



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120051461 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 27

(21) 申请号 202380073140.9

(22) 申请日 2023.08.21

(30) 优先权数据

63/373,183 2022.08.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/072585 2023.08.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/044549 EN 2024.02.29

(71) 申请人 雅博得乐医疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 麦可·J·雅伯瑞

亚当·丹尼尔·乔祺

亚历山大·罗伦斯·曼德尔

拉杰·所罗门·维斯渥

道格拉斯·布鲁斯·麦凯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 韦昌金 武晶晶

(51) Int.Cl.

C07D 257/02 (2006.01)

A61K 49/16 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07F 9/6524 (2006.01)

C07K 5/103 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

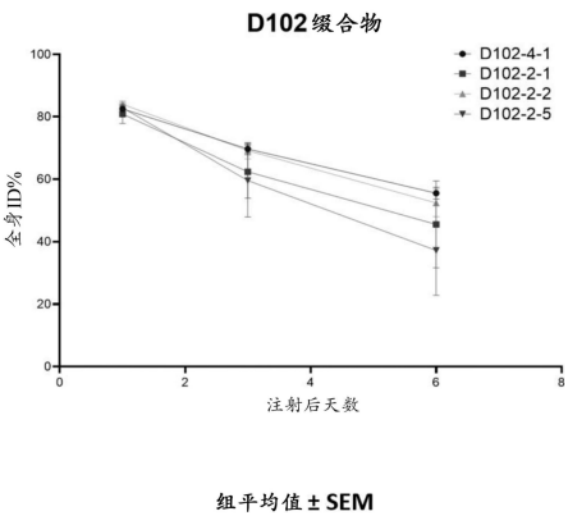
权利要求书27页 说明书197页 附图31页

(54) 发明名称

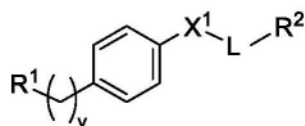
VHH抗体缀合物

(57) 摘要

本文描述了免疫缀合物,其包含:a) 抗原结合区;b) 免疫球蛋白重链恒定区;和c) 放射性同位素螯合剂;其中所述免疫缀合物的分子量在60与110kDa之间。所述免疫缀合物可以用于递送用以治疗肿瘤或癌症的 α 和 β 发射体。



1. 一种式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐:



式(I)

其中:

R^1 是整合部分或其放射性核素复合物;

X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、 $-($ 未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基 $)-X^2-$ 、 $-($ 未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基 $)-X^2-$ 、 $-($ 未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基 $)-X^2-$ 或 $-(C_4-C_{20}$ 聚乙二醇 $)-X^2-$;

X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代,并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

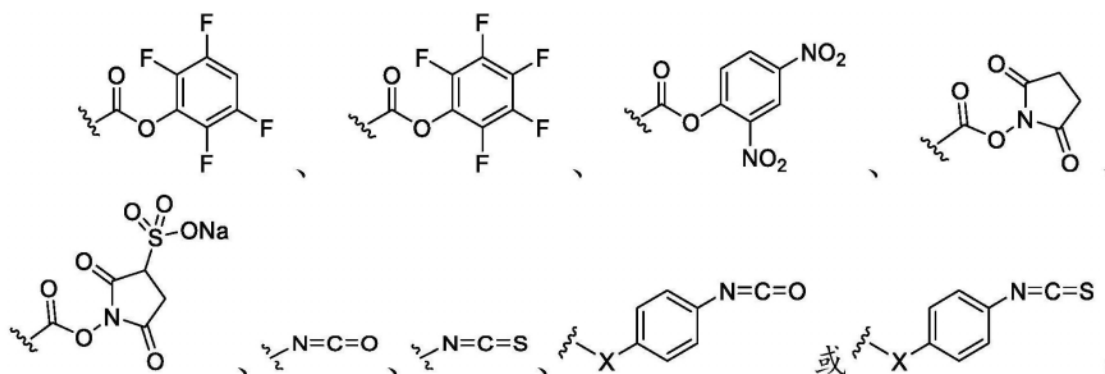
L 是任选的接头;

R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺 $(-NH_2)$ 或硫醇 $(-SH)$ 反应的部分;并且

v 是 1、2、3 或 4。

2. 如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中: R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的胺 $(-NH_2)$ 反应的部分并且包括四氟苯酯、五氟苯酯、二硝基苯酯、琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺酯或异硫氰酸酯。

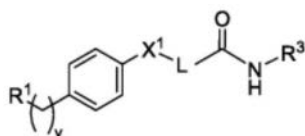
3. 如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中: R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的胺 $(-NH_2)$ 反应的部分并且包括:



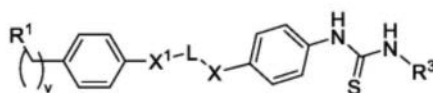
X 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$; 并且

每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基。

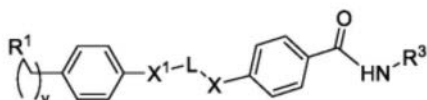
4. 一种式 (II)、式 (III) 或式 (IV) 的化合物或其药学上可接受的盐:



式 (II)



式 (III)



式 (IV)

其中:

R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;

X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、 $-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基) $-X^2-$ 、 $-$ (未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基) $-X^2-$ 、 $-$ (未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基) $-X^2-$ 或 $-$ (C_4-C_{20} 聚乙二醇) $-X^2-$;

X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸, 其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代, 并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

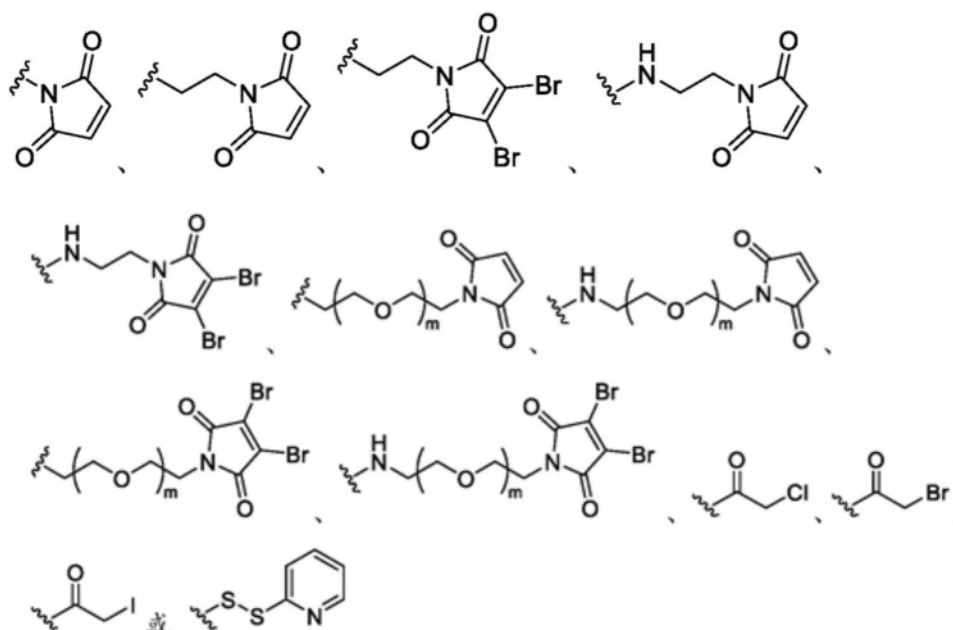
L 是任选的接头;

$-NH-R^3$ 是肿瘤靶向部分; 并且

v 是 1、2、3 或 4。

5. 如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中: R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇 ($-SH$) 反应的部分并且包括马来酰亚胺基团、卤代乙酰胺基团、卤代乙酰基基团、卤代乙酸基团、吡啶基硫代基团、乙烯基羰基基团、氮丙啶基基团、二硫化物基团、乙炔基团、羟基琥珀酰亚胺基团或硫醇基团。

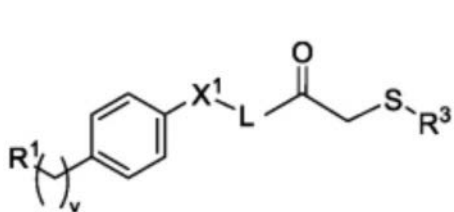
6. 如权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中: R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇 ($-SH$) 反应的部分并且包括



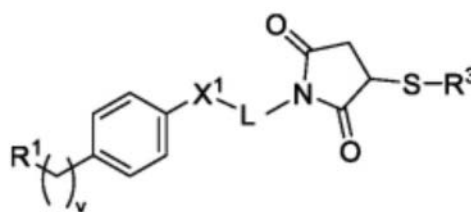
:

m 是0、1、2、3、4或5。

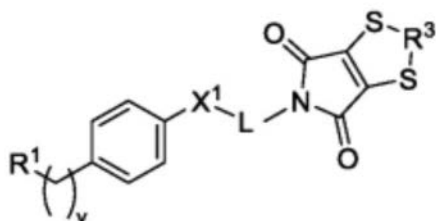
7. 一种式(V)、式(VI)、式(VII)或式(VIII)的化合物或其药学上可接受的盐:



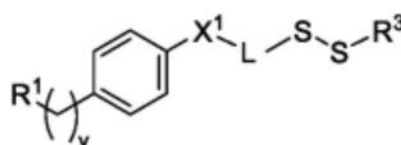
式 (V)



式(VI)



式(VII)



式(VIII)

其中:

R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;

X¹是-O-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-NR^a-、-C(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-OC(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)NR^a-、-NR^aC(=S)NR^a-、-NR^aC(=O)O-、-(未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-X²-、-(未取代的或经取代的C₂-C₁₀亚烯基)-X²-、-(未取代的或经取代的C₉-C₁₀亚炔基)-X²-或-(C₄-C₂₀聚乙二醇)-X²-;

X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

每个R^a独立地选自氢和C₁-C₄烷基;

X⁴是-NR^a-、-NR^aS(=O)₂-、-NR^aS(=O)₂NR^a-或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被R⁵或-C(=O)R⁵取代,并且其中任何氨基酸的

任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

L是任选的接头;

$-S-R^3$ 是肿瘤靶向部分;并且

v是1、2、3或4。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述肿瘤靶向部分 R^3 是包含抗原结合区和免疫球蛋白重链恒定区的多肽,其中所述多肽的分子量在60与110kDa之间。

9. 如权利要求8所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述抗原结合区包含scFv多肽或VHH多肽。

10. 如权利要求8或权利要求9所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白的CH2结构域、免疫球蛋白的CH3结构域或免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。

11. 如权利要求8-10中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述免疫球蛋白重链恒定区是IgA、IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

12. 如权利要求8-11中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述抗原结合区是人源化的,所述免疫球蛋白重链恒定区是人免疫球蛋白重链恒定区,或两者兼备。

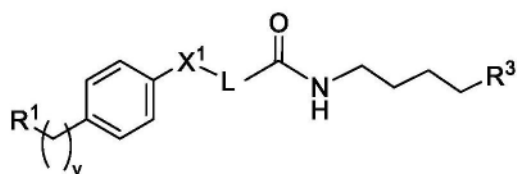
13. 如权利要求8-12中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能或改变所述免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变;或所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能并改变所述免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变。

14. 如权利要求8-13中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变;或所述免疫球蛋白重链恒定区包含改变所述免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变;或两者兼备。

15. 如权利要求13或权利要求14所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:降低所述免疫球蛋白重链恒定区的所述效应子功能的所述对一个或多个氨基酸残基的改变是降低补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞-细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用ADCP或其组合的改变。

16. 如权利要求8-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中: R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸的胺($-NH_2$)反应的部分。

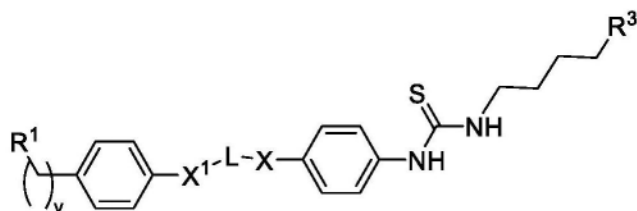
17. 如权利要求4或8-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物式(II)具有式(IIa)或其药学上可接受的盐的结构:



式(IIa)

其中: $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链。

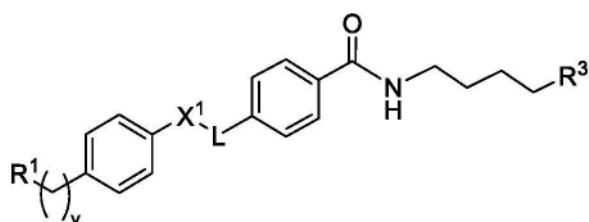
18. 如权利要求4或8-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物式(III)具有式(IIIa)或其药学上可接受的盐的结构:



式(IIIa)

其中: $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链。

19. 如权利要求4或8-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物式(II)具有式(IIa)或其药学上可接受的盐的结构:

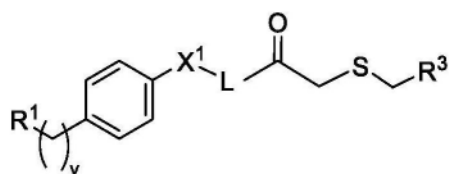


式(IVa)

其中: $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链。

20. 如权利要求8-16中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中: R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸的硫醇 ($-\text{SH}$) 反应的部分。

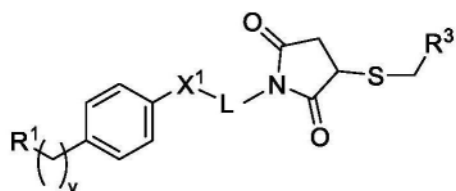
21. 如权利要求7-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物式(V)具有式(Va)或其药学上可接受的盐的结构:



式(Va)

其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

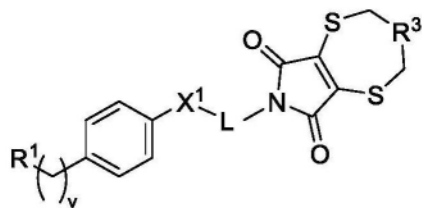
22. 如权利要求7-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物式(VI)具有式(VIa)或其药学上可接受的盐的结构:



