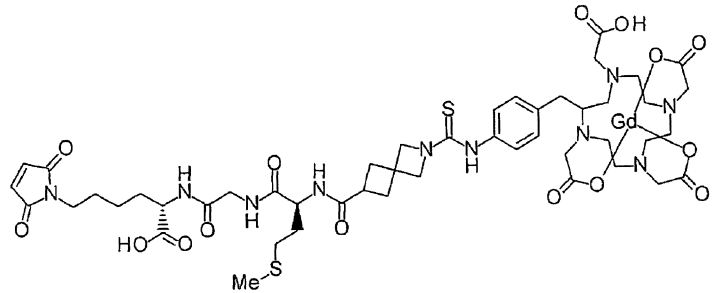
[Bảng 10]

Số	Cấu trúc	MS
A29		ESI+; 1296,5
A30		ESI-; 1294,2
A31		ESI-; 1201,6
A32		ESI-; 1277,7

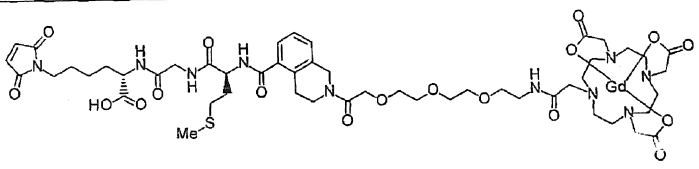
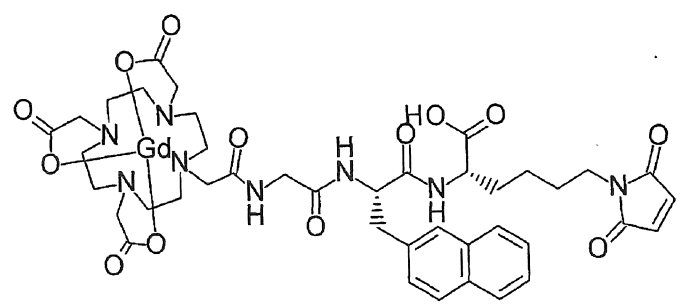
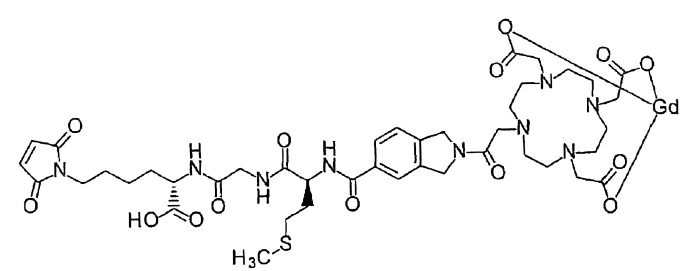
[Bảng 11]

Số	Cấu trúc	MS
A33		APCI/ESI-; 1441,1
A34		ESI+; 984,1
A35		ESI-; 1147,2
A36		ESI+; 1120,9

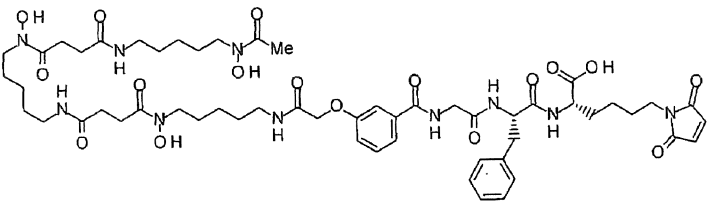
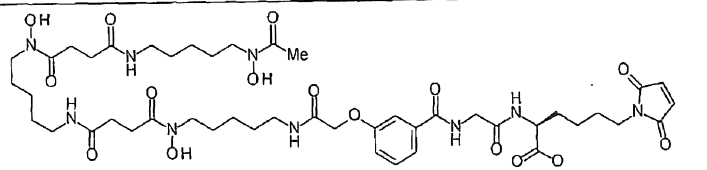
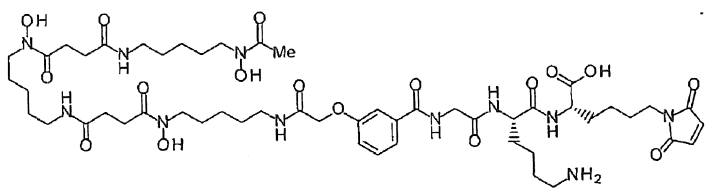
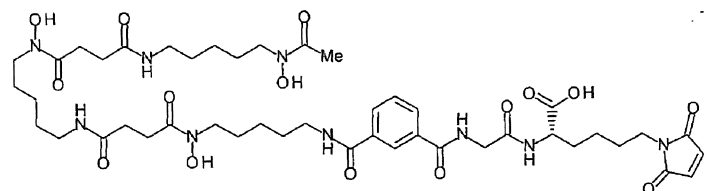
[Bảng 12]

Số	Cấu trúc	MS
A37		ESI+; 1187,9
A38		ESI+; 1153,5
A39		ESI-; 1077,4
A40		ESI-; 1242,4

[Bảng 13]

Số	Cấu trúc	MS
A41		ESI+; 1304,6
A42		ESI+; 1022,3
A43		ESI+; 1101,3

[Bảng 14]

Số	Cấu trúc	MS
B1		ESI-; 1149,6
B2		ESI-; 1002,6
B3		ESI-; 1130,7
B4		ESI-; 972,6

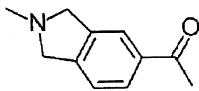
[Bảng 15]

 $(Y-S_1-X)_p - F a b^2$

Ví dụ số	Y	S_1	X
1	Gd/DOTA	—	-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-Ph)-NH-C(=S)- —
2	Gd/DOTA	—	-Gly-Val-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
3	Gd/DOTA	—	-Gly-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
4	Gd/DOTA	—	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-Lys*-Z ₂ (#N)-
5	Gd/DOTA	—	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
6	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1,3-Ph)- C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#S)-
7	Gd/DOTA	—	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#S)-
8	Gd/DOTA	—	-Met-Ile-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#S)-
9	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1,3-Ph)- C(=O)-	-Gly-Lys*-Z ₂ (#N)-
10	Gd/DOTA	—	-Met-Ile-Lys*-Z ₂ (#N)-
14	Gd/DOTA	-NH-CH ₂ -(1,3-Ph)- C(=O)-	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-
17	Gd/DOTA	—	-Gly-Tyr*-CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂ O) ₃ -CH ₂ -C(=O)-NH-(CH ₂) ₂ -Z ₁ (#N)-

[Bảng 16]

 $(Y-S_1-X)_p - Fab^2$

Ví dụ số	Y	S_1	X
18	Gd/DOTA	$-NH-CH_2-(1,4-Ph)-$ $NH-C(=O)-$	$-Met-Ile-NH-(CH_2)_2-Z_1(\#N)-$
19	Gd/DOTA	—	$-Gly-Tyr-Lys^*-Z_2(\#N)-$
20	Gd/DOTA	—	$-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$
21	Gd/DOTA	—	$-Gly-Tyr^*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-Z_1(\#N)-$
22	Gd/DOTA	$-NH-(CH_2)_2-C(=O)-$	$-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$
23	Gd/DOTA	(a)	$-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$
25	Gd/DOTA	$-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-$ $C(=O)-NH-CH_2-(1,3$ $-Ph)-C(=O)-$	$-Gly-Lys^*-Z_2(\#S)-$
26	Gd/DOTA	(d)	$-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$
27	Gd/DOTA	(b)	$-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$
28	Gd/DOTA	(c)	$-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$
30	Gd/DOTA	—	$-Gly-(diph-Ala)-Lys^*-Z_2(\#S)-$
31	Gd/DOTA	—	$-Gly-(naph-Ala)-Lys^*-Z_2(\#S)-$
32	Gd/DOTA	(e)	$-Met-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$
34	Gd/DOTA		$-Met-Gly-Lys^*-Z_2(\#N)-$

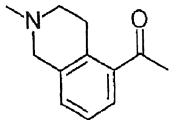
[Bảng 17]

 $(Y-S_1-X)_p - F a b^2$

Ví dụ số	Y	S_1	X
36	Gd/DOTA	$-NH-(CH_2)_3-C(=O)-$	$-Gly-Tyr*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-$ $Z_1(\#N)-$
37	Gd/DOTA	—	$-Gly-Tyr-NH-(CH_2)_5-Z_1(\#S)-$
38	Gd/DOTA	$-NH-CH_2-(1,4-Ph)-C(=O)-$	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#S)-$
39	Gd/DOTA	$-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-NH-$ $CH_2-(1,3-Ph)-C(=O)-$	$-Gly-Tyr*-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_2-$ $Z_1(\#S)-$
41	Gd/DOTA	$-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-$	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#N)-$
42	Gd/DOTA	(m)	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#N)-$
43	Gd/DOTA	(h)	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#N)-$
44	Gd/DOTA	$-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-NH-$ $CH_2-(1,3-Ph)-C(=O)-$	$-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-Ph)-N$ $H-C(=S)-$
45	Gd/DOTA	(i)	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#N)-$
46	Gd/DOTA	(k)	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#N)-$
49	Gd/DOTA 4 nhánh	(j)	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#N)-$
50	Gd/DOTA 4 nhánh	(l)	$-Met-Gly-Lys*-Z_2(\#N)-$

[Bảng 18]

 $(Y-S_1-X)_p - F a b^2$

Ví dụ số	Y	S_1	X
51	Gd/DOTA 4 nhánh	$-\text{CH}_2-(1,4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ $(1,3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
52	Gd/DOTA		$-\text{Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
53	Gd/DOTA 4	(1)	$-\text{Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
54	Gd/DOTA 4	$-\text{CH}_2-(1,4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
55	Gd/DOTA 4	$-\text{CH}_2-(1,4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$	$-\text{Gly}-(\text{naph-Ala})-\text{Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
56	Gd/DOTA 4	$-\text{CH}_2-(1,4\text{-Ph})-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$	$-\text{Gly-Tyr-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
57	Gd/DOTA	(p)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
58	Gd/DOTA 4	(n)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
59	Gd/DOTA	(o)	$-\text{Met-Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#N)-$
62	DFO	$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{O}-(1,3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$ -	$-\text{Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#S)-$
63	DFO	$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{O}-(1,3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$ -	$-\text{Gly-Phe-Lys}^*-\text{Z}_2(\#S)-$
64	DFO	$-\text{C}(=\text{O})-(1,3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Gly-Lys}^*-\text{Z}_2(\#S)-$
65	DFO	$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{O}-(1,3\text{-Ph})-\text{C}(=\text{O})-$	$-\text{Gly-Lys-Lys}^*-\text{Z}_2(\#S)-$

Các phân tích MS của các hợp chất ví dụ được thể hiện trong Bảng 15 đến 18 được thể hiện trong Bảng 19 đến 23 dưới đây.

[Bảng 23]

Ví dụ số	MS
5 9	Đã xác nhận bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1304 được gắn kết với một Fab ² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.
6 2	Đã xác nhận bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1106 được gắn kết với một Fab ² có khối lượng phân tử 47,9 kDa.
6 3	Đã xác nhận bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1253 được gắn kết với một Fab ² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.
6 4	Đã xác nhận bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1076 được gắn kết với một Fab ² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.
6 5	Đã xác nhận bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 124 được gắn kết với một Fab ² có khối lượng phân tử 47,9 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 3-1: Đánh giá khả năng gắn kết hoạt tính của thể tiếp hợp mảnh Fab của kháng thể CEACAM5

Mỗi thể tiếp hợp mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được điều chế trong Ví dụ 2 được thử nghiệm ELISA để đánh giá hoạt tính gắn kết của nó với CEACAM5. Trong thử nghiệm này, dung dịch đệm phosphat (Nacalai Tesque Inc., 0,1 mol/L-dung dịch đệm phosphat (độ pH = 7,2)) được điều chế đến 10 mM bằng cách pha loãng 10 lần với nước cất được sử dụng làm dung môi cho chất lỏng bất động kháng nguyên, và dung dịch đệm 20X PBS/Tween 20 (Thermo Fisher Scientific Inc., 28352) được pha loãng 20 lần bằng nước cất được sử dụng làm chất lỏng rửa. Ngoài ra, đối với albumin huyết thanh bò (BSA) được sử dụng trong thử nghiệm này, 30% dung dịch albumin huyết thanh bò (Sigma-Aldrich, Inc., A9576-50ML) được bổ sung với tỷ lệ thích hợp để dùng. CEACAM5 (R&D Systems, 4128-CM-050) được pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat 10mM (độ pH = 7,2) đến 0,1 µg/mL, và được bổ sung vào đĩa trắng 384 Nunc MaxiSorp (Nunc, 4603272) ở 30 µL/lỗ, và đĩa được ủ qua đêm ở 4°C để bất động. Chất lỏng bất động CEACAM5 được lấy ra bằng cách ly tâm ngược, và sau đó quá trình phong bế được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA. Sau đó, dung dịch phong bế được lấy ra bằng cách ly tâm ngược,

dung dịch chứa mỗi thể tiếp hợp của mảnh Fab² của kháng thể CEACAM5 được mô tả nêu trên hoặc mảnh Fab² có không có phần đánh dấu (PB009-01) làm đối chứng ở khoảng 10000 ng/mL được pha loãng ở 14 bước bằng cách pha loãng 3 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 1,0% BSA, và 30 μ L được bổ sung/lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Đã được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và kháng thể IgG (chuỗi H + L) kháng người của dê được đánh dấu peroxidaza củ cải đường (HRP) (MBL Life Sciences, 206) được pha loãng 1000 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA được bổ sung ở 30 μ L /lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Đã được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và chất phản ứng phát hiện của thử nghiệm thấm Western với chất môi ECL (GE Healthcare, RPN2232) làm cơ chất được bổ sung ở 30 μ L /lỗ. Cơ chất được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó giá trị đơn của chúng được đo sử dụng máy đếm Envision (PerkinElmer, Inc.).

Thử nghiệm đối với mỗi kháng thể được thực hiện hai lần lặp lại, và giá trị EC₅₀ được tính toán sử dụng mô hình đường cong logistic 4 thông số. Giá trị trung bình hình học (Giá trị trung bình hình học), độ lệch chuẩn (Yếu tố SD hình học), và giới hạn dưới (thấp hơn) và giới hạn trên (cao hơn) của khoảng tin cậy 95% (95% CI của giá trị trung bình hình học) của các giá trị EC₅₀ (nM) đối với 9 lần hoạt động đối với PB009-01 được thể hiện trong Bảng 24. Ngoài ra, giá trị EC₅₀ của mỗi thể tiếp hợp hoạt động ở hai lần lặp lại được thể hiện trong Bảng 25. Ví dụ số trong bảng thể hiện số lượng thể tiếp hợp trong Ví dụ 2.

[Bảng 24]

	PB009-01
Giá trị trung bình hình học (nM)	0,20
Yếu tố SD hình học	1,45
Giới hạn dưới 95% CI của giá trị trung bình hình học (nM)	0,15
Giới hạn trên 95% CI của giá trị trung bình hình học (nM)	0,27

[Bảng 25]

Ví dụ số	EC ₅₀ (nM)	Ví dụ số	EC ₅₀ (nM)	Ví dụ số	EC ₅₀ (nM)
1	0,16	20	0,22	39	0,20
2	0,14	21	0,27	40	0,22
3	0,13	22	0,32	41	0,21
4	0,15	23	0,33	42	0,21
5	0,14	24	0,25	43	0,23
6	0,14	25	0,32	44	0,29
7	0,17	26	0,30	45	0,23
8	0,11	27	0,46	46	0,22
9	0,10	28	0,36	47	0,25
10	0,11	29	0,30	48	0,21
11	0,14	30	0,31	54	0,23
12	0,11	31	0,30	55	0,26
13	0,14	32	0,37	56	0,26
14	0,13	33	0,33	57	0,29
15	0,13	34	0,38	58	0,28
17	0,23	35	0,43	59	0,30
18	0,24	36	0,38	60	0,18
19	0,26	37	0,23	61	0,18
		38	0,18	64	0,20

Ví dụ 3-2:

Mỗi thể tiếp hợp mảnh Fab của kháng thể CEACAM5 kháng người được điều chế trong Ví dụ 2 được thử nghiệm ELISA để đánh giá hoạt tính gắn kết của chúng với CEACAM5. Trong thử nghiệm này, dung dịch đệm phosphat (Nacalai Tesque Inc., 0,1 mol/L dung dịch đệm phosphat (độ pH = 7,2)) được điều chế đến 10 mM bằng cách pha loãng 10 lần với nước cất được sử dụng làm dung môi cho chất lỏng bất động kháng nguyên, và 20X dung dịch đệm PBS/Tween 20 (Thermo Fisher Scientific Inc., 28352) được pha loãng 20 lần bằng nước cất được sử dụng làm chất lỏng rửa. Ngoài ra, đối với albumin huyết thanh bò (BSA) được sử dụng trong thử nghiệm này, 30% dung dịch albumin huyết thanh bò (Sigma-Aldrich, Inc., A9576-50ML) được bổ sung với tỷ lệ thích hợp để dùng. CEACAM5 (R&D Systems, 4128-CM-050) được pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat 10mM (độ pH = 7,2) đến 0,1 µg/mL, và được bổ sung vào đĩa trắng 384 Nunc MaxiSorp (Nunc, 4603272) ở 30 µL /lỗ, và đĩa được ủ qua đêm ở 4°C

để bất động. Chất lỏng bất động CEACAM5 được lấy ra bằng cách ly tâm ngược, và sau đó quá trình phong bế được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA. Sau đó, dung dịch phong bế được lấy ra bằng cách ly tâm ngược, dung dịch chứa mỗi thể tiếp hợp mảnh Fab² của kháng thể CEACAM5 được mô tả nêu trên hoặc mảnh Fab² không có phần đánh dấu (PB009-01) làm đối chứng ở khoảng 10000 ng/mL được pha loãng ở 14 bước bằng cách pha loãng 3 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 1,0% BSA, và 30 μ L được bổ sung /lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Đĩa được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và kháng thể IgG (chuỗi H + L) kháng người của dê được đánh dấu peroxidaza củ cải đường (HRP) (MBL Life Sciences, 206) được pha loãng 1000 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA được bổ sung ở 30 μ L /lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Đĩa được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và chất phản ứng phát hiện của thử nghiệm thấm Western với chất môi ECL (GE Healthcare, RPN2232) làm cơ chất được bổ sung ở 30 μ L /lỗ. Cơ chất được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó giá trị đơn của chúng được đo sử dụng máy đếm Envision (PerkinElmer, Inc.).

Thử nghiệm đối với mỗi kháng thể được thực hiện hai lần lặp lại, và giá trị EC₅₀ được tính toán sử dụng mô hình đường cong logistic 4 thông số. Giá trị EC₅₀ (nM) đối với mỗi lần hoạt động trong số 2 lần hoạt động đối với PB009-01 được thể hiện trong Bảng 26. Ngoài ra, giá trị EC₅₀ của mỗi thể tiếp hợp hoạt động hai lần lặp lại được thể hiện trong Bảng 27. Số ví dụ trong bảng thể hiện số lượng thể tiếp hợp trong Ví dụ 2.

[Bảng 26]

P B 0 0 9 – 0 1 (n M)
0,14
0,21

[Bảng 27]

Ví dụ số	EC50 (nM)
66	0,16
68	0,31

Ví dụ 4-1: Thử nghiệm đánh giá sự tích lũy trong thận của các thể tiếp hợp được đánh dấu Gd (chuột nhắt khỏe mạnh)

Thể tiếp hợp bao gồm thể tiếp hợp có phân tử liên kết peptit có trình tự axit amin được tách bởi enzym màng rìa bàn chải ở thận hoặc enzym tiêu thể làm phân tử liên kết peptit của "X". Thể tiếp hợp theo sáng chế có phân tử liên kết như vậy được tách đặc hiệu ở phần của phân tử liên kết bởi enzym bất kỳ trong số các enzym này có mặt ở thận, và do đó được dự định rằng mức độ tích lũy của phần đánh dấu ở thận được giảm xuống. Các kết quả đánh giá về mức độ tích tụ ở thận của thể tiếp hợp này theo sáng chế được chỉ ra dưới đây.

Phương pháp thử nghiệm

Thể tiếp hợp được đánh dấu Gd của thể tiếp hợp chứa phân tử liên kết peptit tạo ra trong một trong số các ví dụ nêu trên được dùng theo đường tĩnh mạch đuôi của chuột nhắt (BALB/c hoặc BALB/c nu/nu) sao cho khối lượng protein là 0,02 mg (100 μ L)/con. Sau khoảng 24 giờ, chuột nhắt được đem giết và thận được lấy ra, và lượng Gd ở thận được đo sử dụng ICP-MS. Thử nghiệm này được thực hiện ở 3 trường hợp ở mỗi nhóm, giá trị trung bình của 3 trường hợp được tính toán, và lượng Gd chứa/thận sau khi dùng là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm (% liều/mô) của tổng lượng Gd được dùng. Kết quả được thể hiện trong bảng 28 dưới đây. Số ví dụ trong

bảng thể hiện số lượng thể tiếp hợp trong Ví dụ 2. Ngoài ra, thử nghiệm tương tự được thực hiện sử dụng Ví dụ số 47 ([Gd/DOTA]p-Fab) tạo ra trong Ví dụ tạo ra 2-47, mà không chứa phần tử liên kết peptit, làm thể tiếp hợp đối chứng, và giá trị trung bình hình học (Giá trị trung bình hình học), độ lệch chuẩn (Yếu tố SD hình học), và giá trị giới hạn dưới (thấp) và giá trị giới hạn trên (cao) của khoảng tin cậy 95% (95% CI của giá trị trung bình hình học) trong 5 hoạt động được tính toán.

(Kết quả)

Kết quả được thể hiện trong bảng 29 dưới đây. Trên cơ sở tỷ lệ phần trăm của thể tiếp hợp đối chứng (% liều/mô), tỷ lệ giảm lượng Gd chứa ở thận của mỗi thể tiếp hợp trong số các thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptit được xác định và được thể hiện trong Bảng 28. Như được thể hiện trong Bảng 28, sự tích lũy của phần đánh dấu ở thận là 39,6 đến 82,9% điểm trong thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptit thấp hơn trong thể tiếp hợp đối chứng.

[Bảng 28]

Ví dụ số	% liều/mô	Tỷ lệ giảm (%)
11	14,8	52,2
12	9,9	68,0
13	15,4	50,3
15	17,1	44,8
24	12,9	58,3
25	14,2	54,1
29	6,8	78,0
31	18,7	39,6
33	5,3	82,9
34	11,9	61,6
35	7	77,4
40	8,4	72,9

[Bảng 29]

	Ví dụ số 47
Giá trị trung bình hình học (% liều/mô)	31,0
Yếu tố SD hình học	1,2
95% CI dưới giá trị trung bình hình học (% liều/mô)	25,3
95% CI trên giá trị trung bình hình học (% liều/mô)	37,9

Ví dụ 4-2: Thử nghiệm đánh giá sự tích lũy trong thận của các thể tiếp hợp được đánh dấu Gd (chuột nhất khỏe mạnh)

Phương pháp thử nghiệm

Thể tiếp hợp được đánh dấu Gd của thể tiếp hợp chứa phần tử liên kết peptit tạo ra trong một trong số các ví dụ nêu trên được dùng theo đường tĩnh mạch đuôi của chuột nhất (BALB/c hoặc BALB/c nu/nu) sao cho khối lượng protein là 0,02 mg (100 μ L)/con. Sau khoảng 24 giờ, chuột nhất được đem giết và thận được lấy ra, và lượng Gd ở thận được đo sử dụng ICP-MS. Thử nghiệm này được thực hiện ở 3 trường hợp ở mỗi nhóm, giá trị trung bình của 3 trường hợp được tính toán, và lượng Gd chứa/thận sau khi dùng là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm (% liều/mô) của tổng lượng Gd được dùng. Kết quả được thể hiện trong bảng 30 dưới đây. Số ví dụ trong bảng thể hiện số lượng thể tiếp hợp trong Ví dụ 2. Ngoài ra, thử nghiệm tương tự được thực hiện sử dụng Ví dụ số 47 ([Gd/DOTA]p-Fab) tạo ra trong Ví dụ tạo ra 2, mà không chứa phần tử liên kết peptit, làm thể tiếp hợp đối chứng.

(Kết quả)

Kết quả được thể hiện trong bảng 30 dưới đây. Trên cơ sở tỷ lệ phần trăm của thể tiếp hợp đối chứng (% liều/mô), tỷ lệ giảm lượng Gd chứa ở thận của mỗi thể tiếp hợp trong số các thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptit được xác định và được thể hiện trong Bảng 30. Như được thể hiện trong Bảng 30, mức độ tích lũy của phần đánh dấu ở thận là 92,15 từ 95,38% điểm trong thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptit nhỏ hơn trong thể tiếp hợp đối chứng 47.

[Bảng 30]

Lượng dư trong thận (chuột nhất khỏe mạnh)

Ví dụ số	% liều/mô	Tỷ lệ giảm (%)
6 6	2,43	92,15
6 8	1,43	95,38
4 7	31,33	—

Ví dụ 4-3: Thử nghiệm đánh giá sự tích lũy trong thận của các thể tiếp hợp được đánh dấu Gd (chuột nhất khỏe mạnh)

Phương pháp thử nghiệm

Thể tiếp hợp được đánh dấu Gd của thể tiếp hợp chứa phần tử liên kết peptit tạo ra trong một trong số các ví dụ nêu trên được dùng theo đường tĩnh mạch đuôi của chuột nhất (BALB/c hoặc BALB/c nu/nu) sao cho khối lượng protein là 0,02 mg (100 μ L)/con. Sau khoảng 24 giờ, chuột nhất được đem giết và thận được lấy ra, và lượng Gd ở thận được đo sử dụng ICP-MS. Thử nghiệm này được thực hiện ở 3 trường hợp ở mỗi nhóm, giá trị trung bình của 3 trường hợp được tính toán, và lượng Gd chứa/thận sau khi dùng là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm (% liều/mô) của tổng lượng Gd được dùng. Thử nghiệm tương tự được thực hiện sử dụng Ví dụ số 47 tạo ra trong Ví dụ tạo ra 2 nêu trên, mà không chứa phần tử liên kết peptit, làm thể tiếp hợp đối chứng, và giá trị trung bình của lượng còn lại ở thận trong 5 lần hoạt động đối với Ví dụ số 47 được thể hiện trong Bảng 31.

(Kết quả)

Dựa vào tỷ lệ phần trăm của thể tiếp hợp đối chứng (% liều/mô), tỷ lệ (%) của mức giảm lượng Gd chứa ở thận của mỗi thể tiếp hợp trong số các thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptit được xác định và được thể hiện trong Bảng 32. Như được thể hiện trong Bảng 32, mức độ tích lũy của phần đánh dấu ở thận là 21,00 đến 94,66% điểm trong thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptiti nhỏ hơn so với trong thể tiếp hợp đối chứng.