式(VIa)

其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

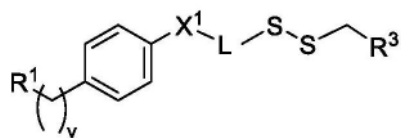
23. 如权利要求7-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物式(VII)具有式(VIIa)或其药学上可接受的盐的结构:



式(VIIa)

其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

24. 如权利要求7-15中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物式(VIII)具有式(VIIIa)或其药学上可接受的盐的结构:



式(VIIIa)

其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中:

R^1 是选自由以下组成的列表的螯合部分: DOTA、D03A、D03Apic、DOTAGA、DOTAGA酸酐、Py4Pa、Py4Pa-NCS、Crown、Macropa、Macropa-NCS、HEHA、CHXoctapa、Bispa和Noneunpa或其放射性核素复合物。

26. 如权利要求1-24中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中:

R^1 是选自由以下组成的列表的螯合部分: DOTMA、DOTPA、D03AM-乙酸、D03Apic、DOTP、DOTMP、DOTA-4AMP、CB-TE2A、NOTA、NOTP、TETPA、TETA、PEPA、H4Octapa、H2Dedpa、D02P、EDTA、DTPA-BMA、3,2,3-LI (HOP0)、3,2-HOP0、Neunpa、Neunpa-NCS、Octapa、PyPa、卟啉和去铁胺或其放射性核素复合物。

27. 如权利要求1-24中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 R^1 是选自以下的螯合部分:

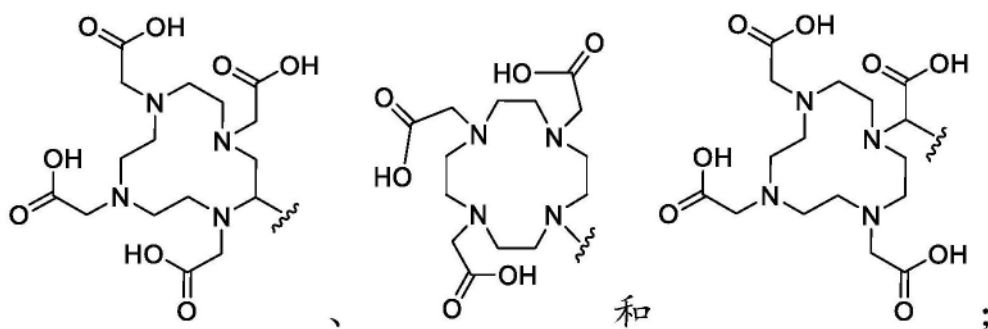
1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA);

1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸 (D03A);

1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,7-二乙酸 (D02A);

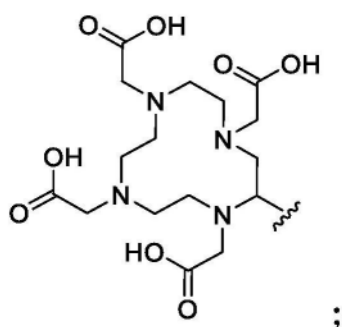
$\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTMA);

- 1,4,7,10-四(氨基甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(DOTAM);
 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四丙酸(DOTPA);
 2,2',2''-(10-(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸;
 6,6'-(((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双(羧甲基)氮烷二基))-双(亚甲基))二皮考啉酸(H₄pypa);
 6,6',6'',6'''-(((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双(氮烷三基))四(亚甲基))-四皮考啉酸(H₄py4pa);
 10-((6-羧基吡啶-2-基)甲基)-1,4,7,10-四-氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸(D03Apic);
 3,6,9,12-四(羧甲基)-3,6,9,12-四氮杂十四烷二酸(TTHA);
 或其放射性核素复合物。
 28. 如权利要求1-24中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R¹是选自以下的螯合部分:



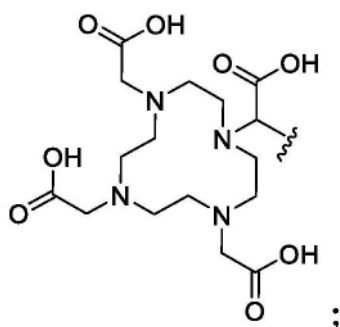
或其放射性核素复合物。

29. 如权利要求1-24中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:
 R¹是选自以下的螯合部分:



或其放射性核素复合物。

30. 如权利要求1-24中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中R¹是选自以下的螯合部分:



或其放射性核素复合物。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-(C_1-C_6$ 亚烷基) $-X^2-$ 或 $-(C_4-C_{20}$ 聚乙二醇) $-X^2-$;

X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代,并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代。

32. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

X^1 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 或 $-C(=O)NR^a-$ 。

33. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

X^1 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 或 $-C(=O)NR^a-$ 。

34. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

X^1 是 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 或 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 。

35. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

X^1 是 $-CH_2CH_2-$ 或 $-CH_2CH_2-X^2-$;

X^2 是 $-C(=O)X^4-$;

X^4 是 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_2CH_3)-$ 、 $-NHS(=O)_2-$ 、 $-N(CH_3)S(=O)_2-$ 、 $-N(CH_2CH_3)S(=O)_2-$ 、赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸-缬氨酸-赖氨酸、甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸、酪氨酸-精氨酸-缬氨酸、精氨酸-缬氨酸或其组合;其中氨基酸的任何游离胺($-NH_2$)任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代。

36. 如权利要求1-35中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L 是 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 、 $-L^5-$ 、 $-L^1-L^2-L^3-L^4-L^5-$ 或其组合;

L^1 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、未取代的或经取代的 C_2-C_{20} 亚烯基、未取代的或经取代的 C_2-C_{20} 亚炔基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、 $-(X^3CH_2CH_2)_t-$ 、未取代的或经取代的环亚烷基、未取代的或经取代的杂环亚烷基、未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

每个 X^3 独立地选自 O 和 NR^4 ;

每个t独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；

L^2 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p$ ；

每个 R^4 独立地选自氢和 C_1-C_6 烷基；

每个m独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；

每个p独立地是0、1或2；

L^3 是不存在的，或是一个或多个独立选择的选自以下的基团：天然或非天然氨基酸以及任选的氨基（未取代的或经取代的苄基）氨基甲酸酯；其中氨基酸的任何游离胺（ $-NH_2$ ）任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代，其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代，并且其中经取代的苄基被1或2个选自卤素、 $-OH$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 、 $-NHC(=O)R^5$ 和经取代的 C_1-C_6 烷基的基团取代，其中所述经取代的 C_1-C_6 烷基被 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 和 $-NHC(=O)R^5$ 取代；

L^4 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-(X^3CH_2CH_2)_n-$ ；

每个n独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；

每个q独立地是0、1或2；

L^5 是不存在的、 $-C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2)_n-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)-(X^3CH_2CH_2)_n-$ 或 $-(X^3CH_2CH_2)_n-$ ；

每个n独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；

每个q独立地是0、1或2；

每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基；

每个 R^b 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基；

其中杂亚烷基是其中一个碳原子被 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-S(=O)(=NR^5)-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-P(=O)OR^b-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=N-CN)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=N-R^5)NR^a-$ 或 $-NR^aC(=O)O-$ 替代的亚烷基；

其中当 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 和 $-L^5-$ 中的任一个被取代时，则 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 和 $-L^5-$ 被1、2、3或4个选自卤素、 $-OH$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 、 $-NHC(=O)R^5$ 和经取代的 C_1-C_6 烷基的基团取代，其中所述经取代的 C_1-C_6 烷基被 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 和 $-NHC(=O)R^5$ 取代；

每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基。

37. 如权利要求36所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中：杂亚烷基是其中一个碳原子被 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-S(=O)(=NR^5)-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-P(=O)$

OH-、-NHC(=O)-、-C(=O)NH-、-OC(=O)NH-、-NHC(=N-CN)NH-或-NHC(=N-R⁵)NH-替代的亚烷基。

38. 如权利要求36所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:杂亚烷基是其中一个碳原子被-S(=O)(=NH)-、-S(=O)(=NR⁵)-、-P(=O)OH-、-NHC(=N-CN)NH-或-NHC(=N-R⁵)NH-替代的亚烷基。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L¹是未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₂₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的C₃-C₈环亚烷基、未取代的或经取代的单环C₃-C₈杂环亚烷基、未取代的或经取代的亚苯基、未取代的或经取代的单环杂亚芳基。

40. 如权利要求36-38中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L¹是未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₁₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基。

41. 如权利要求36-40中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L²是不存在的、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基)-、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基)-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-;

每个m独立地是1、2、3、4、5或6;

每个p独立地是1或2。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L³是不存在的,或是一个或多个独立选择的选自以下的基团:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸和氨基(未取代的或经取代的苄基)氨基甲酸酯;其中氨基酸的任何游离胺任选地被R⁵或-C(=O)(R⁵)取代,并且氨基酸的任何游离羧酸任选地被-C(=O)NH(R⁵)替代。

43. 如权利要求1-41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L³是赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸-缬氨酸-赖氨酸、甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸、酪氨酸-精氨酸-缬氨酸、精氨酸-缬氨酸、缬氨酸-瓜氨酸-(对氨基苄基氨基甲酸酯)或其组合;

其中氨基酸的任何游离胺(-NH₂)任选地被-C(=O)(未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基)或-C(=O)-C₄-C₂₀聚乙二醇取代;

其中任何氨基酸的任何游离羧酸(-CO₂H)任选地被-C(=O)NH-(2,4,6-三甲基-3-溴苯基)-、-C(=O)NH-(未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基)或-C(=O)NH-(C₄-C₂₀聚乙二醇)替代。

44. 如权利要求1-43中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L⁴是不存在的、-C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;

每个n独立地是1、2、3、4、5或6;

每个q独立地是1或2。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L^5 是不存在的、 $-C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2)_n-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)-(OCH_2CH_2)_n-$ 或 $-(OCH_2CH_2)_n-$;

每个p独立地是0、1或2。

46. 如权利要求1-44中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L^5 是不存在的、 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$;每个q独立地是1或2。

47. 如权利要求36-38中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L^1 是未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基;

L^2 是不存在的、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$;

每个m独立地是1、2、3、4、5或6;

每个p独立地是1或2;

L^4 是不存在的、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基)-、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基)-、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$;

L^5 是 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$;

每个n独立地是1、2、3、4、5或6;

每个q独立地是1或2。

48. 如权利要求36-38中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L^1 是未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基;

L^2 是不存在的、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$;

每个m独立地是1、2、3、4、5或6;

每个p独立地是1或2;

L^4 是不存在的;

L^5 是不存在的、 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$;

每个n独立地是1、2、3、4、5或6;

每个q独立地是1或2。

49. 如权利要求36-38中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:

L^1 是未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基；

L^2 是不存在的、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基) -、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基) -、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ ；

每个 m 独立地是1、2、3、4、5或6；

每个 p 独立地是1或2；

L^3 是一个或多个独立选择的选自以下的基团：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸和氨基 (未取代的或经取代的苄基) 氨基甲酸酯；其中氨基酸的任何游离胺任选地被 R^5 或 $-C(=O)(R^5)$ 取代，并且氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH(R^5)$ 替代；

每个 R^5 独立地是未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇或未取代的或经取代的苯基，其中所述经取代的苯基被1、2、3、4或5个独立地选自F、Cl、Br、I、 $-CH_3$ 和 CF_3 的基团取代；