[Bảng 31]

Lượng dư trong thận (chuột khỏe mạnh)

	Lượng dư trong thận % liều/mô
Giá trị trung bình	29,33

[Bảng 32]

Lượng dư trong thận (chuột khỏe mạnh)

Ví dụ số	% liều/mô	Tỷ lệ giảm (%)
8	23,17	21,00
1 0	20,10	31,46
1 8	2,6	91,13
3 2	10,10	65,56
3 8	13,33	54,54
4 1	21,67	26,12
4 3	8,97	69,42
4 5	12,00	59,08
4 6	11,33	61,35
6 7	1,57	94,66
6 9	7,13	75,68

Ví dụ 4-4: Thử nghiệm đánh giá sự tích lũy trong thận của các thể tiếp hợp được đánh dấu Gd (chuột nhất mang khối u)

Phương pháp thử nghiệm

Thể tiếp hợp được đánh dấu Gd của thể tiếp hợp chứa phần tử liên kết peptit tạo ra trong một trong số các ví dụ nêu trên được dùng theo đường tĩnh mạch đuôi của chuột nhất mang khối u sao cho khối lượng protein là 0,02 mg (100 μ L)/con. Vì chuột nhất mang khối u được sử dụng trong Ví dụ theo sáng chế, chuột nhất (BALB/c nu/nu) ở trạng thái mang khối u được mang bằng cách cấy ghép các tế bào LS174T của dòng tế bào ung thư trực tràng người (ATCC(nhãn hiệu được đăng ký); CL-188) ở $2,0$ đến $5,0 \times 10^6$ tế bào/chuột nhất dưới da lưng trước khi dùng mẫu được sử dụng. 24 giờ sau khi dùng mẫu, chuột nhất được đem giết, thận và khối u được loại ra, và lượng Gd ở

thận và trong khối u được đo sử dụng ICP-MS. Thử nghiệm này được thực hiện ở 3 trường hợp ở mỗi nhóm, và giá trị trung bình của 3 trường hợp được tính toán. Lượng Gd chứa/thận sau khi dùng là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm của lượng Gd được dùng (% liều/mô), và lượng Gd chứa trong mỗi g khối u mô là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm của tổng lượng Gd được dùng (% liều/g). Kết quả được thể hiện trong các bảng 35 và 36. Ví dụ số trong bảng thể hiện số lượng thể tiếp hợp trong Ví dụ 2. Ngoài ra, thử nghiệm tương tự được thực hiện sử dụng Ví dụ số 47 tạo ra trong Ví dụ tạo ra 2-47, mà không chứa phần tử liên kết peptit, làm thể tiếp hợp đối chứng. Các giá trị trung bình là trong 2 lần hoạt động đối với Ví dụ số 47 được thể hiện trong Bảng 33 và 34.

(Kết quả)

Như được thể hiện trong Bảng 35 và 36, mức độ tích lũy của phần đánh dấu ở thận là từ 52,26 đến 77,68% điểm trong thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptiti nhỏ hơn so với trong thể tiếp hợp đối chứng.

[Bảng 33]

Lượng dư trong thận (chuột mang khối u)

	Lượng dư trong thận % liều/mô
Giá trị trung bình	25,83

[Bảng 34]

Tích lũy khối u

	Lượng tích lũy khối u trong thận % liều/mô
Giá trị trung bình	4,92

[Bảng 35]

Lượng dư trong thận (chuột mang khối u)

Ví dụ số	% liều/mô	Tỷ lệ giảm (%)
1 8	5,77	77,68
2 4	12,33	52,26
2 9	8,4	67,48
3 3	7,3	71,74
3 5	9,4	63,61

[Bảng 36]

Lượng khối u tích lũy (chuột mang khối u)

Ví dụ số	% liều/g
1 8	10,63
2 4	10,50
2 9	4,37
3 3	4,53
3 5	6,90

(Ví dụ 5-1: Điều chế thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ kháng thể kháng MUC1)

Ví dụ theo sáng chế bộc lộ ví dụ tạo ra thể tiếp hợp. Khi thể hiện mỗi Ví dụ tạo ra trong Ví dụ theo sáng chế, "Ví dụ 5" được thể hiện bởi một dấu nối sau "số thể tiếp hợp". Ví dụ, "Ví dụ 5-101" chỉ ra rằng đây là Ví dụ tạo ra thể tiếp hợp 101 trong Ví dụ theo sáng chế. Ngoài ra, đối với Fab⁵ trong Ví dụ theo sáng chế, (P10-2) được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế WO2018/092885 được sử dụng. "p-Fab⁵" chỉ ra rằng Fab⁵ được gắn kết với p phần đánh dấu kèm theo [] hoặc () qua nhóm amin p của nó để tạo ra thể tiếp hợp. Trong một số ví dụ sau đây, số lượng phần đánh dấu) gắn kết với

Fab⁵ của mỗi thể tiếp hợp mà có thể được xác nhận bằng phân tích MS được mô tả, nhưng kết quả không chỉ ra rằng thể tiếp hợp có số lượng phần đánh dấu gắn kết khác với số lượng nêu trên không bao gồm. Sẽ dễ dàng hiểu được rằng có thể vẫn có thể tiếp hợp có số lượng phần đánh dấu được gắn kết mà sự có mặt của chúng không thể được xác nhận do độ chính xác của thiết bị phân tích MS. Ngoài ra, trong các công thức cấu trúc trong Ví dụ theo sáng chế, công thức cấu trúc của DOTA mà Gd được gắn kết về mặt sơ đồ chỉ ra rằng DOTA được đánh dấu bằng Gd.

(Ví dụ 5-101. Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)]p-Fab⁵))

(i) Tổng hợp thể tiếp hợp số 101

[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)methyl]phenyl} carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-18 (vii) được hòa tan trong DMSO (40 μL). Chất đệm borat 0,1 M (40 μL) được bổ sung vào dung dịch thu được, và độ pH được điều chỉnh đến 6,6 sử dụng chất đệm axetat 0,25M.

80 μL dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào 5,2 mg/mL chất đệm borat Fab⁵ (240 μL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. 15 μL EDTA 0,05M được bổ sung, và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 10 phút. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL. Dung dịch thu hồi được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat 7 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#N)] có khối lượng phân tử 1074 được gắn kết với một Fab⁵ có khối lượng phân tử 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

(Ví dụ 5-104. Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4 và/hoặc A-5)]p-Fab⁵))

(i) Tổng hợp thể tiếp hợp số 104

[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]phenyl} carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-18 (vii) được hòa tan trong DMSO (40 μL). Chất đệm borat 0,1 M (40 μL) được bổ sung vào dung dịch thu được, và độ pH được điều chỉnh đến 10,2 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M.

Toàn bộ dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào 5,2 mg/mL chất đệm borat Fab⁵ (240 μL), và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL và được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat.

Sự trao đổi dung dịch đệm được thực hiện hai lần sử dụng 3mL dung dịch đệm HEPES-NaOH (độ pH = 4,5) và nồng độ được thực hiện để tạo ra 100 μL dung dịch có độ pH = 4,52, và sau đó dung dịch được ủ ở 45°C trong 30 phút.

Dung dịch được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat 3 lần, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-4 và/hoặc A-5)] có khối lượng phân tử 1092 được gắn kết với một Fab⁵ có khối lượng phân tử 47,5 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

(Ví dụ 5-107. Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)]p-Fab⁵))

(i) Tổng hợp thể tiếp hợp số 107

[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy-κO)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido-κO)metyl]phenyl} carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)etyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (0,75 mg)

được tổng hợp trong Ví dụ 2-18 (vii) được hòa tan trong DMSO (40 μ L), chất đệm borat 0,1 M (40 μ L) được bổ sung, và sau đó độ pH được điều chỉnh đến 8,2 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M và chất đệm axetat 0,25M.

2 mg/mL dung dịch 2-IT (7,5 μ L) được điều chế sử dụng chất đệm borat 0,1 M được bổ sung vào 5,2 mg/mL chất đệm borat Fab⁵ (240 μ L), và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 40 phút. 2-IT dư được rửa bằng dung dịch nước muối đệm phosphat sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-0,5mL và được cô, sau đó dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung, và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp.

Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-Z₁(#S)] có khối lượng phân tử 1175 được gắn kết với một Fab⁵ có khối lượng phân tử 47,5 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 5-112 Tổng hợp ([Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)]p-Fab⁵)

(i) Tổng hợp thể tiếp hợp số 112

[N-({4-[(2-{4,7,10-tris[(carboxy- κ O)metyl]-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl- κ^4 N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetamido- κ O)metyl]phenyl} carbamoyl)-L-metionyl-N¹-[2-{[(4-isothioxyanatophenyl)carbamothioyl]amino}etyl]-L-isoleuxinamidato(3-)]gadolini (0,46 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-68 (x) được hòa tan trong DMSO (155 μ L). 30 μ L dung dịch nước natri cacbonat 0,1M và dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào dung dịch Fab⁵ (240 μ L) được điều chế đến 5,2 mg/mL sử dụng chất đệm borat và dung dịch glycerin để điều chỉnh độ pH đến 8,8, và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu

được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)] có khối lượng phân tử 1187 được gắn kết với một Fab⁵ có khối lượng phân tử 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

(Ví dụ 5-113. Tổng hợp ([Gd/DOTA-[2,5-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-Ph)-NH-C(=S)]p-Fab⁵))

(i) Tổng hợp thể tiếp hợp số 113

{N-[2-({4,7,10-tris[(carboxy-κO)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl-κ⁴N¹,N⁴,N⁷,N¹⁰}axetyl-κO)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-carbonyl]-L-metionylglyxyl-N⁶-[(4-isothioxyanatophenyl)carbamothioyl]-L-lysinato(3-)}gadolini (0,22 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-69 (vii) được hòa tan trong DMSO (72 μL). 30 μL dung dịch nước natri cacbonat 0,1M và dung dịch trước đó đã được điều chế được bổ sung vào dung dịch Fab⁵ (240 μL) được điều chế đến 5,2 mg/mL sử dụng chất đệm borat và dung dịch glyxerin để điều chỉnh độ pH đến 9,3, và hỗn hợp thu được được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [Gd/DOTA-[2,5-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin)]-C(=O)-Met-Gly-Lys*-C(=S)-NH-(1,4-Ph)-NH-C(=S)] có khối lượng phân tử 1228 được gắn kết với một Fab⁵ có khối lượng phân tử 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

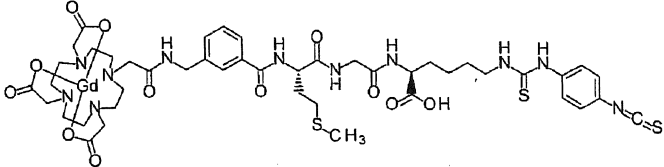
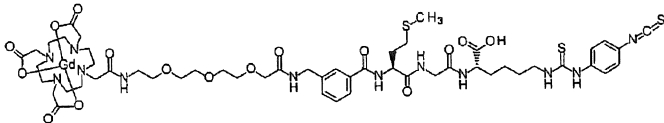
Các công thức cấu trúc hóa học (Str) của các thể tiếp hợp thu được trong ví dụ điều chế nêu trên được thể hiện trong các bảng 37 và 38.

[Bảng 38]

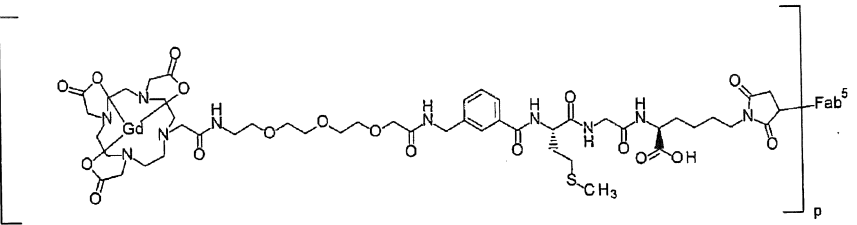
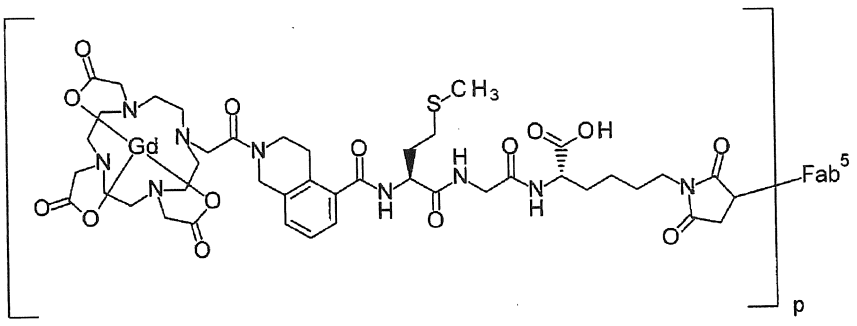
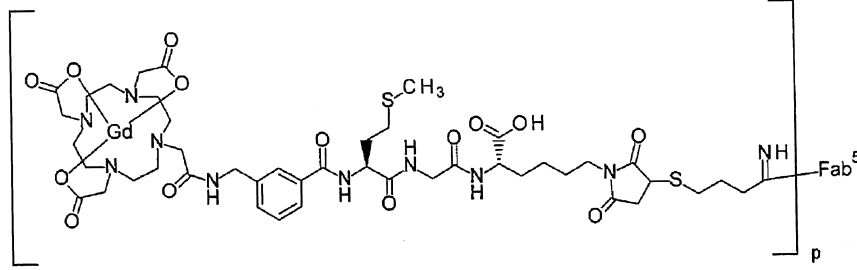
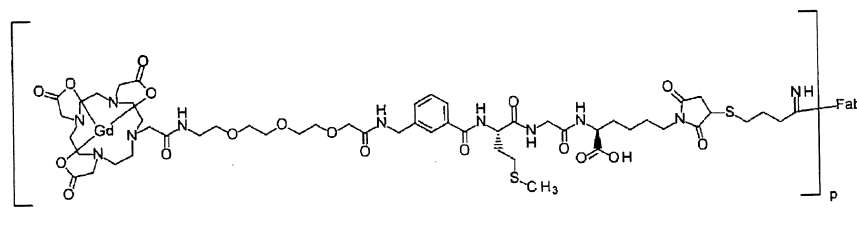
Ví dụ số	Cấu trúc
107	
112	
113	

Các hợp chất của Ví dụ tạo ra số C1 và C2 trong bảng 39 được tổng hợp sử dụng các phương pháp tương tự như trong các ví dụ tạo ra nêu trên, hoặc các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và các hợp chất này được sử dụng hoặc các hợp chất được tổng hợp trong Ví dụ 2 được sử dụng để thu được các thể tiếp hợp với Fab⁵ được thể hiện trong Bảng 40 và 41 dưới đây.

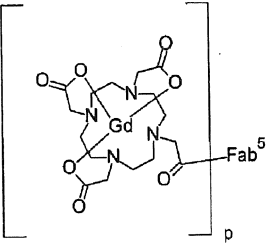
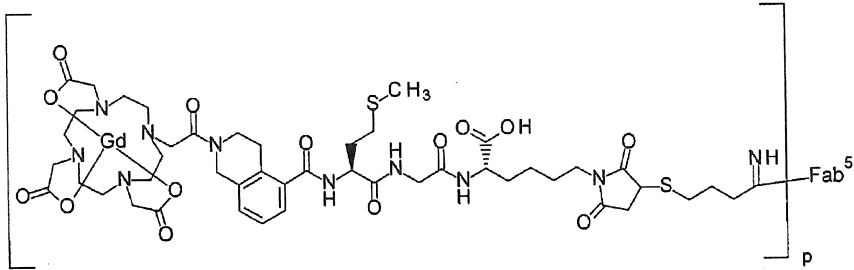
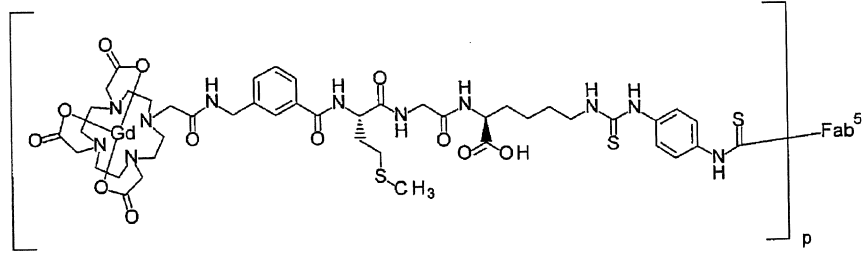
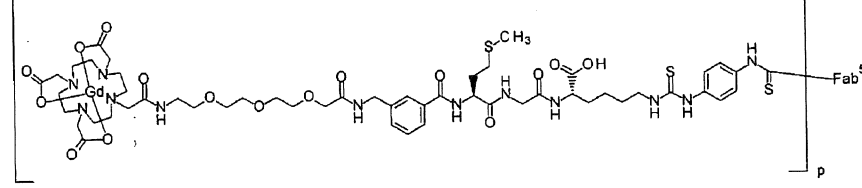
[Bảng 39]

Số	Cấu trúc	MS	Phương pháp tạo ra tương tự
C1		ESI-; 1199,2	Như trong ví dụ số 68 và 69
C2		ESI-; 1388,3	Như trong ví dụ số 68 và 69

[Bảng 40]

Ví dụ số	Cấu trúc
102	
103	
105	
106	

[Bảng 41]

Ví dụ số	Cấu trúc
108	
109	
110	
111	

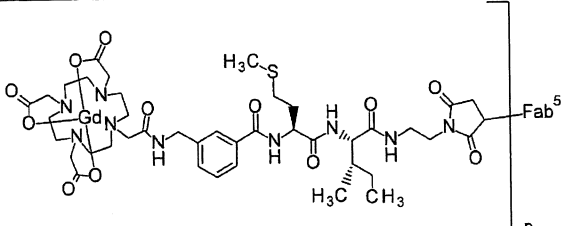
Các phân tích MS của các hợp chất ví dụ được thể hiện trong Bảng 40 và 41 được thể hiện trong các bảng sau đây.

[Bảng 42]

Ví dụ số	MS
102	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1278 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.
103	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1115 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.
105	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1190 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.
106	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1380 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.
108	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 542 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.
109	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1216 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó.
110	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1201 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.
111	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1391 được gắn kết với một Fab ⁵ có khối lượng phân tử là 47,5 kDa và thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ hợp chất trong bảng 43 thu được sử dụng phương pháp tương tự như trong các ví dụ tạo ra nêu trên hoặc phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

[Bảng 43]

Ví dụ số	Cấu trúc	Phương pháp tạo ra tương tự
114		Như trong ví dụ số 15 và 18

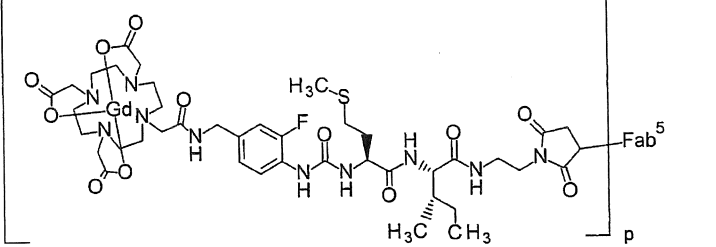
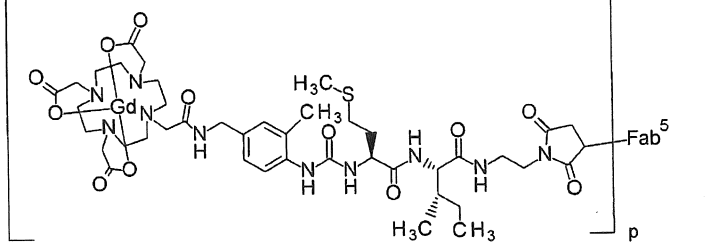
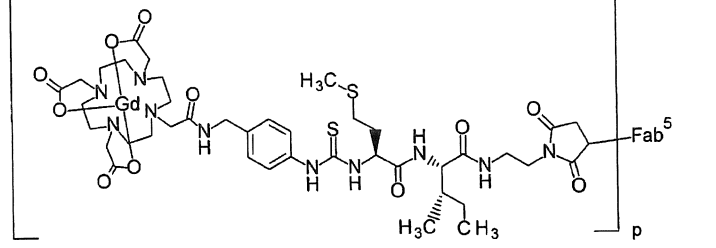
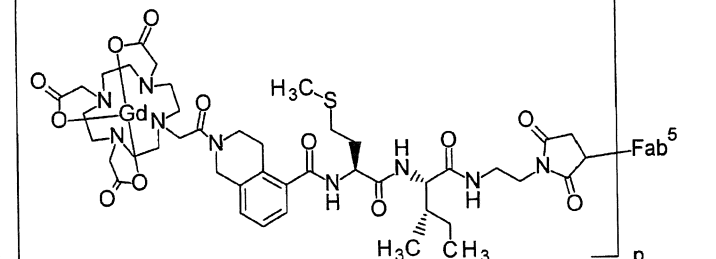
Phân tích MS của hợp chất ví dụ được thể hiện trong Bảng 43 được thể hiện trong Bảng 44 dưới đây.

[Bảng 44]

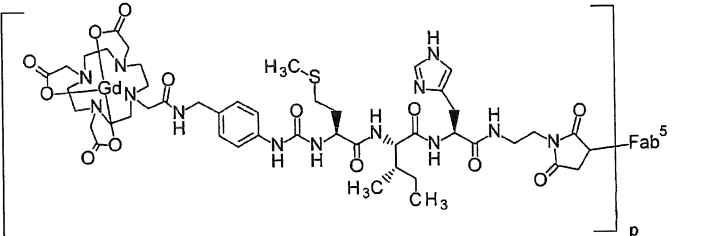
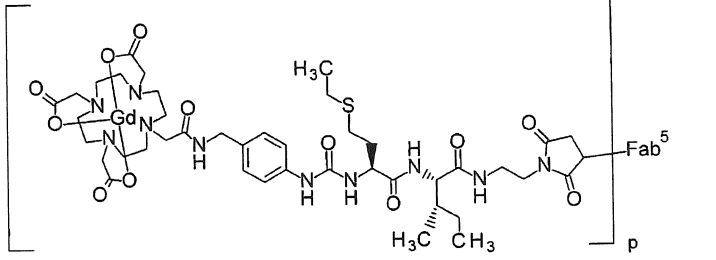
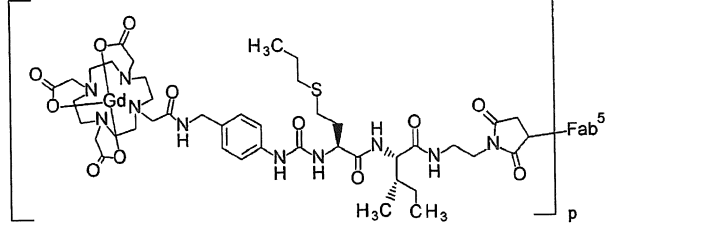
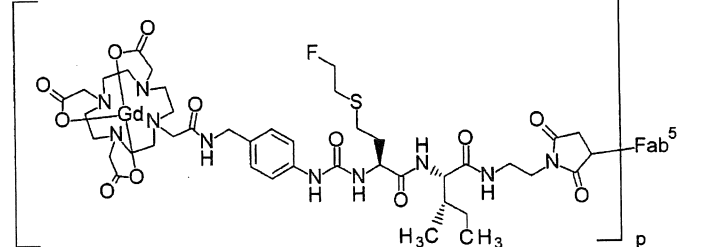
Ví dụ số	MS
1 1 4	Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một phân tử khối lượng phân tử nhỏ có khối lượng phân tử là 1059 được gắn kết với một Fab ^s có khối lượng phân tử là 47,5 kDa.

Hơn nữa, các thể tiếp hợp trong bảng 45 đến 50 có thể thu được bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự như trong các ví dụ tạo ra nêu trên hoặc các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

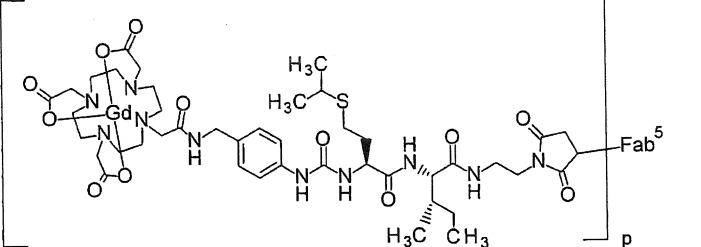
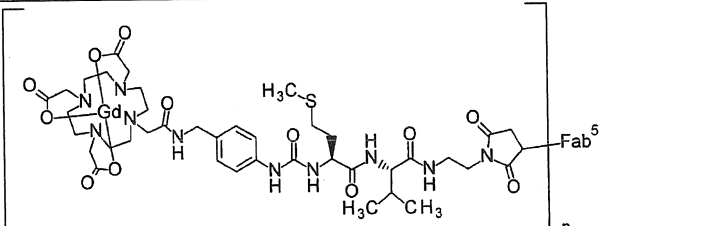
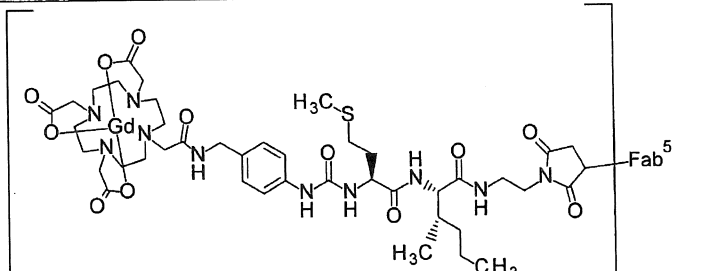
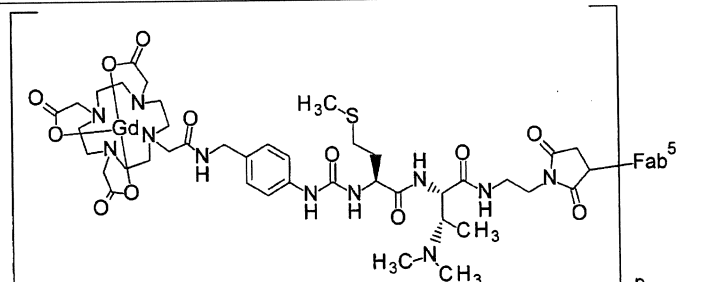
[Bảng 45]

Ví dụ số	Cấu trúc
P 1	
P 2	
P 3	
P 4	

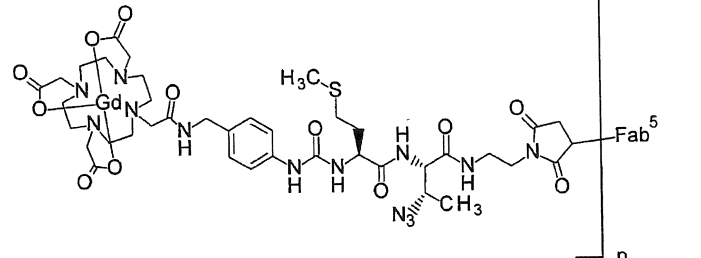
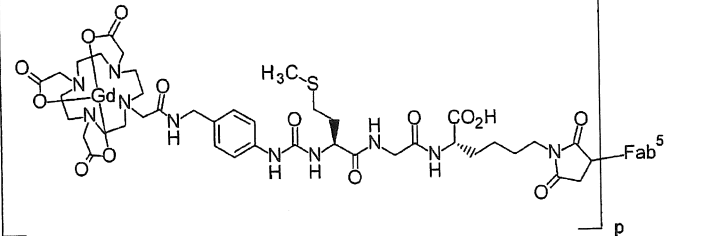
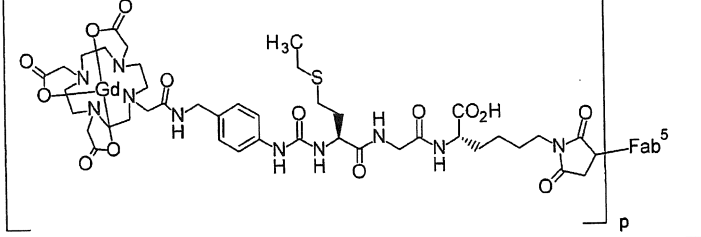
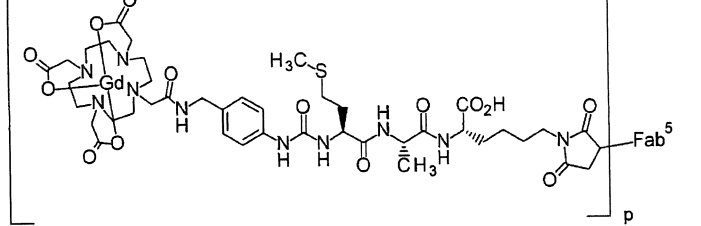
[Bảng 47]