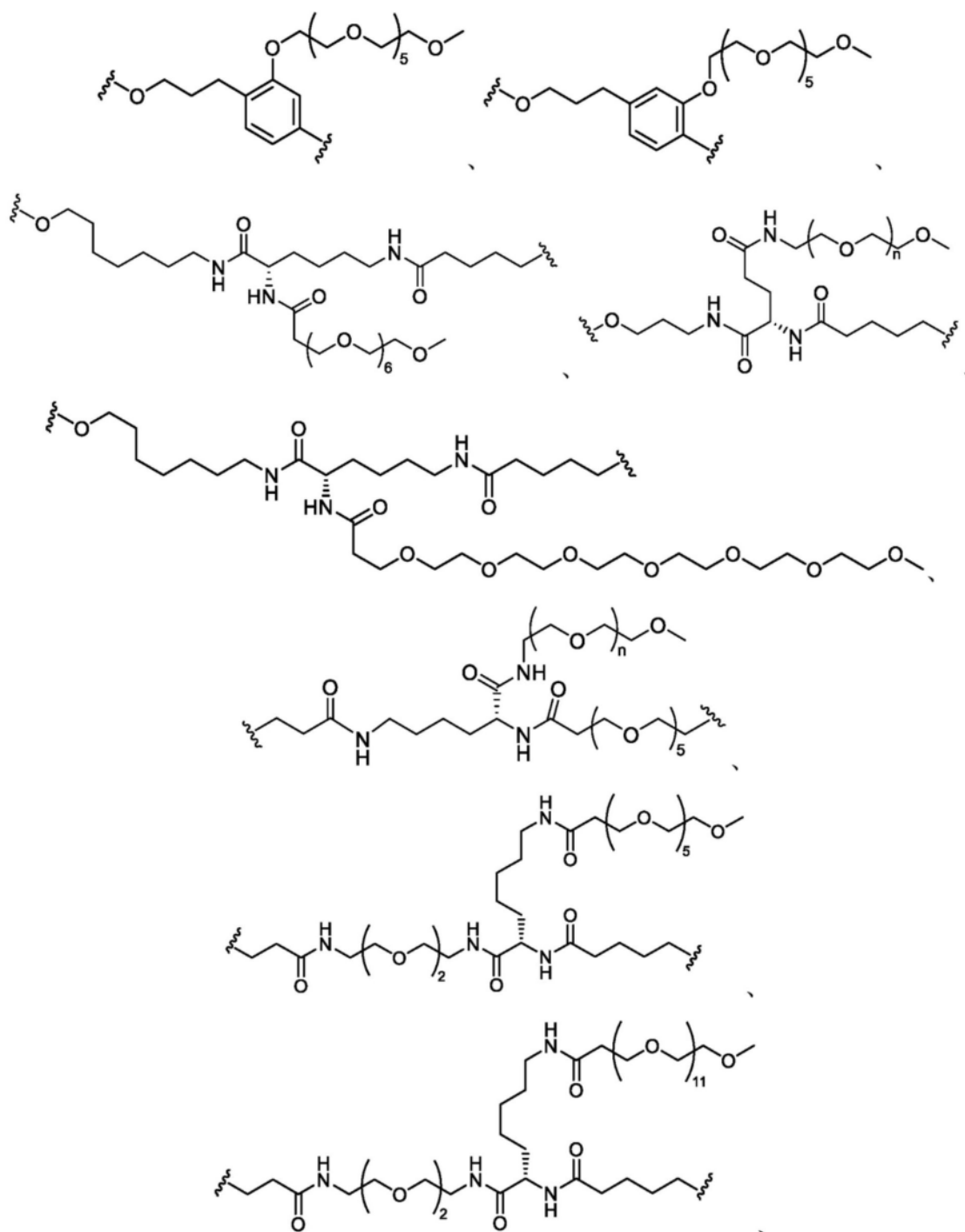
L^4 是不存在的；

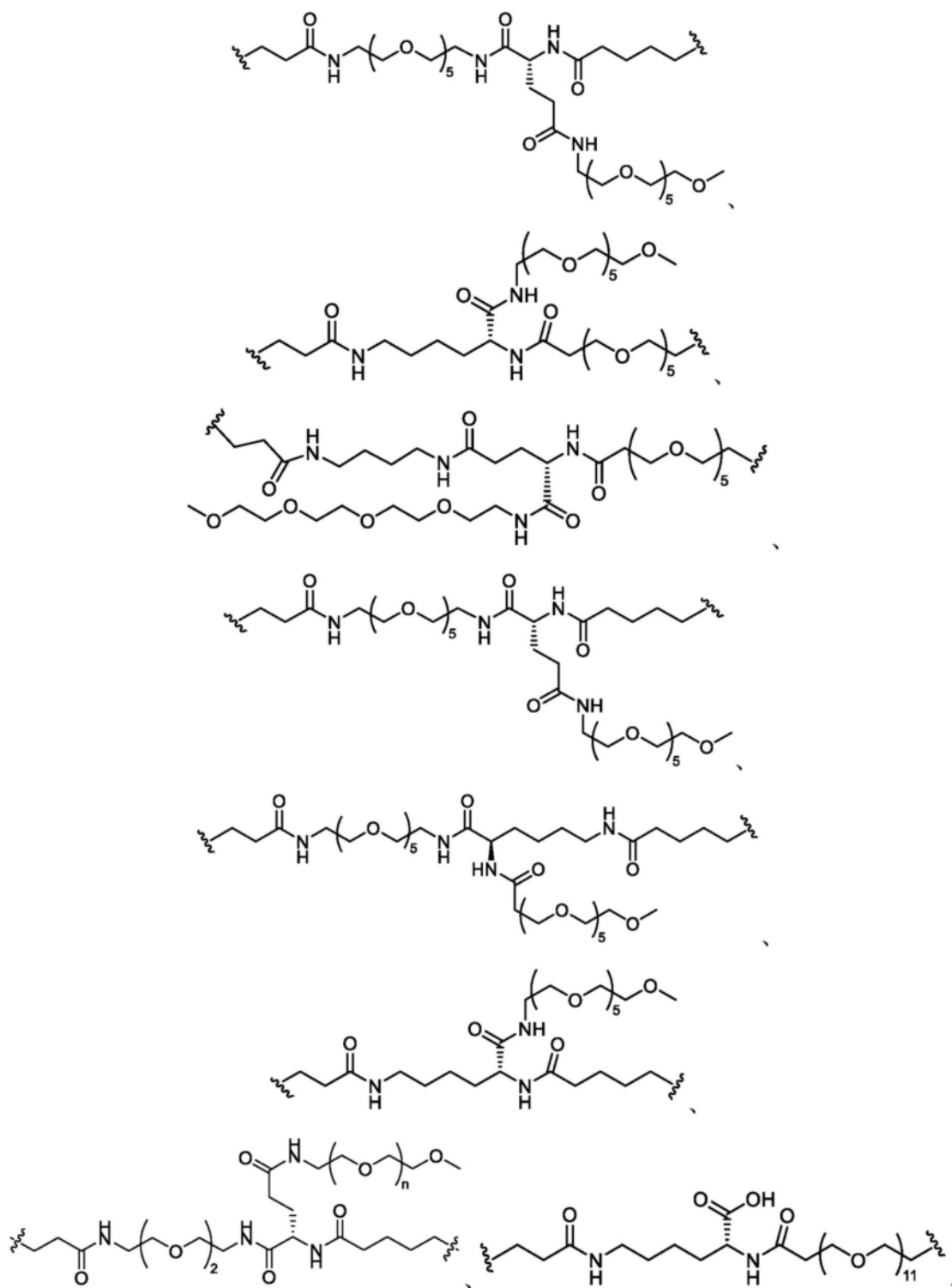
L^5 是 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ ；

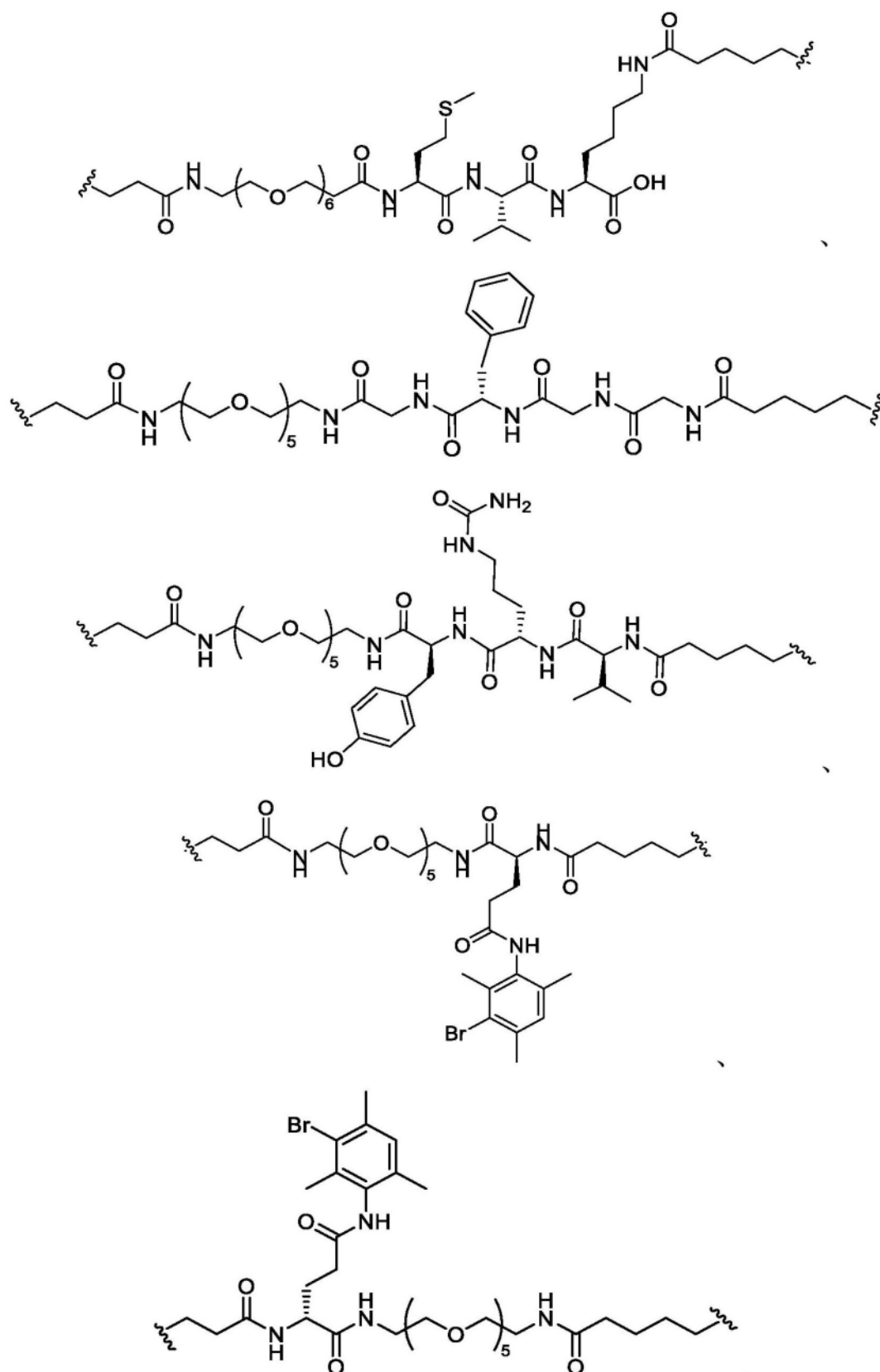
每个 n 独立地是1、2、3、4、5或6；

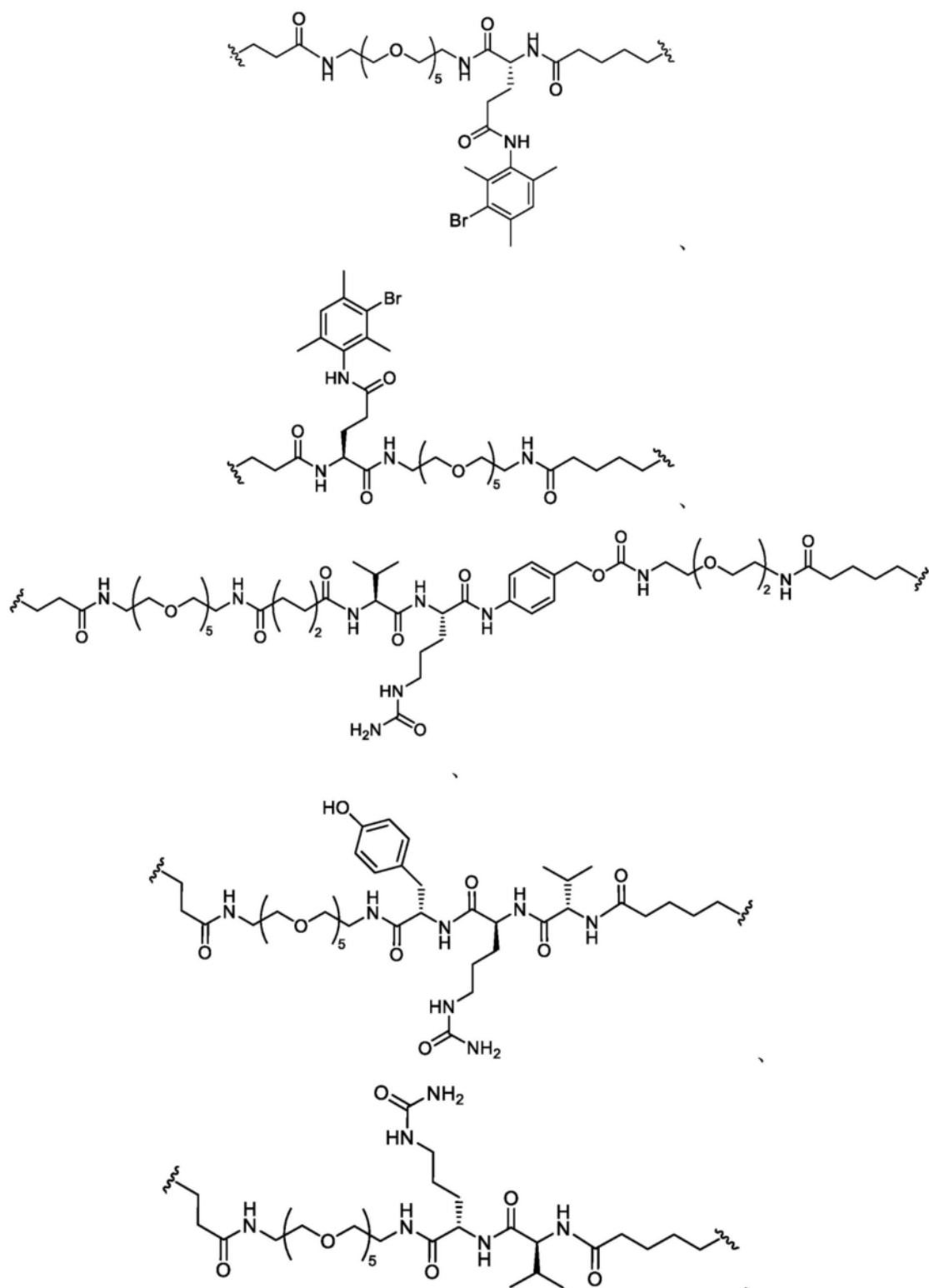
每个 q 独立地是1或2。

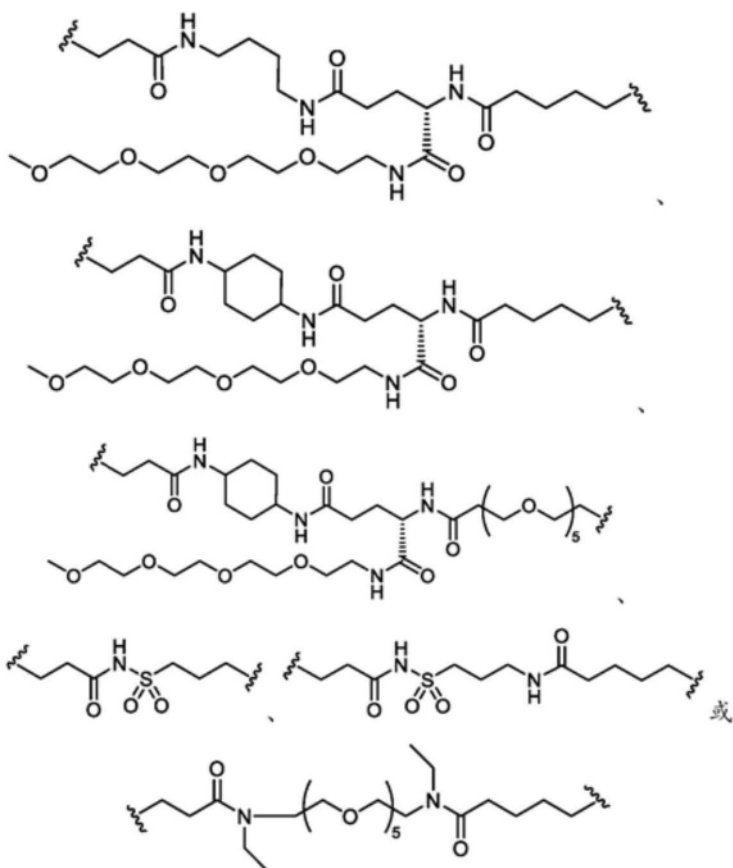
50. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中 $-X^1-L-$ 是：