Ví dụ số	Cấu trúc
P 9	
P 10	
P 11	
P 12	

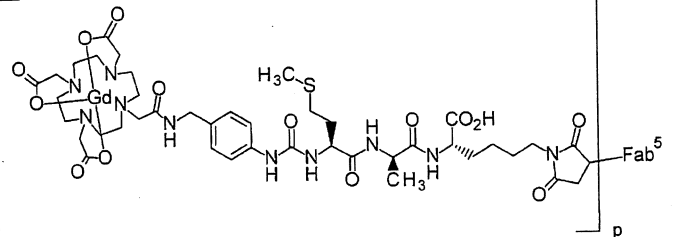
[Bảng 48]

Ví dụ số	Cấu trúc
P 1 3	
P 1 4	
P 1 5	
P 1 6	

[Bảng 49]

Ví dụ số	Cấu trúc
P 1 7	
P 1 8	
P 1 9	
P 2 0	

[Bảng 50]

Ví dụ số	Cấu trúc
P 2 1	

Ví dụ 6-1: Đánh giá khả năng gắn kết hoạt tính của thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ của kháng thể kháng MUC1 người

Mỗi thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ của kháng thể kháng MUC1 người được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 5 được thử nghiệm ELISA để đánh giá hoạt tính gắn kết của chúng với MUC1 đặc hiệu bệnh ung thư ở người. Trong thử nghiệm này, 20X dung dịch đệm PBS/Tween 20 (Thermo Fisher Scientific Inc., 28352) được pha loãng 20 lần bằng nước cất được sử dụng làm chất lỏng rửa. Ngoài ra, đối với albumin huyết thanh bò (BSA) được sử dụng trong thử nghiệm này, 30% dung dịch albumin huyết thanh bò (Sigma-Aldrich, Inc., A9576-50ML) được bổ sung với tỷ lệ thích hợp để dùng. Peptit MUC1 đặc hiệu với bệnh ung thư ở người (PTL 1) ở 0,5 $\mu\text{mol/L}$ được bổ sung vào đĩa trắng 384 Nunc MaxiSorp (Nunc, 460372) ở 30 μL /lỗ, và đĩa được ủ qua đêm ở 4°C để bất động. Peptit MUC1 được lấy ra bằng cách ly tâm ngược, và sau đó quá trình phong bế được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA. Sau đó, dung dịch phong bế được lấy ra bằng cách ly tâm ngược, dung dịch chứa mỗi thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ của kháng thể kháng MUC1 người (Ví dụ số 104, 108, hoặc 112) được mô tả nêu trên ở khoảng 10000 ng/mL được pha loãng ở 14 bước bằng cách pha loãng 3 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 1,0% BSA, và 30 μL được bổ sung /lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Đĩa được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và kháng thể IgG kháng người của dê được đánh dấu peroxidaza củ cải đường (Southern Biotechnology Associates, Inc.) được pha loãng 10000 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA được bổ sung ở 30 μL /lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Đĩa được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và chất phản ứng phát hiện của thử nghiệm thẩm Western với chất mồi ECL (GE Healthcare, RPN2232) làm cơ chất được bổ sung ở 30 μL /lỗ. Cơ chất được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó giá trị đơn của chúng được đo sử dụng máy đếm Envision (PerkinElmer, Inc.).

Thử nghiệm đối với mỗi kháng thể được thực hiện hai lần lặp lại, và giá trị EC₅₀ được tính toán sử dụng mô hình đường cong logistic 4 thông số. Giá trị EC₅₀ (nM) đối

với mỗi lần hoạt động trong số 3 lần hoạt động đối với P10-2 được thể hiện trong Bảng 51. Ngoài ra, giá trị EC_{50} của mỗi thể tiếp hợp hoạt động hai lần lặp lại được thể hiện trong Bảng 52.

[Bảng 51]

P 1 0 – 2 (nM)
0,06
0,06
0,14

[Bảng 52]

Ví dụ số	EC 50 (nM)
1 0 4	0,08
1 1 2	0,15
1 0 8	0,07

Ví dụ 6-2: Đánh giá khả năng gắn kết hoạt tính của thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ của kháng thể kháng MUC1 người

Mỗi thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ của kháng thể kháng MUC1 người được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 5 được thử nghiệm ELISA để đánh giá hoạt tính gắn kết của chúng với MUC1 đặc hiệu bệnh ung thư ở người. Trong thử nghiệm này, 20X dung dịch đệm PBS/Tween 20 (Thermo Fisher Scientific Inc., 28352) được pha loãng 20 lần bằng nước cất được sử dụng làm chất lỏng rửa. Ngoài ra, đối với albumin huyết thanh bò (BSA) được sử dụng trong thử nghiệm này, 30% dung dịch albumin huyết thanh bò (Sigma-Aldrich, Inc., A9576-50ML) được bổ sung với tỷ lệ thích hợp để dùng. Peptit MUC1 đặc hiệu với bệnh ung thư ở người (PTL 1) ở 0,5 $\mu\text{mol/L}$ được bổ sung vào đĩa trắng 384 Nunc MaxiSorp (Nunc, 460372) ở 30 μL /lỗ, và đĩa được ủ qua đêm ở 4°C

để bất động. Peptit MUC1 được lấy ra bằng cách ly tâm ngược, và sau đó quá trình phong bế được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA. Sau đó, dung dịch phong bế được lấy ra bằng cách ly tâm ngược, dung dịch chứa mỗi thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ của kháng thể kháng MUC1 người (Ví dụ số 101-113) được mô tả nêu trên ở khoảng 10000 ng/mL được pha loãng ở 14 bước bằng cách pha loãng 3 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 1,0% BSA, và 30 μ L được bổ sung /lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Đĩa được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và kháng thể Igk kháng người của dê được đánh dấu peroxidaza củ cải đường (Southern Biotechnology Associates, Inc.) được pha loãng 10000 lần sử dụng dung dịch đệm PBS/Tween 20 chứa 5,0% BSA được bổ sung ở 30 μ L /lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Đĩa được rửa 3 lần với dung dịch đệm PBS/Tween 20, và chất phản ứng phát hiện của thử nghiệm thấm Western với chất môi ECL (GE Healthcare, RPN2232) làm cơ chất được bổ sung ở 30 μ L /lỗ. Cơ chất được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó giá trị đơn của chúng được đo sử dụng máy đếm Envision (PerkinElmer, Inc.).

Thử nghiệm đối với mỗi kháng thể được thực hiện hai lần lặp lại, và giá trị EC₅₀ được tính toán sử dụng mô hình đường cong logistic 4 thông số. Giá trị EC₅₀ (nM) đối với mỗi lần hoạt động trong số 3 lần hoạt động đối với P10-2 được thể hiện trong Bảng 53. Ngoài ra, giá trị EC₅₀ của mỗi thể tiếp hợp hoạt động hai lần lặp lại được thể hiện trong Bảng 54.

[Bảng 53]

P 1 0 – 2 (nM)
0,06
0,06
0,14

[Bảng 54]

Ví dụ số	EC 50 (nM)
1 0 1	0,08
1 0 2	0,07
1 0 3	0,08
1 0 5	0,11
1 0 6	0,10
1 0 7	0,09
1 0 8	0,07
1 0 9	0,08
1 1 0	0,19
1 1 1	0,16
1 1 3	0,19

Ví dụ 7: Thử nghiệm đánh giá sự tích lũy trong thận của các thể tiếp hợp được đánh dấu Gd (chuột nhắt khỏe mạnh)

Phương pháp thử nghiệm

Thể tiếp hợp được đánh dấu Gd của thể tiếp hợp chứa phần tử liên kết peptit tạo ra trong một trong số các ví dụ nêu trên được dùng theo đường tĩnh mạch đuôi của chuột nhắt (BALB/c hoặc BALB/c nu/nu) sao cho khối lượng protein là 0,02 mg (100 μ L) /con. Sau khoảng 24 giờ, chuột nhắt được đem giết và thận được lấy ra, và lượng Gd ở thận được đo sử dụng ICP-MS. Thử nghiệm này được thực hiện ở 3 trường hợp ở mỗi nhóm, giá trị trung bình của 3 trường hợp được tính toán, và lượng Gd chứa/thận sau khi dùng là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm (% liều/mô) của tổng lượng Gd được dùng. Thử nghiệm tương tự được thực hiện sử dụng Ví dụ số 108 tạo ra trong Ví dụ tạo ra 5, mà không chứa phần tử liên kết peptit, làm thể tiếp hợp đối chứng.

Giá trị trung bình trong 2 lần hoạt động đối với Ví dụ số 108 được thể hiện trong Bảng 55.

(Kết quả)

Các kết quả được nêu trong Bảng 56. Dựa vào lượng Gd chứa ở thận của thể tiếp hợp đối chứng, tỷ lệ giảm lượng Gd chứa ở thận của mỗi thể tiếp hợp trong số các thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptit được xác định. Như được thể hiện trong Bảng 56, mức độ tích lũy của phần đánh dấu ở thận là từ 91,52 đến 93,03% điểm trong thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptiti nhỏ hơn so với trong thể tiếp hợp đối chứng.

[Bảng 55]

Lượng dư trong thận (chuột nhất khỏe mạnh)

	Ví dụ 108
Giá trị trung bình (% liều/mô)	33,00

[Bảng 56]

Lượng dư trong thận (chuột nhất khỏe mạnh)

Ví dụ số	% liều/mô	Tỷ lệ giảm (%)
1 0 4	2,30	93.03
1 1 2	2,80	91,52

Ví dụ 8: Thử nghiệm đánh giá sự tích lũy trong thận của các thể tiếp hợp được đánh dấu Gd (chuột nhất mang khối u)

Phương pháp thử nghiệm

Thể tiếp hợp được đánh dấu Gd của thể tiếp hợp chứa phần tử liên kết peptit tạo ra trong một trong số các ví dụ nêu trên được dùng theo đường tĩnh mạch đuôi của chuột nhất mang khối u sao cho khối lượng protein là 0,02 mg (100 μ L)/con. Đối với chuột nhất mang khối u được sử dụng trong Ví dụ theo sáng chế, chuột nhất (BALB/c

nu/nu) ở trạng thái mang khối u đưa vào bằng cách cấy ghép dòng tế bào MDA-MB-468 ung thư vú của người (ATCC(nhãn hiệu được đăng ký); HTB-132) ở $5,0 \times 10^6$ tế bào/chuột nhất dưới da lưng trước khi dùng mẫu được sử dụng. 24 giờ sau khi dùng mẫu, chuột nhất được đem giết, thận và khối u được loại ra, và lượng Gd ở thận và trong khối u được đo sử dụng ICP-MS. Thử nghiệm này được thực hiện ở 3 trường hợp ở mỗi nhóm, và giá trị trung bình của 3 trường hợp được tính toán. Lượng Gd chứa/thận sau khi dùng là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm của lượng Gd được dùng (% liều/mô), và lượng Gd chứa trong mỗi g khối u mô là như được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm của tổng lượng Gd được dùng (% liều/g). Kết quả được thể hiện trong các bảng 59 và 60. Ví dụ số trong bảng thể hiện số lượng thể tiếp hợp trong Ví dụ 5. Ngoài ra, thử nghiệm tương tự được thực hiện sử dụng Ví dụ số 108 tạo ra trong Ví dụ tạo ra 5, mà không chứa phần tử liên kết peptit, làm thể tiếp hợp đối chứng. Các giá trị trung bình là trong 2 hoạt động đối với Ví dụ số 108 được thể hiện trong Bảng 57 và 58.

(Kết quả)

Như được thể hiện trong Bảng 57 đến 60, mức độ tích lũy của phần đánh dấu ở thận là từ 88,08 đến 90,87% điểm trong thể tiếp hợp có phần tử liên kết peptiti nhỏ hơn so với trong thể tiếp hợp đối chứng.