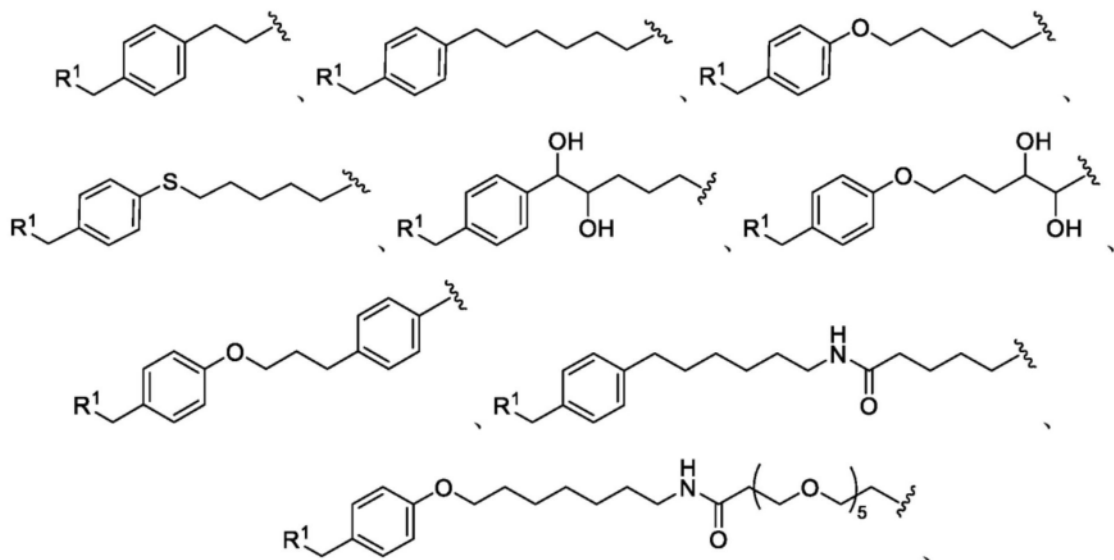
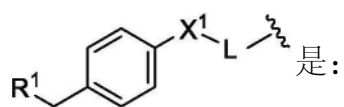


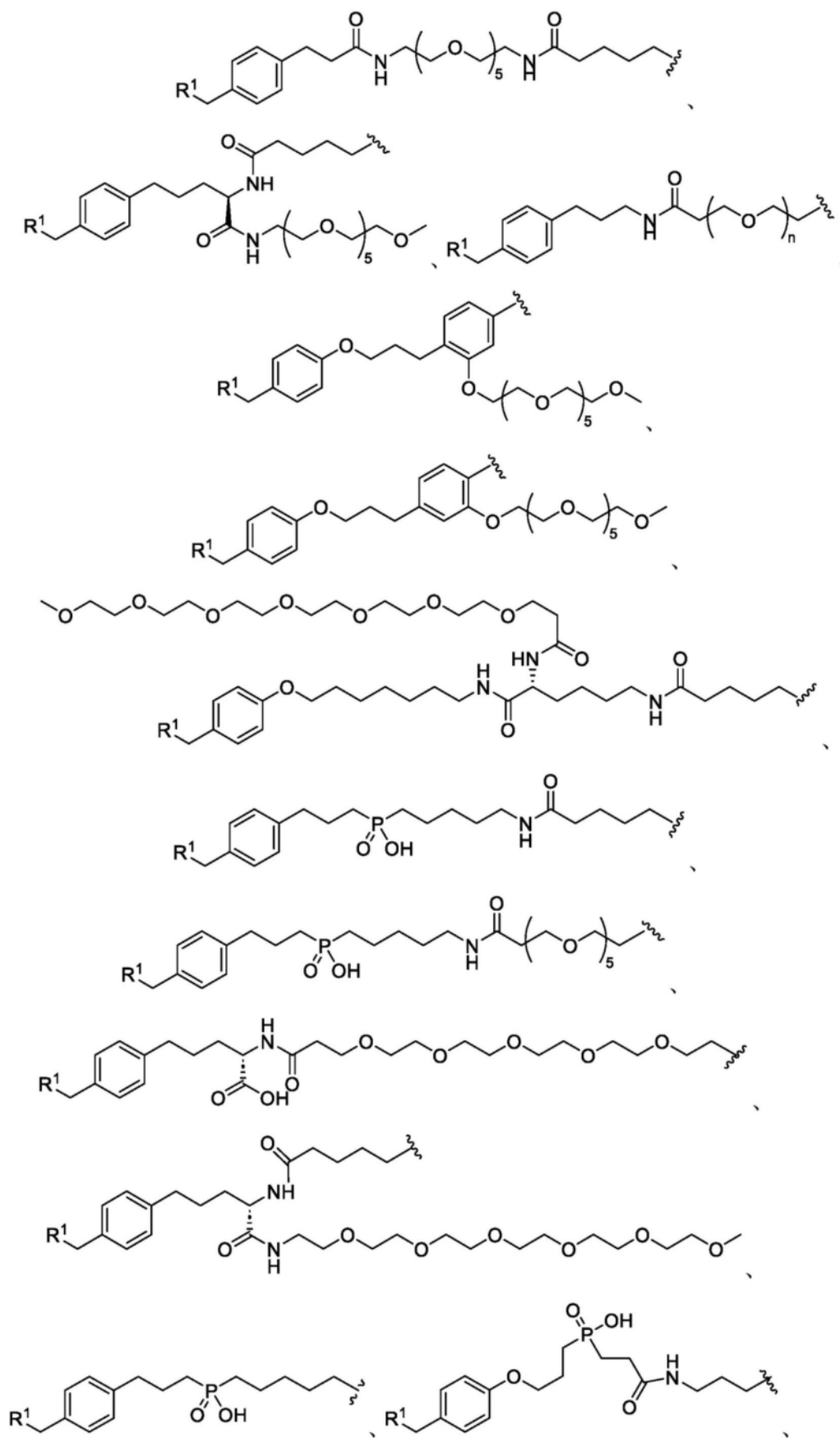


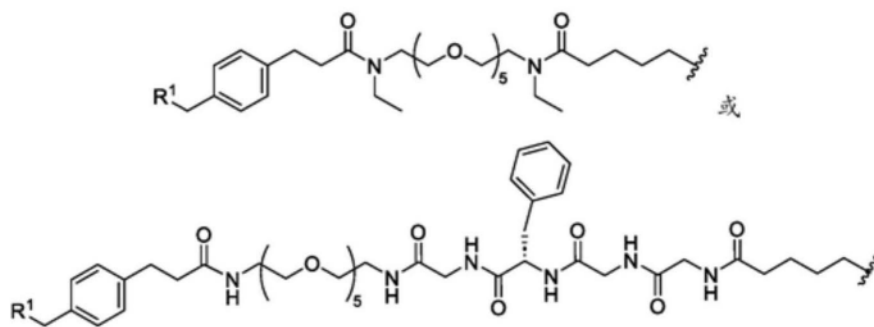




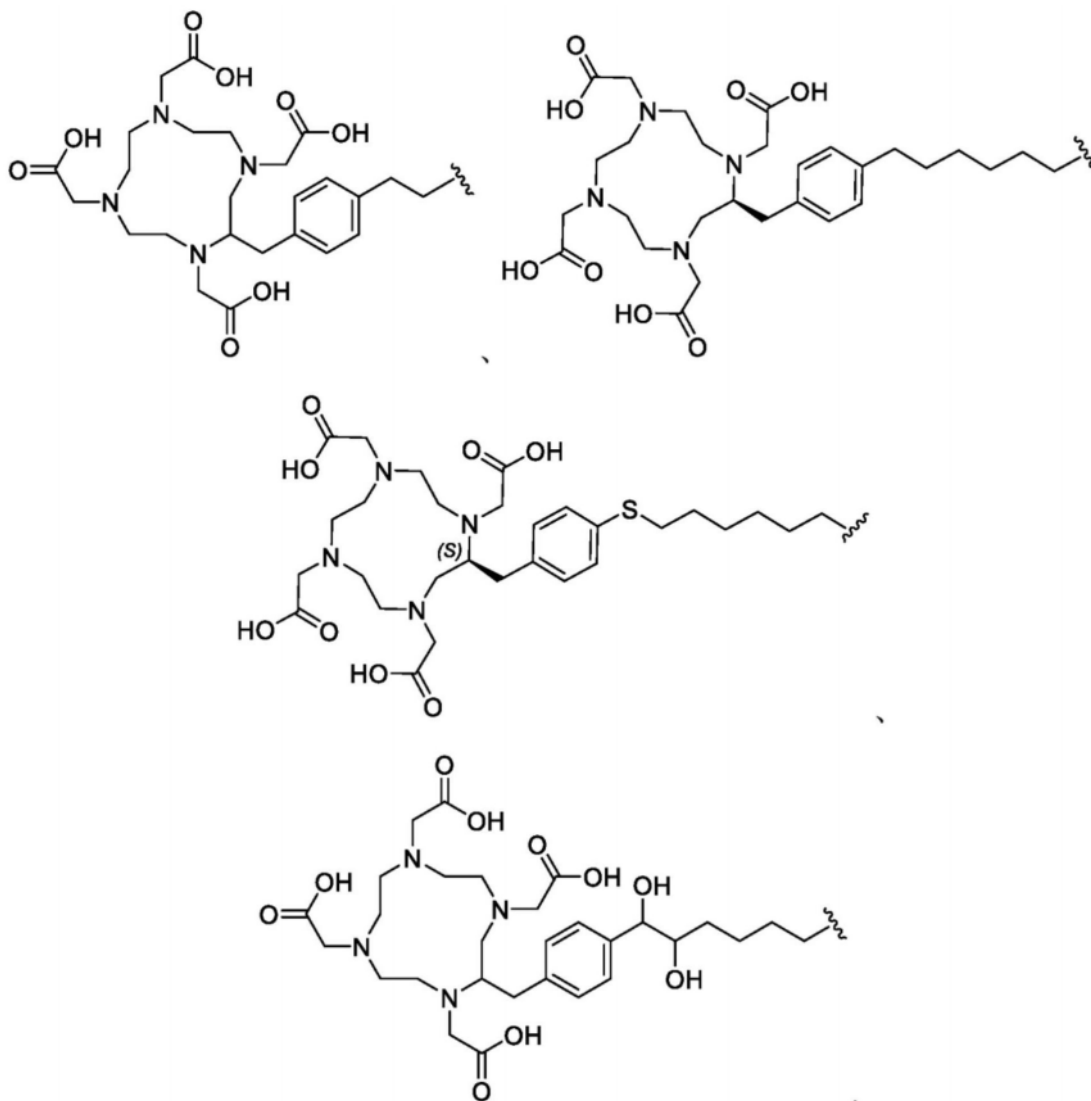
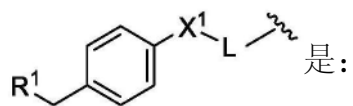
51. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中

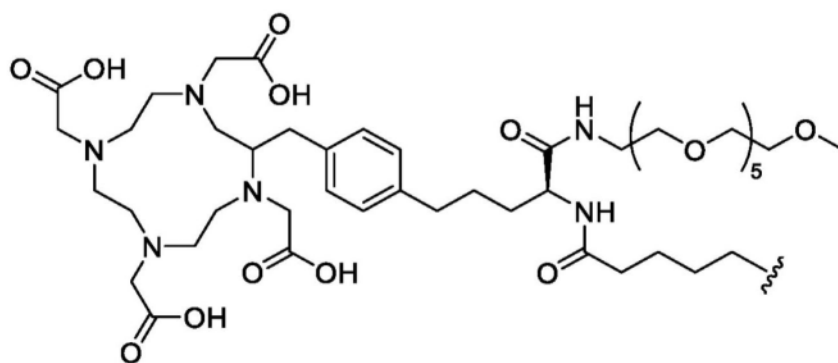
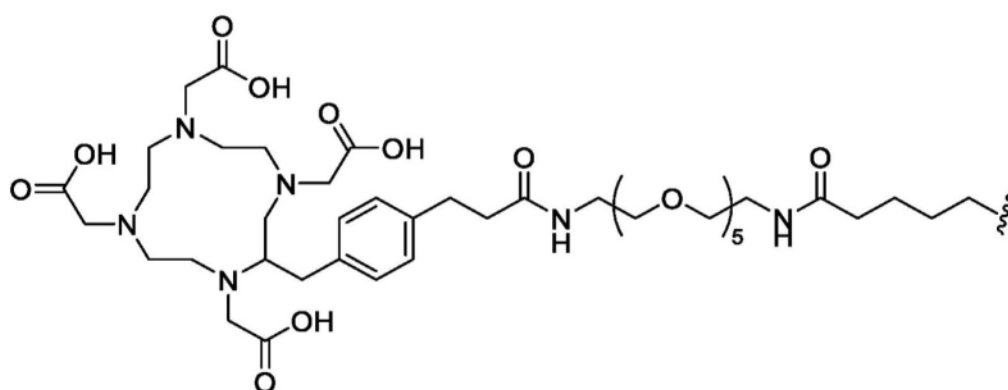
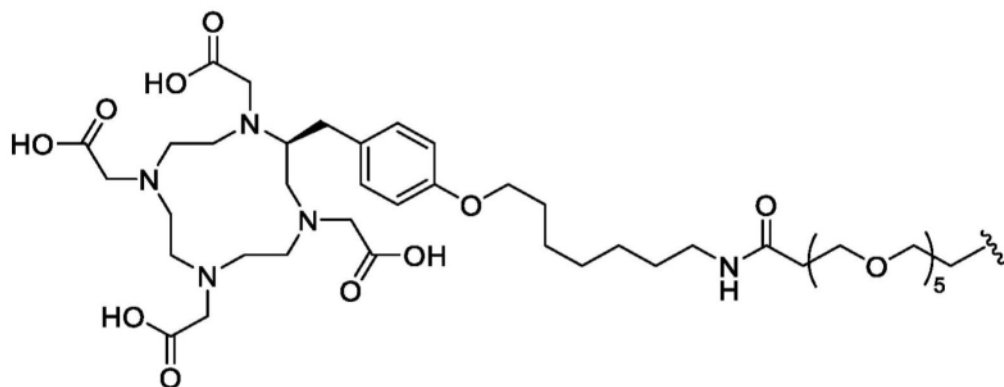
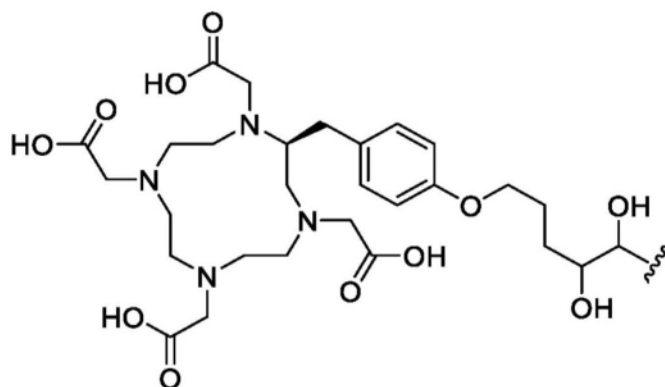


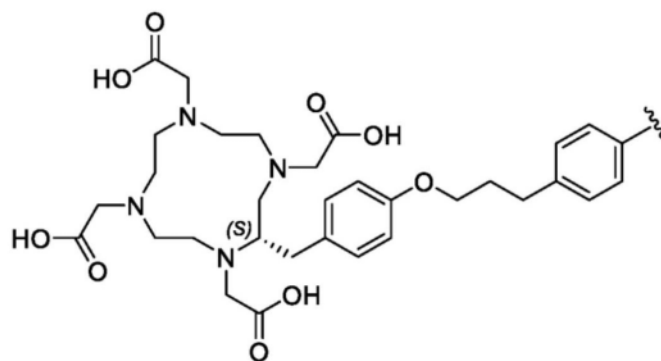
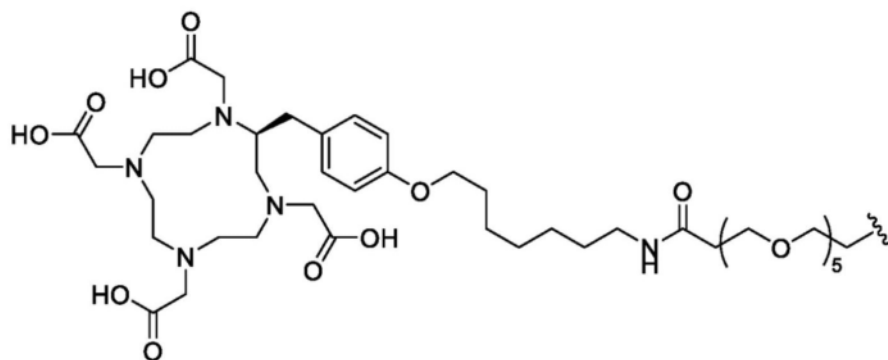
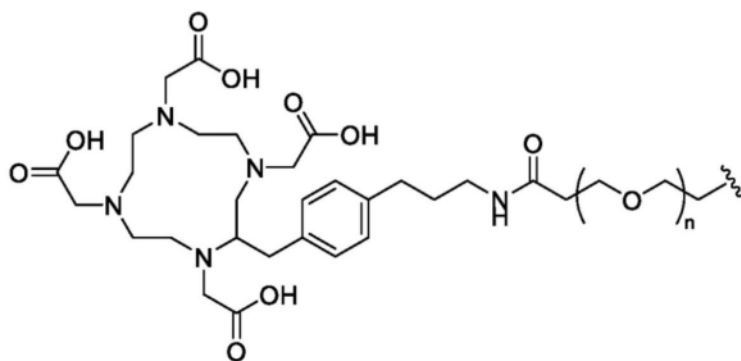
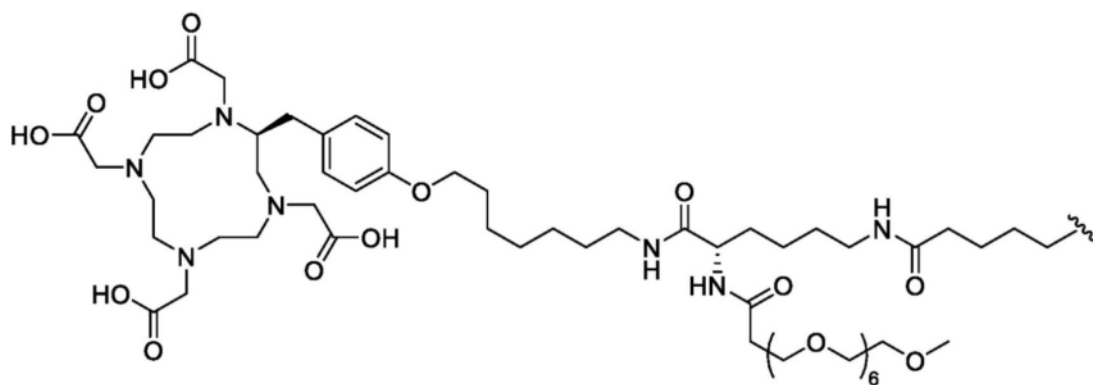


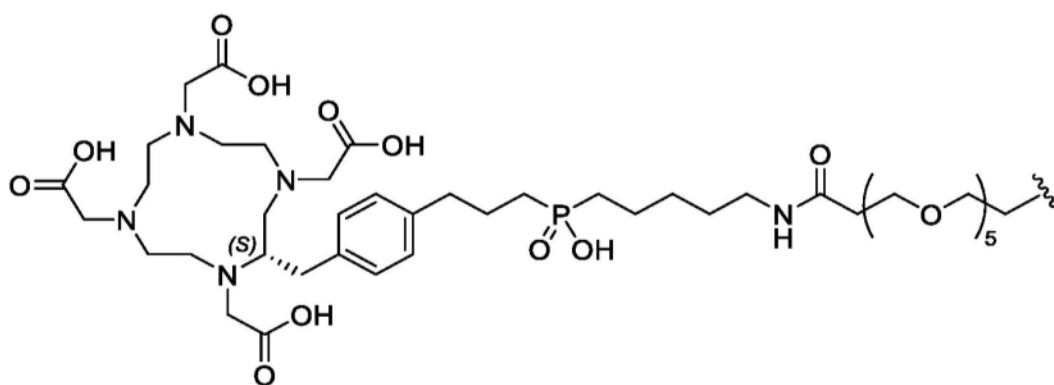
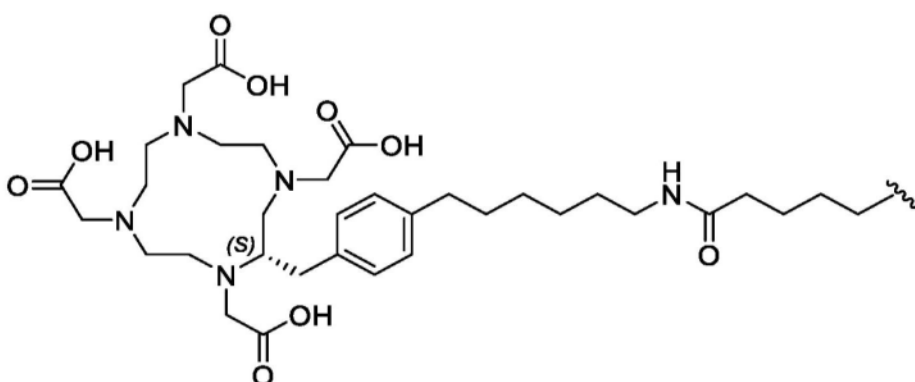
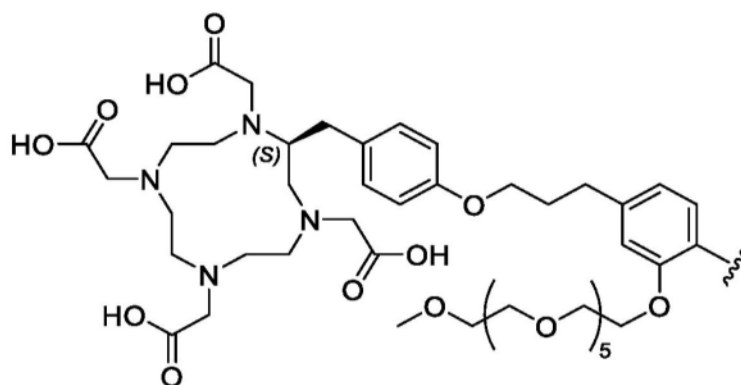
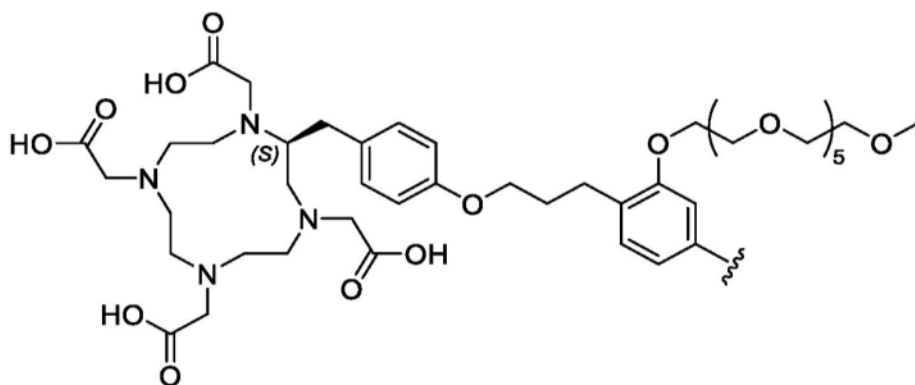


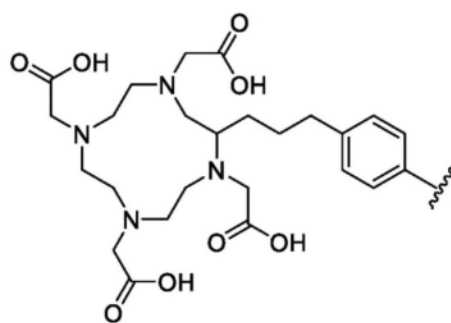
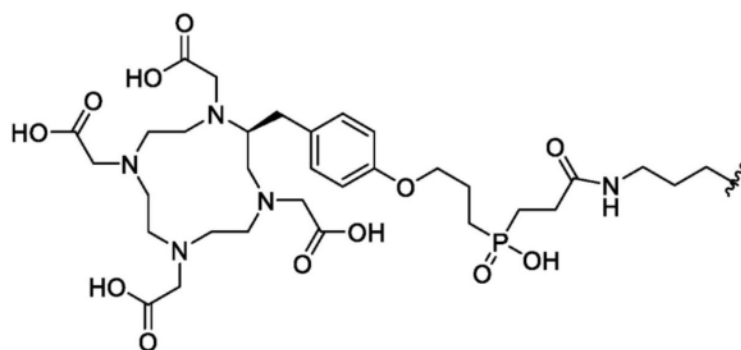
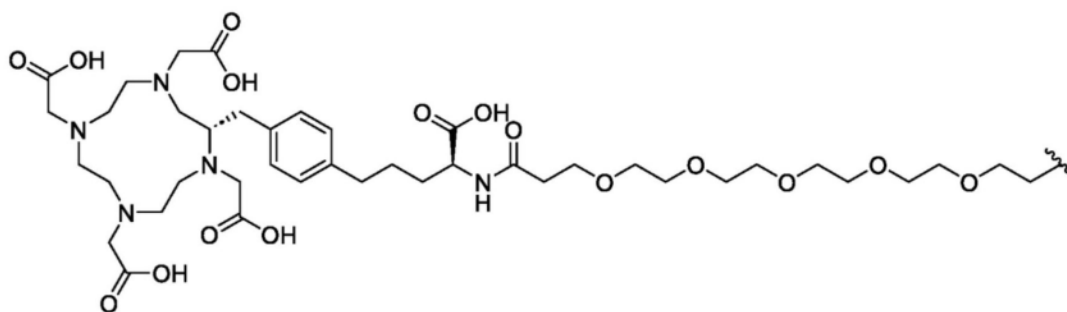
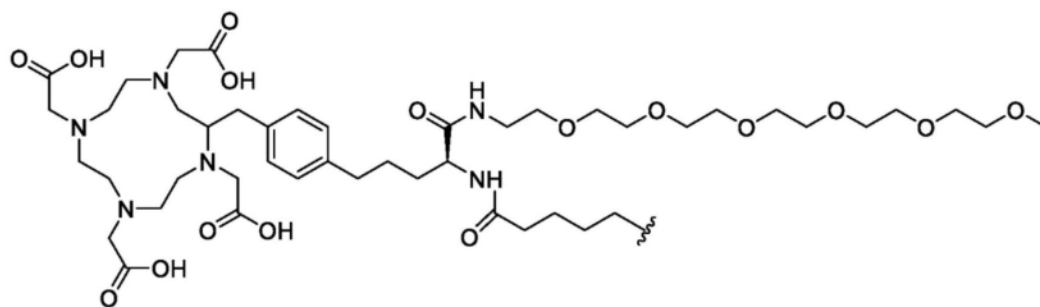
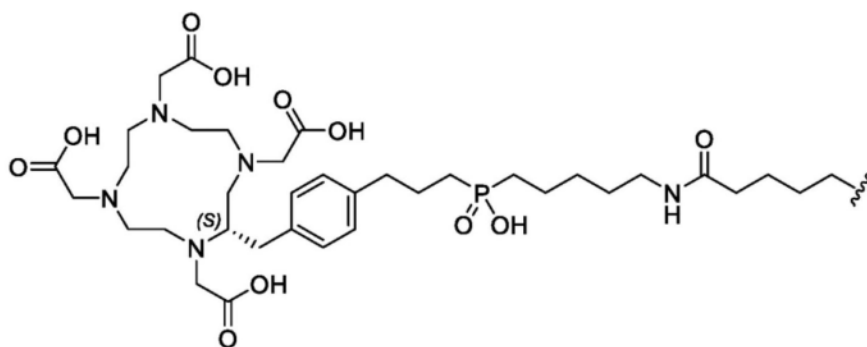
52. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中