[Bảng 57]

Lượng dư trong thận

	Lượng dư trong thận % liều/mô
Giá trị trung bình	34,67

[Bảng 58]

Tích lũy trong khối u

	Lượng tích lũy % liều/g
Giá trị trung bình	0,92

[Bảng 59]

Lượng dư trong thận (chuột mang khối u)

Ví dụ số	% liều/mô	Tỷ lệ giảm (%)
1 0 4	3,17	90,87
1 1 2	4,13	88,08

[Bảng 60]

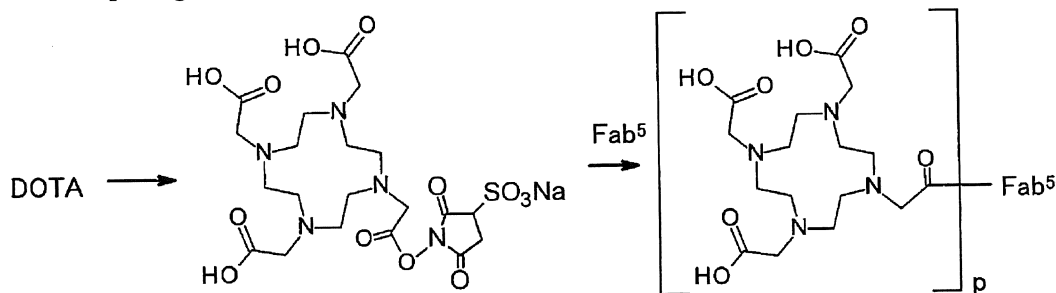
Lượng tích lũy trong khối u (chuột mang khối u)

Ví dụ số	% liều/g
1 0 4	1,04
1 1 2	1,27

(Ví dụ 9: Điều chế thể tiếp hợp mảnh Fab⁵ của kháng thể MUC1 người

Ví dụ 9-115 Tổng hợp [Gd/DOXA]p-Fab⁵)

[Công thức hóa học 124]



Ví dụ số 115

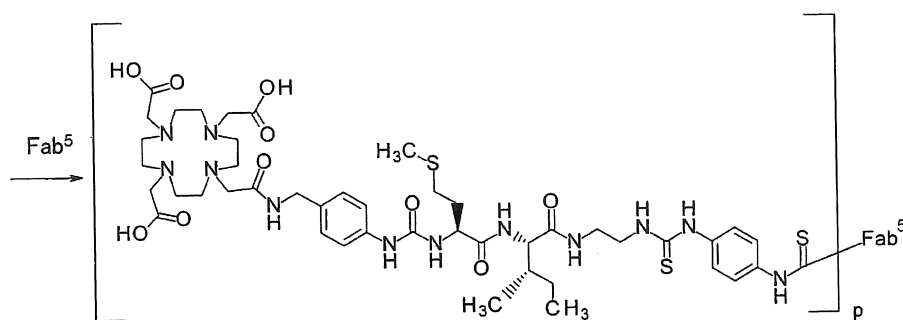
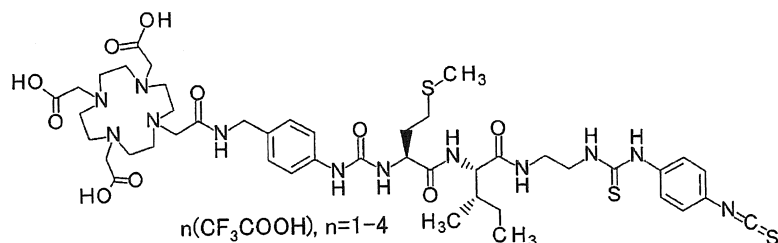
Dung dịch nước natri hydroxit 1M (80 μ L) được bổ sung vào dung dịch đã trộn gồm axit 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic (DOTA) (16 mg) và nước (810 μ L) trong điều kiện làm lạnh bằng băng để điều chỉnh độ pH từ 5,5 đến 6. Natri 1-hydroxy-2,5-dioxopyrrolidin-3-sulfonat (2,3 mg) được hoà tan trong nước (117 μ L) được bổ sung vào dung dịch thu được (239 μ L) trong điều kiện làm lạnh bằng băng.

Sau đó, dung dịch nước EDC HCl (8,3 μ L, 25 mg/mL) được bổ sung, và hỗn hợp thu được được khuấy trong điều kiện làm lạnh bằng băng trong 30 phút để điều chế dung dịch N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. Trước khi bổ sung Fab⁵, dung dịch nước dinatri hydro phosphat ở 0,2M (độ pH = 9) (40 μ L) được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 7.

Dung dịch N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA đã được điều chế (300 μ L) được bổ sung vào dung dịch nước dinatri hydro phosphat ở 0,1M (585 μ L) chứa 20,8 mg/mL Fab⁵ (90 μ L), và hỗn hợp thu được được ủ ở 4°C trong 23 giờ. Phần tử liên kết dư được rửa bằng dung dịch đệm phosphat 10mM sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL lặp lại hai lần, được rửa bằng chất đệm amoni axetat 0,3M, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp ví dụ số 115. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [DOTA] có khối lượng phân tử 387 được gắn kết với một Fab⁵ có khối lượng phân tử 47,5 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó bốn phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 9-116 Tổng hợp [DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)]p-Fab⁵)

[Công thức hóa học 125]



Ví dụ số 116

N- $\{[4-(\{2-[4,7,10\text{-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1-yl]axetamido\}methyl)phenyl]carbamoyle\}$ -L-metionyl-N¹-(2- $\{[(4\text{-isothioxyanatophenyl})carbamoethyl]amino\}$ ethyl)-L-isoleuxinamit tetrakis(trifloaxetat) (1 mg) được tổng hợp trong Ví dụ 2-68 (ix) được hòa tan trong DMSO (336 μL).

30 μL dung dịch đã được điều chế trước đó được bổ sung vào 5,2 mg/mL dung dịch nước muối đệm phosphat Fab⁵ (240 μL), độ pH được điều chỉnh đến khoảng 8,0 sử dụng dung dịch nước natri cacbonat 0,1M, và hỗn hợp thu được được ủ ở 30°C trong 2 giờ. Hỗn hợp được tinh chế sử dụng cột PD-10, và dung dịch thu được được thu hồi sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15mL. Dung dịch thu hồi được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat, cuối cùng được cô, và sau đó được lọc bằng cách lọc màng để thu được thể tiếp hợp Ví dụ số 116. Quy trình tương tự được tiến hành lại, và thể tiếp hợp ví dụ 116 thu được được trộn. Đã xác nhận được bằng phân tích MS rằng thể tiếp hợp là hỗn hợp gồm thể tiếp hợp trong đó một [DOTA-NH-CH₂-(1,4-Ph)-NH-C(=O)-Met-Ile-NH-(CH₂)₂-(A-3)] có khối lượng phân tử 1032 được gắn kết với

một Fab⁵ có khối lượng phân tử 47,5 kDa, thể tiếp hợp trong đó hai phân tử này được gắn kết vào đó, thể tiếp hợp trong đó ba phân tử này được gắn kết vào đó, và thể tiếp hợp trong đó bốn phân tử này được gắn kết vào đó.

Ví dụ 10: Nghiên cứu động học của khi đuôi sóc thông thường hợp chất kim loại phức hợp

Ví dụ điều chế 1 của protein được đánh dấu ⁶⁴Cu

139 μ L dung dịch đệm natri axetat 0,1 mol/L (độ pH = 6,5) được bổ sung vào 10 μ L (19,8 MBq, FUJIFILM Toyama Chemical Co., Ltd.) dung dịch axit clohydric 0,05 mol/L [⁶⁴Cu]CuCl₂ và được phối trộn. Hơn nữa, 51 μ L thể tiếp hợp protein được điều chế trong hợp chất Ví dụ 9-115 được bổ sung, và hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút để phản ứng. Hỗn hợp phản ứng lỏng được bổ sung vào màng siêu lọc (Amicon Ultra 10K, Millipore) và hơn nữa, 50mmol/L dung dịch natri axetat được bổ sung để tinh chế bằng cách siêu lọc để thu được thể tiếp hợp dung dịch ⁶⁴Cu-protein (A) quan tâm. 140 μ L thể tiếp hợp protein và 145 μ L dung dịch PBS được trộn vào dung dịch thu được, và hỗn hợp thu được được lọc sử dụng thiết bị lọc bơm tiêm (Millex-GV 0,22 μ m, Millipore) để điều chế thể tiếp hợp (A) ⁶⁴Cu-protein chứa dung dịch PBS (11,5 MBq, 19,17 MBq/mg).

Ví dụ điều chế 2 về protein được đánh dấu ⁶⁴Cu

285 μ L dung dịch đệm natri axetat 0,1 mol/L (độ pH = 6,5) được bổ sung vào 20 μ L (37,1 MBq, FUJIFILM Toyama Chemical Co., Ltd.) 0,05 mol/L dung dịch axit clohydric chứa [⁶⁴Cu]CuCl₂ và được phối trộn. Hơn nữa, 94,7 μ L thể tiếp hợp protein được điều chế trong Ví dụ 9-116 được bổ sung, và hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút để phản ứng. Hỗn hợp phản ứng lỏng được bổ sung vào màng siêu lọc (Amicon Ultra 10K, Millipore) và hơn nữa, 50mmol/L dung dịch natri axetat được bổ sung để tinh chế bằng cách siêu lọc để thu được thể tiếp hợp (B) chứa dung dịch ⁶⁴Cu-protein quan tâm. 260 μ L thể tiếp hợp protein và 377 μ L dung dịch PBS được trộn vào dung dịch thu được, và hỗn hợp thu được được lọc sử dụng thiết bị lọc bơm tiêm (Millex-GV 0,22 μ m, Millipore) để điều chế thể tiếp hợp (B) ⁶⁴Cu-protein chứa dung

dịch PBS (31,5 MBq, 26,27 MBq/mg).

Chụp PET/CT

Khỉ đuôi sóc thông thường (2 tuổi) được gây mê bằng isofluran, và 175 đến 185 μ L dung dịch PBS chứa thể tiếp hợp (A) hoặc (B) chứa dung dịch ^{64}Cu -protein được dùng từ ven đuôi. Sau khi dùng, trong khi gây mê, các ảnh chụp thu được sử dụng thiết bị chụp PET/CT (PET: Clairvivo PET, được sản xuất bởi Shimadzu Corporation, CT: Aquilion, được sản xuất bởi TOSHIBA).

Fig. 1 thể hiện hình ảnh PET/CT thu được khoảng 3 giờ sau khi dùng dung dịch PBS chứa thể tiếp hợp (A) chứa dung dịch ^{64}Cu -protein. Ngoài ra, Fig. 2 thể hiện hình ảnh PET/CT thu được khoảng 3 giờ sau khi dùng dung dịch PBS chứa thể tiếp hợp (B) chứa dung dịch ^{64}Cu -protein. Fig. 3 thể hiện SUV. SUV là giá trị thu được bằng cách chia hoạt tính phóng xạ trong mỗi g mô cho hoạt tính phóng xạ đã được dùng trong mỗi g thể trọng, tức là, giá trị được thể hiện trong $\text{SUV} = \text{hoạt tính phóng xạ/g mô} / \text{hoạt tính phóng xạ đã được dùng/g thể trọng}$. Đối với hoạt tính phóng xạ, giá trị được hiệu chỉnh để làm suy yếu được sử dụng. Đã quan sát được rằng sự tích lũy ở thận là nhỏ hơn trên Fig. 2 so với Fig. 1.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế bao gồm thể tiếp hợp có hoạt tính gắn kết mỹ mãn với CEACAM5 của người và được kỳ vọng là hữu ích để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư liên quan đến CEACAM5 của người.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm thể tiếp hợp có hoạt tính gắn kết mỹ mãn với MUC1 và được kỳ vọng là hữu ích để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư liên quan đến MUC1.

Ngoài ra, thể tiếp hợp cấu thành từ DOTA 3 nhánh, thành phần đệm đặc hiệu, phân tử liên kết peptit đặc hiệu, và phân tử sinh học, là thể tiếp hợp theo sáng chế, được phân hủy ở thận và được bài tiết, và do đó được kỳ vọng là hữu ích để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến phân tử sinh học.

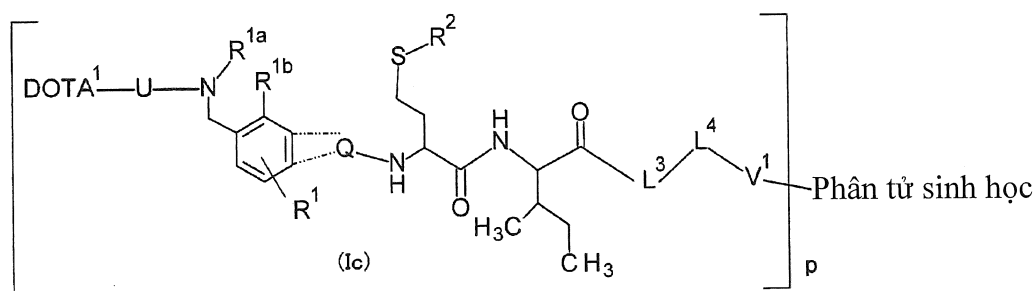
Văn bản không chứa danh mục trình tự

Trong đề mục đánh số <223> của danh mục trình tự dưới đây, việc mô tả "Trình tự nhân tạo" thông thường được đưa ra. Cụ thể, các trình tự nucleotit được biểu thị bởi các SEQ ID NO: 1 và 3 trong danh mục trình tự lần lượt là các trình tự nucleotit của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của PB009-01, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 và 4 là các trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bằng các SEQ ID NO: 1 và 3, tương ứng. Ngoài ra, các trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 và 9 trong danh mục trình tự lần lượt là các trình tự nucleotit của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của P10-1, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 và 10 là các trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bằng các SEQ ID NO: 5 và 9, tương ứng. Các trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 7 và 9 trong danh mục trình tự lần lượt là các trình tự nucleotit của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của P10-2, và các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và 10 là các trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bằng các SEQ ID NO: 7 và 9, tương ứng. SEQ ID NO: 11 và 15 lần lượt là vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của P10-1, và các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 và 16 là trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được mã hóa lần lượt bởi SEQ ID NO: 11 và 15. SEQ ID NO: 13 và 15 lần lượt là vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của P10-2, và các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 14 và 16 lần lượt là trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được mã hóa bởi SEQ ID NO: 13 và 15.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thở tiếp hợp được thể hiện bởi công thức (Ic) sau:

[Công thức 1]



trong đó

DOTA¹: DOTA 3 nhánh,

U: liên kết hoặc $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$

Q: $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, hoặc $-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-$

R¹ᵃ, R¹ᵇ: giống hoặc khác nhau, H hoặc C₁-₆ alkyl,

với điều kiện R¹ᵃ và R¹ᵇ cùng nhau có thể tạo ra C₁-₆ alkylen;

p là số tự nhiên từ 1 đến 25;

R¹: H, halogen, C₁-₆ alkyl, hoặc halo C₁-₆ alkyl,

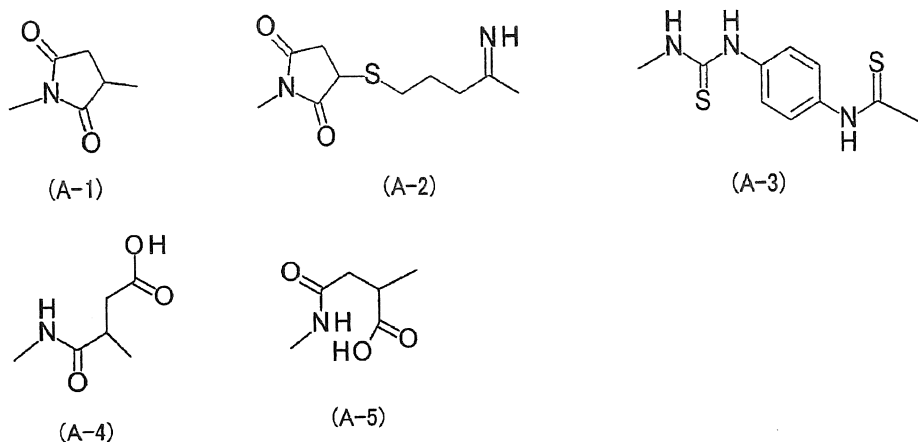
R²: C₁-₆ alkyl hoặc halo C₁-₆ alkyl,

L³: liên kết,

L⁴: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$, hoặc $-\text{NHCH}(\text{C}(=\text{O})\text{OH})(\text{CH}_2)_4-$,