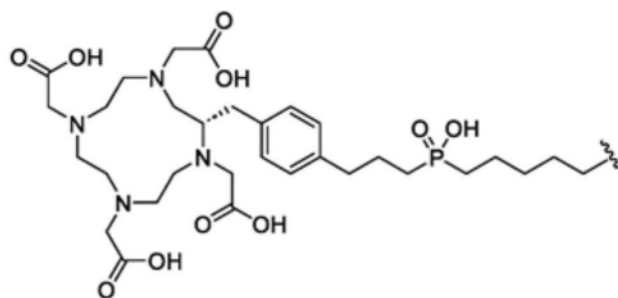
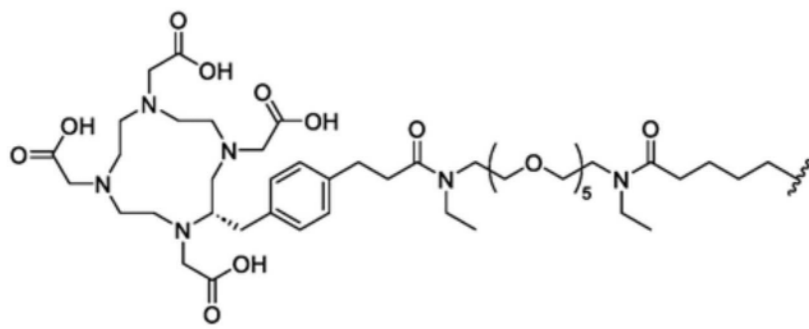
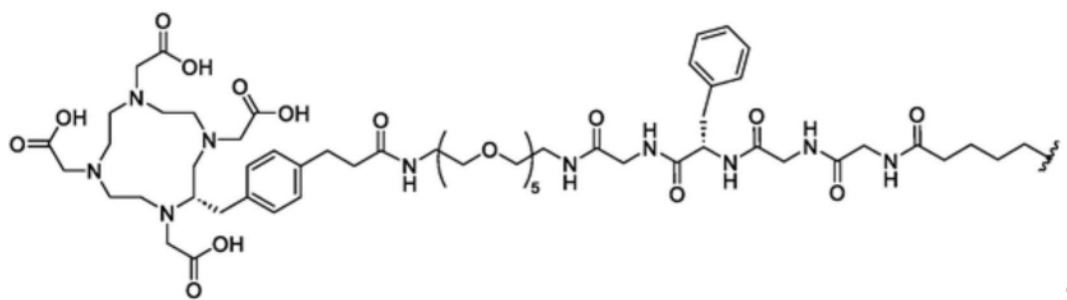












或其放射性核素复合物。

53. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中: 所述放射性核素是镧系元素或锕系元素。

54.如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素是铀、钍、镅、钴、铜、鎳、铊、金、银、汞、镓、铅、锡、锰、钙、铂、镉、锗、钇或铈。

55. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素是诊断性或治疗性放射性核素。

56. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素是俄歇电子发射放射性核素、 α 发射放射性核素、 β 发射放射性核素或 γ 发射放射性核素。

57.如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素为 α 发射放射性核素。

58. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素是俄歇电子发射放射性核素,其是111-铟(^{111}In)、67-镓(^{67}Ga)、68-镓(^{68}Ga)、99m-锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$)或195m-铂($^{195\text{m}}\text{Pt}$)。

59. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中: 所述放射性核素是 α 发射放射性核素, 其是225-锕(^{225}Ac)、213-铋(^{213}Bi)、223-镭(^{223}Ra)或212-铅

(^{212}Pb)。

60. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素是 β 发射放射性核素,其是90-钇(^{90}Y)、177-镥(^{177}Lu)、186-铼(^{186}Re)、188-铼(^{188}Re)、64-铜(^{64}Cu)、67-铜(^{67}Cu)、153-钐(^{153}Sm)、89-锶(^{89}Sr)、198-金(^{198}Au)、169-铒(^{169}Er)、165-镝(^{165}Dy)、99m-锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、89-锆(^{89}Zr)或52-锰(^{52}Mn)。

61. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素是 γ 发射放射性核素,其是60-钴(^{60}Co)、103-钯(^{103}Pd)、137-铯(^{137}Cs)、169-铪(^{169}Yb)、192-铱(^{192}Ir)或226-镭(^{226}Ra)。

62. 如权利要求1-61中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素适用于正电子发射断层摄影术(PET)分析、单光子发射计算机化断层摄影术(SPECT)或磁共振成像(MRI)。

63. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:所述放射性核素是225-锕(^{225}Ac)。

64. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-63中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

65. 如权利要求64所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于通过静脉内施用而施用于哺乳动物。

66. 一种治疗哺乳动物的肿瘤的方法,其包括向所述哺乳动物施用如权利要求1至63中任一项所述的化合物,从而治疗所述肿瘤。

67. 如权利要求66所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

68. 如权利要求66或67所述的方法,其中所述肿瘤是实体瘤。

69. 如权利要求66至68中任一项所述的方法,其中所述肿瘤包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌或神经内分泌癌。

70. 如权利要求66至69中任一项所述的方法,其包括向所述哺乳动物施用0.5 μCi 至30.0 μCi /千克。

71. 如权利要求66至69中任一项所述的方法,其包括向所述哺乳动物施用10mCi至75mCi/平方米体表面积。

72. 如权利要求66至71中任一项所述的方法,其中所述肿瘤表达由所述肿瘤靶向多肽 R^3 的所述抗原结合区特异性结合的抗原。

73. 一种将放射性核素靶向递送至哺乳动物中的肿瘤的方法,其包括向患有肿瘤的哺乳动物施用如权利要求1-63中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述肿瘤表达由所述肿瘤靶向多肽 R^3 的所述抗原结合区特异性结合的抗原。

74. 如权利要求73所述的方法,其中如权利要求1-63中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐包含诊断性或治疗性放射性核素。

75. 一种用于鉴定哺乳动物中患有肿瘤的组织或器官的方法,其包括:i)向所述哺乳动物施用如权利要求1-63中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,和ii)进行正电子发射断层摄影术(PET)分析、单光子发射计算机化断层摄影术(SPECT)或磁共振成像(MRI);其中所述肿瘤细胞表达由所述肿瘤靶向多肽 R^3 的所述抗原结合区特异性结合的抗原。

76. 一种用于对哺乳动物中患有肿瘤的组织或器官进行体内成像的方法,其包括:

i) 向所述哺乳动物施用如权利要求1-63中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐;和

ii) 进行正电子发射断层摄影术 (PET) 分析、单光子发射计算机化断层摄影术 (SPECT) 或磁共振成像 (MRI);

其中所述肿瘤细胞表达由所述肿瘤靶向多肽 R^3 的所述抗原结合区特异性结合的抗原。

77. 如权利要求75或76所述的方法, 其中如权利要求1-63中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐包含诊断性放射性核素。

78. 如权利要求75-77中任一项所述的方法, 其中: 步骤(ii) 是在步骤(i) 后足以使如权利要求1-63中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐与所述肿瘤细胞上表达的所述抗原相互作用的时间量之后开始的。

VHH抗体缀合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2022年8月22日提交的美国申请号63/373,183的权益,将其通过引用以其整体特此并入。

背景技术

[0003] 抗体(诸如IgG)对其抗原的敏锐特异性使得抗体成为治疗剂的首要靶向平台;然而,IgG的典型血清半衰期为至少三周,对于放射性同位素(包括 α 发射同位素诸如锕-225(^{225}Ac)和 β 发射同位素诸如镥-177(^{177}Lu)和钇-90(^{90}Y))的递送是不利的,特别是由于暴露延长和慢性脱靶毒性。工程化的较小抗体形式(例如单体scFv、仅重链抗体或单结构域抗体片段)的出现提供了对形式较小(例如15至30kDa)并且血清半衰期短得多(例如30分钟至2小时)的全尺寸(full-size)抗体(例如,IgG(约150kDa))的敏锐特异性(Bates A,Power,C,Antibodies(Basel)8:28(2019))。不幸的是,由于保留和肿瘤摄取较差,这些短的半衰期不允许有足够的时间进行有效靶标结合,并且此外,肾脏系统对这些小抗体形式进行的血浆清除可能导致肾组织中同位素积聚和成问题的脱靶毒性。

[0004] ^{225}Ac 是 α 发射放射性同位素中最具细胞毒性的放射性同位素之一,并且单个衰变事件可以通过引起双链DNA断裂和随后的细胞死亡来有效地破坏癌细胞。 α 发射放射性同位素的效力使其作为细胞杀伤剂具有吸引力,能够克服响应于其他疗法所观察到的获得性抗性。然而,不幸的是,由于体内不同位置的衰变事件,关于全身施用以及在靶组织与非靶组织中实现所需剂量测定仍然存在许多挑战。 α 发射放射性核素作为靶向治疗剂的应用的关键是调节体内子体核素的分布以便限制毒性的能力。这继而与母体核素的生成时间、治疗剂施用时间、子体核素的衰变途径和半衰期、循环时间以及递送媒介物的生物分布和药代动力学有关。不幸的是, α 粒子的发射通常还产生反冲能量,该反冲能量足够大以使子体核素与螯合因子(chelator)解耦,有可能使子体核素与其靶向媒介物分离,导致随后“游离”子体核素的重新分布,从而可能诱发多种毒性。参见例如,Robertson A等人,Curr Radiopharm 11:156(2018)。因此,由 ^{225}Ac 反冲子体核素(例如213-Bi)引起的肾毒性迄今为止已成为 ^{225}Ac 的治疗性用途的主要限制因素(参见例如,Jaggi J等人,Cancer Res.65:4888(2005))。

[0005] 关于在治疗中使用具有 α 发射放射性同位素的抗体和抗体片段的另一个令人困惑的问题是,干扰放射性衰变可能特别地损害抗体组分和靶向序列,甚至在治疗之前。在可以将 α -发射体标记的抗体片段施用于患者之前,可能发生抗体片段的辐射分解,从而减少靶向的量(参见例如,Larsen R,Brundland O,J Labelled Compd Radiopharm.36:1009-18(1995)),并且在治疗性给药所需的较高比活下,免疫反应性可能随着放射化学质量而迅速下降。Salako等人,J Nucl Med.39(4):667-670(1998)。例如,在1,000格雷(Gy)或更高的剂量下, α 发射体释放的高电离密度经由辐射分解损害同位素标记的Fab片段的免疫反应性。同样地,在剂量超过1,200Gy时观察到 α 发射同位素标记的抗体的显著辐射分解(Zalutsky M等人,J Nucl Med.42(10):1508-15(2001))。因此, α 发射放射性同位素的适当的靶向递送

媒介物的鉴定并不简单。

[0006] 此外,靶向放射递送平台(包括 α 发射和 β 发射放射性同位素)存在另外的问题,在设计此类平台时需要同步优化诸如例如免疫原性、特异性、组织渗透、稳定性、制造的简易性和可接受的治疗窗。

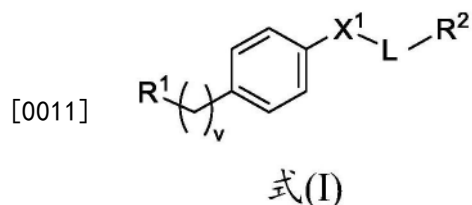
发明内容

[0007] 本发明涉及免疫缀合物或放射性免疫缀合物、包含它们的组合物以及使用这样的免疫缀合物和组合物的方法。本发明的免疫缀合物和组合物具有许多用途,例如,用于递送放射性同位素以杀伤靶细胞(例如表达由放射性免疫缀合物结合的靶抗原的癌细胞);用于检测和表征对象体内的恶性细胞(例如靶抗原表达);以及用于诊断和治疗各种疾病和病状,诸如例如,癌症、肿瘤和涉及抗原表达细胞的其他生长异常。

[0008] 通过特异性递送平台组分的选择和特定组合,本发明解决了在体内 α 粒子发射体的靶向递送中固有的许多挑战。本发明的发射 α 粒子的放射性同位素递送平台提供了比传统IgG更短的半衰期,但比更小的单体抗体片段形式更长的半衰期。这样的半衰期允许降低由于 α 发射体引起的毒性,同时将抗体片段在体内保存足够长的时间以发挥治疗性活性。例如,本公开的发射 α 粒子的放射性同位素递送平台表现出增强的肿瘤靶向和减少的在诸如骨髓和肾的放射敏感组织中的积聚。此外,令人惊奇的是,本发明的发射 α 粒子的放射性同位素递送平台对于具有不同抗原密度的肿瘤表现出优异的肿瘤结合和标记特性,这可能是一些免疫缀合物的一些用途的限制。

[0009] 本文在一个方面描述了免疫缀合物,其包含:a)抗原结合区;b)免疫球蛋白重链恒定区;和c)螯合剂;其中所述免疫缀合物的分子量在60与110kDa之间。在某些实施方案中,所述抗原结合区包含scFv多肽或VHH多肽。在某些实施方案中,所述抗原结合区包含scFv多肽。在某些实施方案中,所述抗原结合区包含VHH多肽。在某些实施方案中,所述抗原结合区是人源化的。

[0010] 在一些实施方案中,本文描述了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐:



[0012] 其中:

[0013] R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;

[0014] X^1 是-O-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-NR^a-、-C(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-OC(=O)NR^a-、-NR^aC(=O)NR^a-、-NR^aC(=S)NR^a-、-NR^aC(=O)O-、-(未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-X²-、-(未取代的或经取代的C₂-C₁₀亚烯基)-X²-、-(未取代的或经取代的C₂-C₁₀亚炔基)-X²-或-(C₄-C₂₀聚乙二醇)-X²-;

[0015] X^2 是不存在的、-C(=O)-、-NR^aC(=O)-、-C(=O)NR^a-或-C(=O)X⁴-;

[0016] 每个R^a独立地选自氢和C₁-C₄烷基;

[0017] X^4 是-NR^a-、-NR^aS(=O)₂-、-NR^aS(=O)₂NR^a-或一种或多种独立选择的天然或非天

然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代,并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

[0018] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

[0019] L是任选的接头;

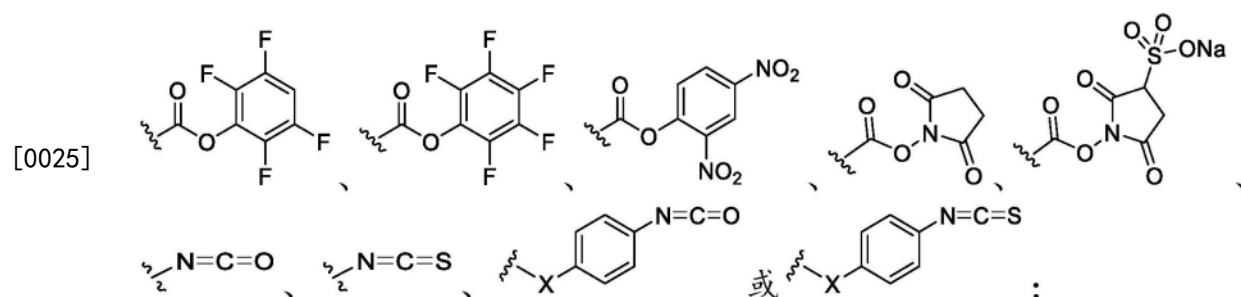
[0020] R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)或硫醇($-SH$)反应的部分;并且

[0021] v 是1、2、3或4。

[0022] 在一些实施方案中, v 是1。

[0023] 在一些实施方案中, R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)反应的部分并且包括四氟苯酯、五氟苯酯、二硝基苯酯、琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺酯或异硫氰酸酯。

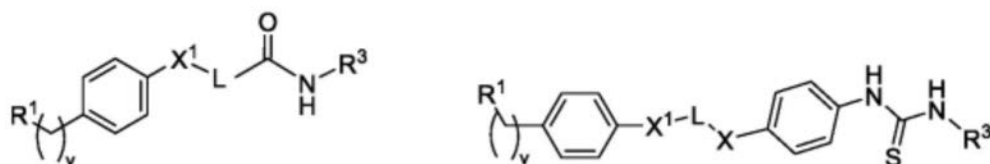
[0024] 在一些实施方案中, R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)反应的部分并且包括:



[0026] X是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$;并且

[0027] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基。

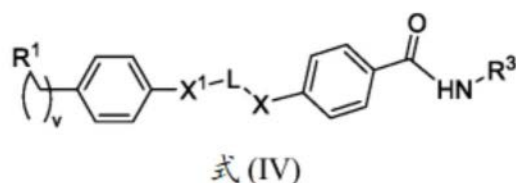
[0028] 在一些实施方案中,本文描述了免疫缀合物,其具有式(II)、式(III)或式(IV)的化合物或其药学上可接受的盐的结构:



式(II)

式(III)

[0029]



式(IV)

[0030] 其中:

[0031] R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;

[0032] X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、

$C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、- (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基) $-X^2-$ 、- (未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基) $-X^2-$ 、- (未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基) $-X^2-$ 或- (C_4-C_{20} 聚乙二醇) $-X^2-$;

[0033] X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

[0034] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

[0035] X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代,并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

[0036] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

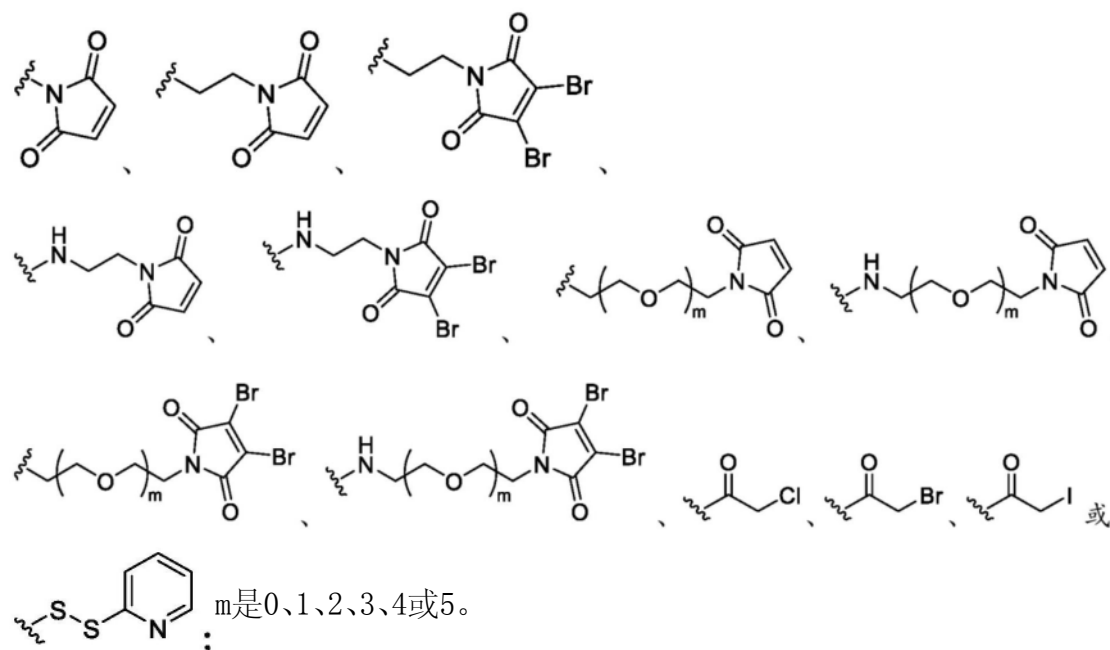
[0037] L是任选的接头;

[0038] $-NH-R^3$ 是肿瘤靶向部分;并且

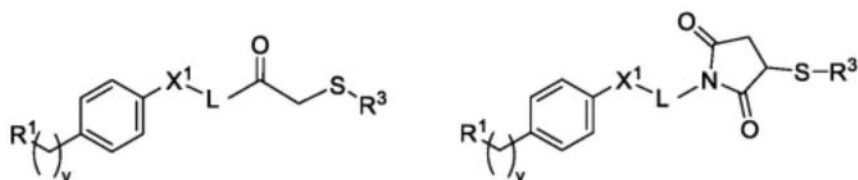
[0039] v 是1、2、3或4。

[0040] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇($-SH$)反应的部分并且包括马来酰亚胺基团、卤代乙酰胺基团、卤代乙酰基基团、卤代乙酸基团、吡啶基硫代基团、乙烯基羰基基团、氮丙啶基基团、二硫化物基团、乙炔基团、羟基琥珀酰亚胺基团或硫醇基团。

[0041] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇($-SH$)反应的部分并且包括



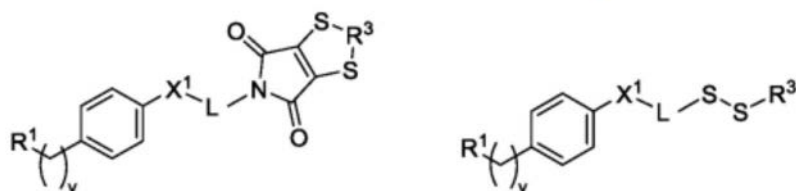
[0042] 在一些实施方案中,本文描述了免疫缀合物,其具有式(V)、式(VI)、式(VII)或式(VIII)的化合物或其药学上可接受的盐的结构:



式(V)

式(VI)

[0043]



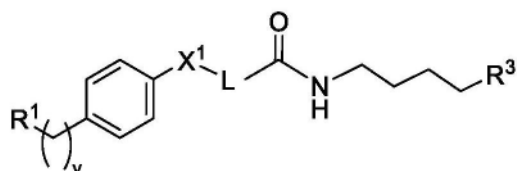
式(VII)

式(VIII)

[0044] 其中:

[0045] R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;[0046] X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、[0047] $C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、[0048] $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、(未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基)- X^2- 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基)- X^2- 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基)- X^2- 或 $(C_4-C_{20}$ 聚乙二醇)- X^2- ;[0049] X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;[0050] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;[0051] X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代,并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;[0052] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;[0053] L 是任选的接头;[0054] $-S-R^3$ 是肿瘤靶向部分;并且[0055] v 是1、2、3或4。[0056] 在一些实施方案中, R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸的胺($-NH_2$)反应的部分。

[0057] 在一些实施方案中,所述式(II)的免疫缀合物具有式(IIa)或其药学上可接受的盐的结构:

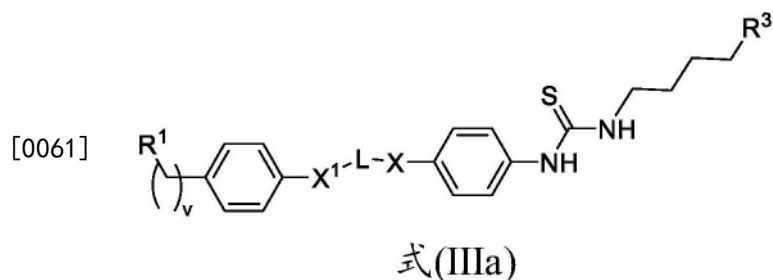


[0058]

式(IIa)

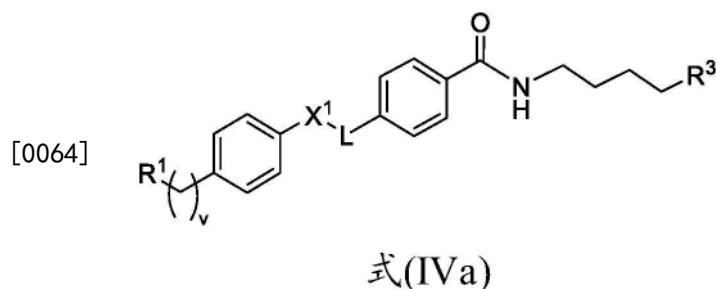
[0059] 其中: $-NHCH_2CH_2CH_2CH_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链。

[0060] 在一些实施方案中,所述式(III)的免疫缀合物具有式(IIIa)或其药学上可接受的盐的结构:



[0062] 其中: $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链。

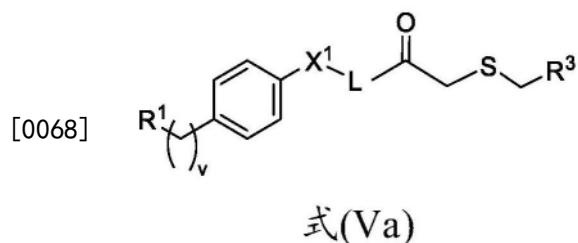
[0063] 在一些实施方案中,所述式(IV)的免疫缀合物具有式(IVa)或其药学上可接受的盐的结构:



[0065] 其中: $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链。

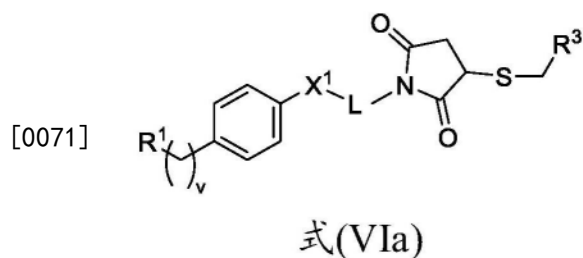
[0066] 在一些实施方案中, R^2 是能够与所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸的硫醇 ($-\text{SH}$) 反应的部分。

[0067] 在一些实施方案中,所述式(V)的免疫缀合物具有式(Va)或其药学上可接受的盐的结构:



[0069] 其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

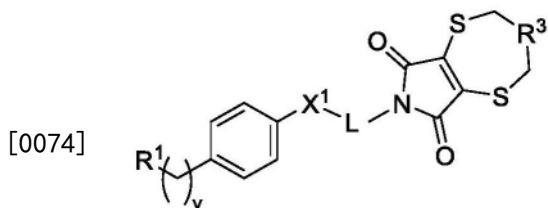
[0070] 在一些实施方案中,所述式(VI)的免疫缀合物具有式(VIa)或其药学上可接受的盐的结构:



[0072] 其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

[0073] 在一些实施方案中,所述式(VII)的免疫缀合物具有式(VIIa)或其药学上可接受的

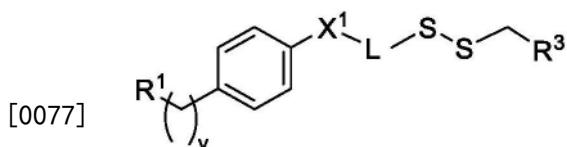
的盐的结构:



式(VIIa)

[0075] 其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

[0076] 在一些实施方案中,所述式(VIII)的免疫缀合物具有式(VIIIa)或其药学上可接受的盐的结构:



式(VIIIa)

[0078] 其中: $-\text{SCH}_2-$ 是所述肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