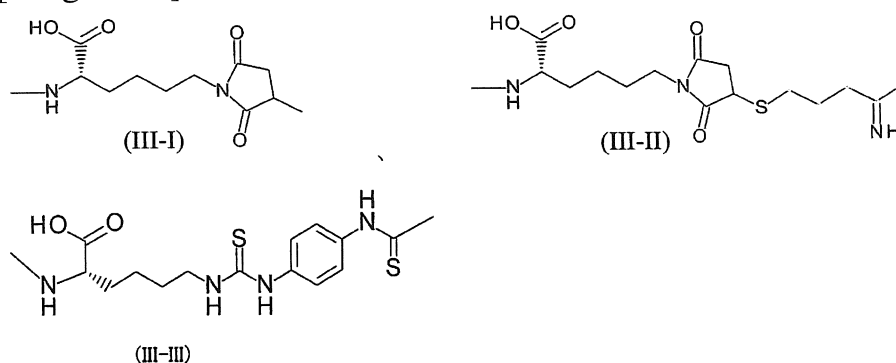
V¹: nhóm có công thức bất kỳ trong số các công thức (A-1) đến (A-5),

[Công thức 2]



hoặc, công thức -L³-L⁴-V¹- cùng nhau tạo ra công thức sau

[Công thức 3]



Phân tử sinh học: mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ:

(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16,

và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 và trong đó glutamin của axit amin 1 có SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 14 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi chuỗi

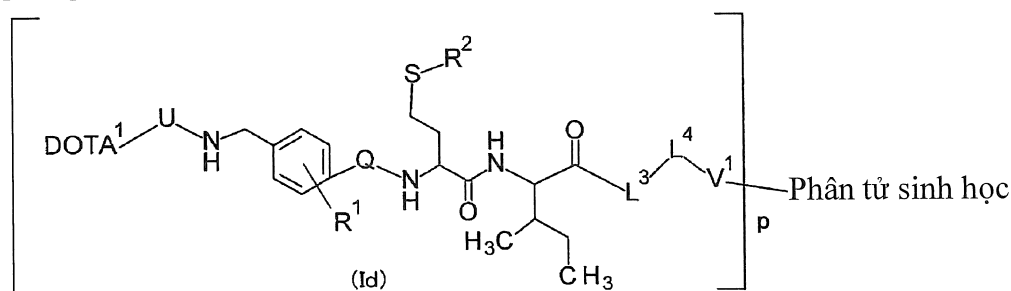
nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 16, và phân tử sinh học được gắn kết với V^1 qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p trong phân tử sinh học này,

[Công thức 4]

đường chấm chấm — · — · : Q được gắn kết với nguyên tử bất kỳ trong số hai nguyên tử cacbon trên vòng;

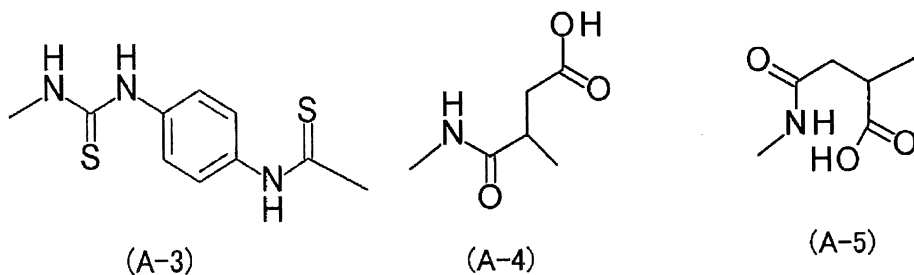
2. Thễ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó thễ tiếp hợp được thể hiện bởi công thức (Id) sau:

[Công thức 5]



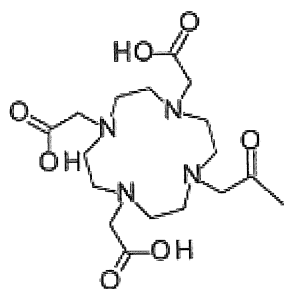
3. Thễ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó V^1 trong công thức (Id) là nhóm bất kỳ có các công thức (A-3) đến (A-5) sau:

[Công thức 6]



4. Thễ tiếp hợp theo điểm 3, trong đó DOTA 3 nhánh là

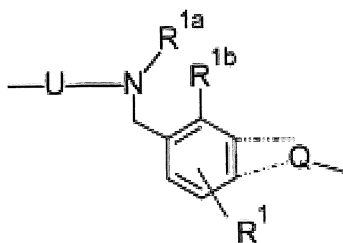
[Công thức 7]



5. Thẻ tiếp hợp theo điểm 4, trong đó R^2 là metyl.

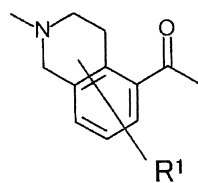
6. Thẻ tiếp hợp theo điểm 5, trong đó

[Công thức 8]

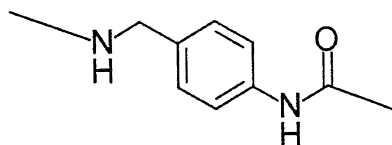


trong công thức (Ic) là

[Công thức 9]

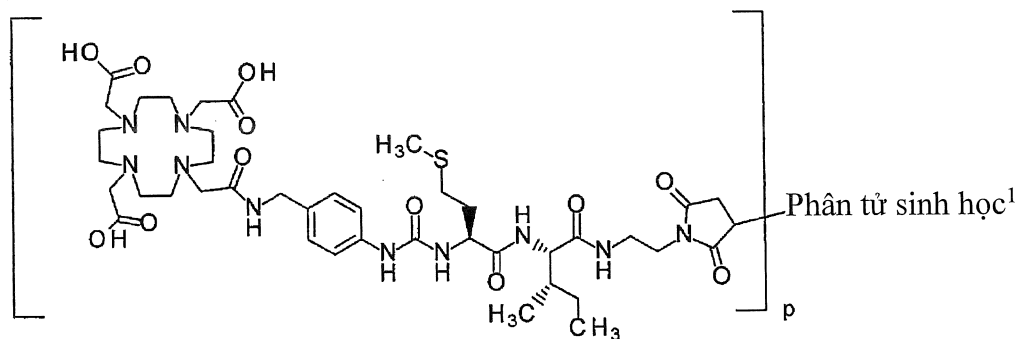


hoặc

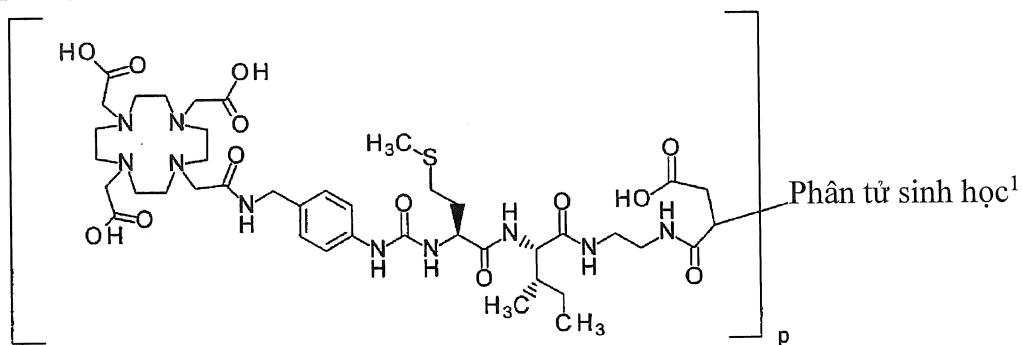


7. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó thẻ tiếp hợp được chọn từ nhóm cấu thành từ các hợp chất được thể hiện bởi các công thức sau:

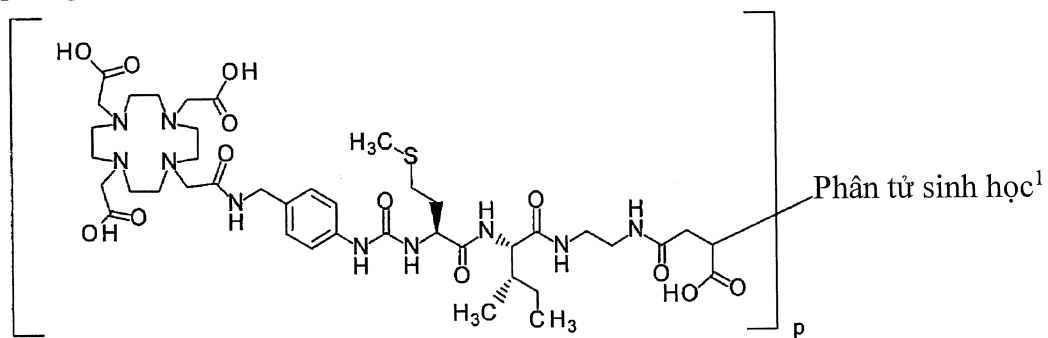
[Công thức 10-1]



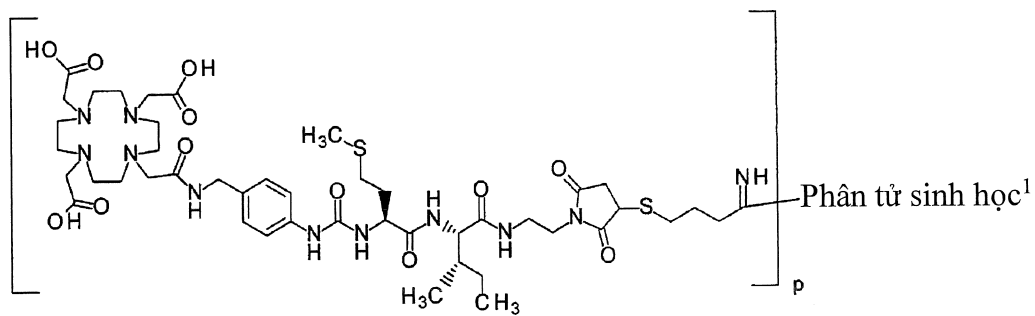
[Công thức 10-2]



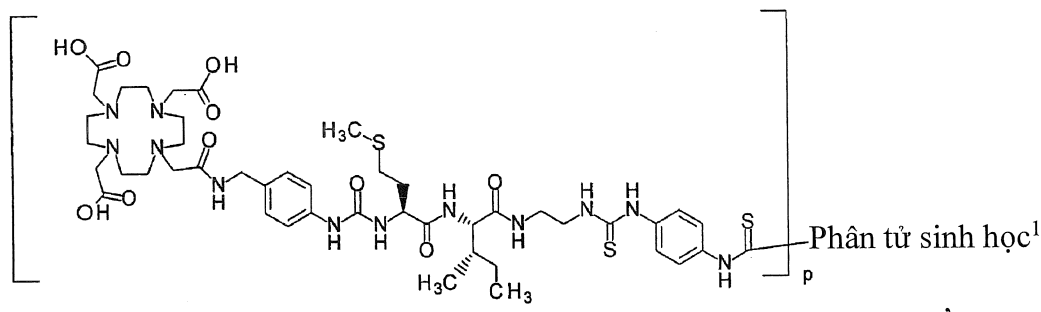
[Công thức 10-3]



[Công thức 10-4]



[Công thức 10-5]



trong đó phân tử sinh học¹ là phân tử sinh học được mô tả trong điểm 1.

8. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó phân tử sinh học là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người được chọn từ nhóm cấu thành từ:

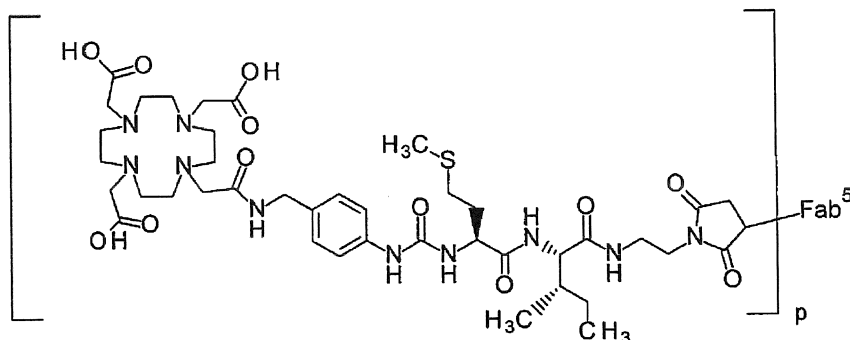
(a) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10; và

(b) mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

9. Thẻ tiếp hợp theo điểm 8, trong đó phân tử sinh học là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

10. Thẻ tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau:

[Công thức 11]

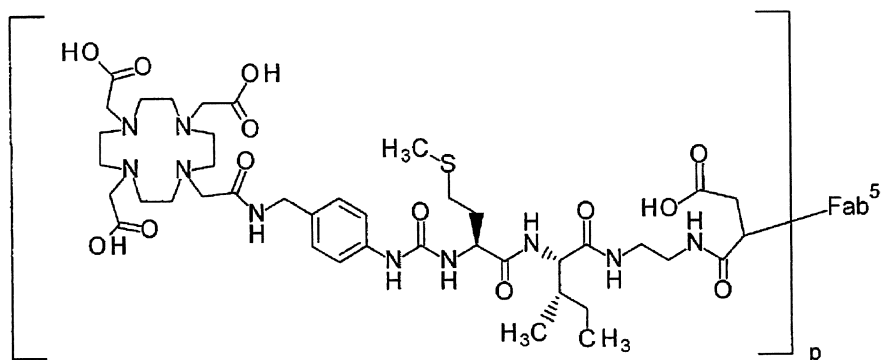


trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10; p là số tự nhiên từ 1 đến 25; và

Fab⁵ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p trong Fab⁵.

11. Thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau:

[Công thức 12]



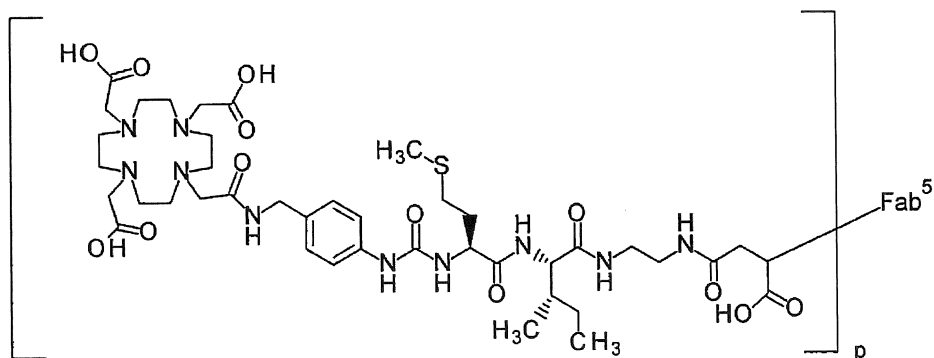
trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10; p là số tự nhiên từ 1 đến 25; và

Fab⁵ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p trong

Fab⁵.

12. Thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau:

[Công thức 13]



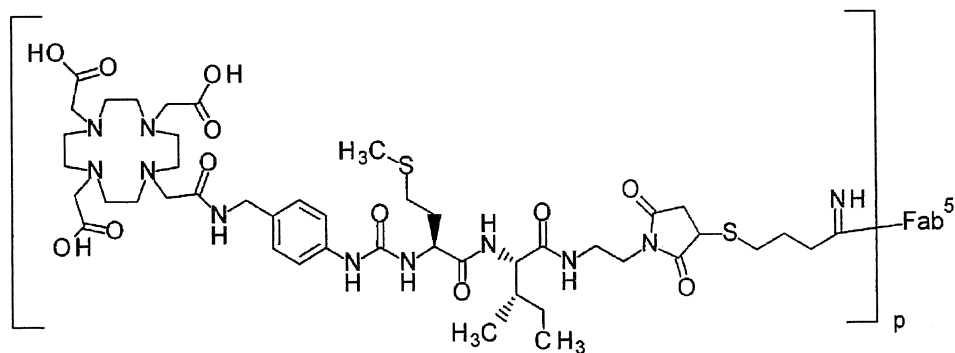
trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10;

p là số tự nhiên từ 1 đến 25; và

Fab⁵ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p trong Fab⁵.

13. Thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau:

[Công thức 14]



trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng

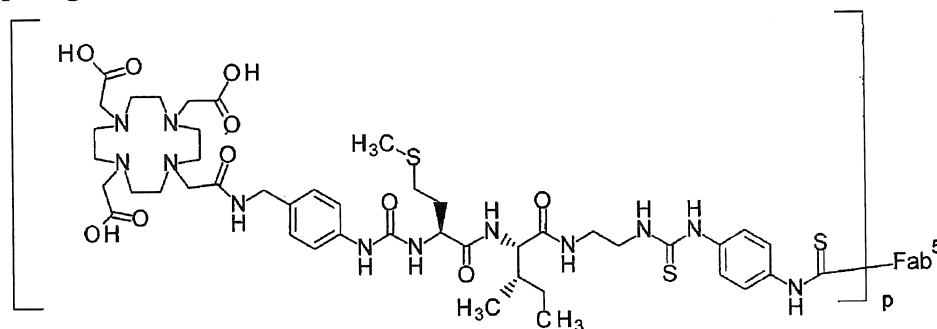
mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10;

p là số tự nhiên từ 1 đến 25; và

Fab⁵ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p trong Fab⁵.

14. Thể tiếp hợp được thể hiện bởi công thức sau:

[Công thức 15]



trong đó Fab⁵ là mảnh Fab của kháng thể MUC1 kháng người chứa mảnh chuỗi nặng mà cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và trong đó glutamin của axit amin 1 của SEQ ID NO: 8 được cải biến thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 10;

p là số tự nhiên từ 1 đến 25; và

Fab⁵ được gắn kết với nguyên tử cacbon liền kề qua nhóm amin hoặc nhóm thiol p trong Fab⁵.

15. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó p là số tự nhiên từ 1 đến 4.

16. Thể tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 15, trong đó kim loại được liên kết phối trí với DOTA 3 nhánh.

17. Thẻ liên hợp theo điểm 16, trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

18. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 14, trong đó kim loại được liên kết phối trí với DOTA 3 nhánh và kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

19. Thẻ liên hợp theo điểm 17 hoặc 18, trong đó kim loại là ^{89}Zr .

20. Thẻ tiếp hợp theo điểm 16, trong đó kim loại là ion kim loại thuận từ.

21. Thẻ tiếp hợp theo điểm 20, trong đó kim loại là Gd^{3+} .

22. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 16 đến 21, trong đó thẻ tiếp hợp là chất đánh dấu PET.

23. Chế phẩm chẩn đoán chứa một hoặc nhiều thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 22 và chất mang dược dụng.

24. Dược phẩm chứa một hoặc nhiều thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 16 đến 21 và chất mang dược dụng.

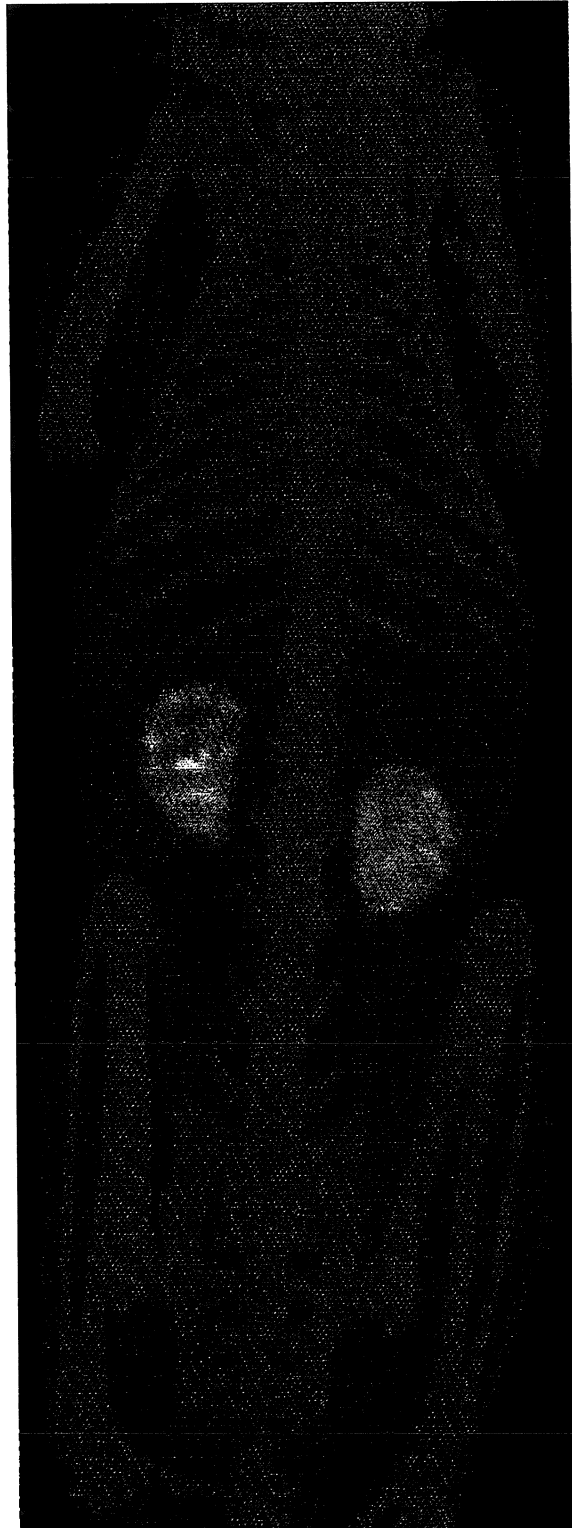
1/3

Fig. 1



2/3

Fig. 2



3/3

Fig. 3

60



0

[SUV]

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> Thẻ tiếp hợp chứa phối tử, chế phẩm chẩn đoán và dược phẩm chứa
thẻ tiếp hợp này

<130> A20002A00

<150> JP 2019-000530

<151> 2019-01-07

<150> JP 2019-206560

<151> 2019-11-14

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 678

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa chuỗi nặng của Fab PB009-01

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(678)

<400> 1

gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc ttc aac atc cgg gac acc 96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr

20 25 30

tac atg cac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga ctg gaa tgg gtg 144

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

gcc aga atc gac ccc gcc aac ggc aac agc aga tac gtg ccc aag ttc 192

Ala Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Val Pro Lys Phe

50 55 60

cag ggc cgg ttc acc atc agc gcc gac acc agc aga aac acc gcc tac 240

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Arg Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgt 288

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

85	90	95	
gcc ccc ttc ggc tac tac gtg tcc gac tac gcc atg gcc tat tgg ggc			336
Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly			
100	105	110	
cag ggc acc ctc gtg aca gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg			384
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
115	120	125	
gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg			432
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
130	135	140	
gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg			480
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct			528
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
165	170	175	
gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc gtg			576
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
180	185	190	
ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac			624
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			

195 200 205

aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt 672

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

gac tga 678

Asp

225

<210> 2

<211> 225

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<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 Arg Asp Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Val Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Arg 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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115

120

125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130

135

140

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp

225

<210> 3

<211> 657

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa chuỗi nhẹ PB009-01

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(657)

<400> 3

gac atc cag ctg acc cag agc cct agc agc ctg tct gcc agc gtg ggc 48

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtg acc atc acc tgt aga gcc ggc gag agc gtg gac atc ttc 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20 25 30

ggc gtg gga ttt ctg cac tgg tat cag cag aag ccc gcc aag gcc ccc 144

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

aag ctg ctg atc tac aga gcc agc aac ctg gaa agc ggc atc ccc agc 192

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser

50 55 60

aga ttc agc ggc agc ggc tcc aga acc gac ttc acc ctg acc atc agc 240

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 agc ctg cag ccc gag gac ttc gcc acc tac tac tgc cag cag acc aac 288
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
 85 90 95
 gag gac ccc tac acc ttt ggc cag ggc acc aag gtg gaa atc aag cgt 336
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 384
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 432
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 480
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 528
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 tac agc ctg agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 576

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180

185

190

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 624

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195

200

205

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 657

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Asp Ile Gln Leu 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 Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20

25

30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35

40

45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn

85

90

95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115

120

125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130

135

140

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 669

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa chuỗi nặng của Fab P10-1

<400> 5

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg	60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccaggct	120
cctggacagg gactggaatg gatgggagcag aaccaccctg gcagcggcat catctaccac	180
aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac	240
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc	300
ggcaccagag gctttgccta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcgggtctt ccccttgcca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca	420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	540
tactccctta gtagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaattc	660
tgtgactga	669

<210> 6

<211> 222

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh chuỗi nặng của Fab P10-1

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210

215

220

<210> 7

<211> 669

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa mảnh chuỗi nặng của Fab P10-2

<400> 7

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccaggct 120

cctggacagg gactggaatg gatgggagcag aaccaccctg gcagcggcat catctaccac 180

aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc 300

ggcaccagag gctttgacta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcgggtctt ccccttgga ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctta gtagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaattc 660
 tgtgactga 669

<210> 8

<211> 222

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh chuỗi nặng của Fab P10-2

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210

215

220

<210> 9

<211> 660

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể

<400> 9

gacgtcgtga tgaccagac ccctctgagc ctgagcgtga cacctggaca gcctgccagc	60
atcagctgca gatccagcca gagcatcgtg cacagcaacg gcaacaccta cctggaatgg	120
tatctgcaga agcccgcca gagccccag ctgctgatct acaggggtgc caaccggttc	180
agcggcgtgc ccgacagatt ttctggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc	240
tcccggttg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgtt ttcaaggcag ccacggcccc	300
tggacctttg gccagggaac aaagctggaa atcaagcgta cgtgggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa	480
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg	540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa	600
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag	660

<210> 10

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể

<400> 10

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85

90

95

Ser His Gly Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115

120

125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130

135

140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145

150

155

160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165

170

175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180

185

190

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

195

200

205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 11

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng Fab P10-1

<400> 11

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccaggct 120

cctggacagg gactggaatg gatgggagag aaccaccctg gcagcgcat catctaccac 180

aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc 300

ggcaccagag gctttgccta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của Fab P10-1

<400> 12

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20				25					30			

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

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 13

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của Fab P10-2

<400> 13

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccagggt 120
 cctggacagg gactggaatg gatgggagcag aaccaccctg gcagcggcat catctaccac 180
 aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc 300
 ggcaccagag gctttgacta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của Fab P10-2

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 15

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể

<400> 15

gacgtcgtga tgaccagac ccctctgagc ctgagcgtga cacctggaca gcctgccagc 60

atcagctgca gatccagcca gagcatcgtg cacagcaacg gcaacaccta cctggaatgg 120

tatctgcaga agcccgcca gagccccag ctgctgatct acaggggtgc caaccgggtc 180

agcggcgtgc ccgacagatt ttctggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240

tcccggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgtt ttcaaggcag ccacggcccc 300

tggacctttg gccagggaac aaagctggaa atcaagcgt 339

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể

<400> 16

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Gly Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu của chuỗi nặng

<400> 17

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1

5

10

15

Val His Ser

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu của chuỗi nhẹ

<400> 18

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys

20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự lặp Tandem của miền ngoại bào của MUC1

<400> 19

His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr

1 5 10 15

Ala Pro Pro Ala

20