[0079] 在一些实施方案中,所述肿瘤靶向部分 R^3 是包含抗原结合区和免疫球蛋白重链恒定区的多肽,其中所述多肽的分子量在60与110kDa之间。

[0080] 在一些实施方案中,所述抗原结合区包含scFv多肽或VHH多肽。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白的CH2结构域、免疫球蛋白的CH3结构域或免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区是IgA、IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一些实施方案中,所述抗原结合区是人源化的,所述免疫球蛋白重链恒定区是人免疫球蛋白重链恒定区,或两者兼备。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能或改变所述免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的对一个或多个氨基酸残基的改变;或所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能并改变所述免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的对一个或多个氨基酸残基的改变。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变;或所述免疫球蛋白重链恒定区包含改变所述免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的对一个或多个氨基酸残基的改变;或两者兼备。在一些实施方案中,降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变是降低补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞-细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用ADCP或其组合的改变。

[0081] 在某些实施方案中,所述抗原结合区特异性结合HER2或DLL3。在某些实施方案中,所述抗原结合区特异性结合HER2。在某些实施方案中,所述免疫缀合物的抗原结合区包含:
a) 重链CDR1,其包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;
b) 重链CDR2,其包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;和
c) 重链CDR3,其包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,并且结合HER2。
在某些实施方案中,所述免疫缀合物的抗原结合区包含与SEQ ID NO:20所示的序列具有至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性并且结合HER2的序列。在某些实施方案

中,所述抗原结合区特异性结合DLL3。在某些实施方案中,所述免疫缀合物的抗原结合区包含:a)重链CDR1,其包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列;b)重链CDR2,其包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列;和c)重链CDR3,其包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,并且结合DLL3。在某些实施方案中,所述免疫缀合物的抗原结合区包含与SEQ ID NO:30所示的序列具有至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性并且结合DLL3的序列。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白的CH2结构域、免疫球蛋白的CH3结构域或免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区是人免疫球蛋白重链恒定区。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区是IgA、IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区是IgG1同种型。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区是IgG4同种型。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能或改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合的对一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能并改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合的对一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,所述免疫球蛋白重链恒定区包含改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合的对一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变是降低补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞-细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用ADCP或其组合的改变。在某些实施方案中,降低所述免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变选自根据EU编号的以下组成的列表:(a) 297A、297Q、297G或297D, (b) 279F、279K或279L, (c) 228P, (d) 235A、235E、235G、235Q、235R或235S, (e) 237A、237E、237K、237N或237R, (f) 234A、234V或234F, (g) 233P, (h) 328A, (i) 327Q或327T, (j) 329A、329G、329Y或329R, (k) 331S, (l) 236F或236R, (m) 238A、238E、238G、238H、238I、238V、238W或238Y, (n) 248A, (o) 254D、254E、254G、254H、254I、254N、254P、254Q、254T或254V, (p) 255N, (q) 256H、256K、256R或256V, (r) 264S, (s) 265H、265K、265S、265Y或265A, (t) 267G、267H、267I或267K, (u) 268K, (v) 269N或269Q, (w) 270A、270G、270M或270N, (x) 271T, (y) 272N, (z) 292E、292F、292G或292I, (aa) 293S, (bb) 301W, (cc) 304E, (dd) 311E、311G或311S, (ee) 316F, (ff) 328V, (gg) 330R, (hh) 339E或339L, (ii) 343I或343V, (jj) 373A、373G或373S, (kk) 376E、376W或376Y, (ll) 380D, (mm) 382D或382P, (nn) 385P, (oo) 424H、424M或424V, (pp) 434I, (qq) 438G, (rr) 439E、439H或439Q, (ss) 440A、440D、440E、440F、440M、440T或440V, (tt) K322A, (uu) L235E, (vv) L234A和L235A, (ww) L234A、L235A和G237A, (xx) L234A、L235A和P329G, (yy) L234F、L235E和P331S, (zz) L234A、L235E和G237A, (aaa) L234A、L235E、G237A和P331S, (bbb) L234A、L235A、G237A、P238S、H268A、A330S和P331S, (ccc) L234A、L235A和P329A, (ddd) G236R和L328R, (eee) G237A, (fff) F241A, (ggg) V264A, (hhh) D265A, (iii) D265A和N297A, (jjj) D265A和N297G, (kkk) D270A, (lll) A330L, (mmm) P331A或P331S, 或 (nnn) E233P, (ooo) L234A、L235E、G237A、A330S和P331S, 或 (ppp) (a) - (ppp) 的任何组合。在某些实施方案中,降低所述免疫球蛋白重链恒定

区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变包括根据EU编号的L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。在某些实施方案中,改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的氨基酸改变缩短了所述免疫缀合物的血清半衰期。在某些实施方案中,改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基:251、252、253、254、255、288、309、310、312、385、386、388、400、415、433、435、436、439、447及其组合。在某些实施方案中,改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基:253、254、310、435、436及其组合。在某些实施方案中,改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基:I253A、I253D、I253P、S254A、H310A、H310D、H310E、H310Q、H435A、H435Q、Y436A及其组合。在某些实施方案中,改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基:I253A、S254A、H310A、H435Q、Y436A及其组合。在某些实施方案中,改变所述免疫缀合物与所述新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基:I253A、H310A、H435Q及其组合。在某些实施方案中,所述免疫缀合物具有小于15天的血清半衰期。在某些实施方案中,所述免疫缀合物具有小于10天的血清半衰期。在某些实施方案中,所述免疫缀合物具有小于120小时的血清半衰期。在某些实施方案中,所述免疫缀合物具有小于72小时的血清半衰期。在某些实施方案中,所述抗原结合区通过接头氨基酸序列或人IgG铰链区与所述免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,所述抗原结合区通过人IgG铰链区与所述免疫球蛋白重链恒定区偶联。

[0082] 在某些实施方案中,所述螯合剂以1:1至8:1的比例与所述抗原结合区和/或所述免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,所述螯合剂以1:1至6:1的比例与所述抗原结合区和/或所述免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,所述螯合剂以2:1至6:1的比例与所述抗原结合区和/或所述免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,所述免疫缀合物还包含放射性同位素。在某些实施方案中,所述放射性同位素是 α 发射体。在某些实施方案中,所述放射性同位素是选自以下组成的列表的 α 发射体: ^{225}Ac 、镭-223(^{223}Ra)、镭-224(^{224}Ra)、钍-227(^{227}Th)、铅-212(^{212}Pb)、铋-212(^{212}Bi)和铋(^{213}Bi)。在某些实施方案中,所述放射性同位素是 ^{225}Ac 。在某些实施方案中,所述放射性同位素是 β 发射体。在某些实施方案中,所述放射性同位素是选自以下的 β 发射体: ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、铜-67(^{67}Cu)和钐-153(^{153}Sm)。在某些实施方案中,所述免疫缀合物的分子量在60与100kDa之间。在某些实施方案中,所述免疫缀合物的分子量在60与90kDa之间。在某些实施方案中,所述免疫缀合物的分子量在65与90kDa之间。在某些实施方案中,所述免疫缀合物的分子量在70与90kDa之间。在某些实施方案中,所述免疫缀合物与另一种免疫缀合物形成二聚体。在某些实施方案中,所述免疫缀合物还包含药学上可接受的赋形剂或载剂。在某些实施方案中,所述免疫缀合物被配制用于静脉内施用。

[0083] 本文还描述了制备所述免疫缀合物的方法,所述方法包括使所述免疫缀合物负载放射性同位素。在某些实施方案中,所述放射性同位素是 α 发射体。在某些实施方案中,所述

放射性同位素是选自以下组成的列表的 α 发射体： ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。在某些实施方案中，所述放射性同位素是 ^{225}Ac 。在某些实施方案中，所述放射性同位素是 β 发射体。在某些实施方案中，所述放射性同位素是选自以下的 β 发射体： ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 和 ^{153}Sm 。在某些实施方案中，所述放射性同位素是 ^{177}Lu 。

[0084] 本文还描述了治疗个体的癌症或肿瘤的方法，所述方法包括向所述个体施用所述免疫缀合物，从而治疗所述癌症或所述肿瘤。在某些实施方案中，所述个体是人类个体。在某些实施方案中，所述癌症或肿瘤是实体癌或肿瘤。在某些实施方案中，所述癌症或肿瘤包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌或神经内分泌癌。在某些实施方案中，所述方法还包括向所述个体施用 $0.5\mu\text{Ci}$ 至 $30.0\mu\text{Ci}$ /千克。在某些实施方案中，所述癌症或肿瘤表达由所述免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0085] 本文还描述了用于在治疗个体的癌症或肿瘤的方法中使用的免疫缀合物。在某些实施方案中，所述个体是人类个体。在某些实施方案中，所述癌症或肿瘤是实体癌或肿瘤。在某些实施方案中，所述癌症或肿瘤包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌或神经内分泌癌。在某些实施方案中，向所述个体施用 $0.5\mu\text{Ci}$ 至 $30.0\mu\text{Ci}$ /千克。在某些实施方案中，所述癌症或肿瘤表达由所述免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0086] 本文还描述了杀伤个体中的癌细胞的方法，所述方法包括向所述个体施用所述免疫缀合物，从而杀伤所述癌细胞。在某些实施方案中，所述个体是人类个体。在某些实施方案中，所述癌细胞包括肺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞或神经内分泌癌细胞。在某些实施方案中，所述方法包括向所述个体施用 $0.1\mu\text{Ci}$ 至 $30.0\mu\text{Ci}$ /千克。在某些实施方案中，所述方法包括向所述个体施用 10mCi 至 75mCi /平方米体表面积。在某些实施方案中，所述癌细胞表达由所述免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0087] 本文还描述了所述免疫缀合物在杀伤个体中的癌细胞的方法中的用途。在某些实施方案中，所述个体是人类个体。在某些实施方案中，所述癌细胞包括肺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞或神经内分泌癌细胞。在某些实施方案中，所述方法包括向所述个体施用 $0.5\mu\text{Ci}$ 至 $30.0\mu\text{Ci}$ /千克。在某些实施方案中，所述癌细胞表达由所述免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0088] 本文还描述了将放射性同位素递送至个体中的癌细胞或肿瘤细胞的方法，所述方法包括向所述个体施用所述免疫缀合物，从而将所述放射性同位素递送至所述癌细胞或所述肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述个体是人类个体。在某些实施方案中，所述癌细胞或所述肿瘤细胞包括肺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞或神经内分泌癌细胞。在某些实施方案中，所述方法包括向所述个体施用 $0.5\mu\text{Ci}$ 至 $30.0\mu\text{Ci}$ /千克。在某些实施方案中，所述癌细胞或所述肿瘤细胞表达由所述免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0089] 本文还描述了用于将放射性同位素递送至个体中的癌细胞或肿瘤细胞的免疫缀合物。在某些实施方案中，所述个体是人类个体。在某些实施方案中，所述癌细胞或所述肿瘤细胞包括肺癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞或神经内分泌癌细胞。在某些实施方案中，所述癌细胞或所述肿瘤细胞表达由所述免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0090] 本文还描述了对个体中的肿瘤进行成像的方法，所述方法包括向所述个体施用所述免疫缀合物。在某些实施方案中，所述个体是人类个体。在某些实施方案中，所述癌症或肿瘤包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌或神经内分泌癌。在某些实施方案中，所述肿瘤表达由所述

免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0091] 本文还描述了用于在对个体中的肿瘤进行成像的方法中使用的免疫缀合物。在某些实施方案中,所述个体是人类个体。在某些实施方案中,所述癌症或肿瘤包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌或神经内分泌癌。在某些实施方案中,所述肿瘤表达由所述免疫缀合物特异性结合的抗原。

[0092] 本文还描述了编码所述免疫缀合物的核酸。在某些实施方案中,表达载体包含所述核酸。在某些实施方案中,细胞包含所述核酸或所述表达载体。在某些实施方案中,所述细胞是真核细胞。在某些实施方案中,所述真核细胞是CHO细胞。

[0093] 在一些实施方案中,所述主题放射性同位素递送平台的分子大小足够大(例如,60kDa至110kDa)以大幅降低脱靶毒性,尤其是肾损伤(例如,来自 α 发射同位素货物(cargo)),并且其大小足够小,以实现相较于传统IgG增加的组织渗透,同时维持了靶标特异性,并且靶组织中的首次衰变事件的概率增加。这种大小使得相对于肾脏,优先通过肝脏消除,使肾脏免于放射毒性。

[0094] 在一些实施方案中,所述主题放射性同位素递送平台部分地通过减少由半衰期超过5天和/或分子量低于60kDa的平台引起的某些不良作用而可用于安全且有效地在体内靶向递送 α 发射体。

[0095] 在一些实施方案中,所述主题放射性同位素递送平台部分地通过相较于其他可能的递送平台,表现出由于辐射分解引起的靶向能力损失减少而可用于安全且有效地在体内靶向递送 α 发射体。

[0096] 在一些实施方案中,所述主题放射性同位素递送平台部分地通过相较于使用抗体片段的其他可能的递送平台,表现出在某些放射标记过程(例如,使用某些螯合因子的高温螯合)所需的温度下制造稳定性增加而可用于安全且有效地在体内靶向递送 α 发射体。

[0097] 在一个实施方案中,本发明提供用于体内递送 α 发射放射性同位素的免疫缀合物。在一个实施方案中,所述免疫缀合物还能够体内递送其他原子。在一个实施方案中,所述免疫缀合物能够体内递送成像金属(例如, ^{111}In 、 ^{89}Zr 、 ^{64}Cu 、镓-68(^{68}Ga)或铯-134(^{134}Ce))。

[0098] 在一个实施方案中,所述免疫缀合物包含抗体构建体和螯合剂,并且分子量在60与110kDa之间,优选在60与100kDa之间,优选在60与90kDa之间,优选在65与90kDa之间,优选在70与90kDa之间。所述螯合剂能够螯合 α 发射放射性同位素,使得所述抗体构建体与所述 α 发射放射性同位素连接。

[0099] 所述免疫缀合物中变体恒定区中的至少一个具有至少一个FcRn结合突变。在优选的实施方案中,所述免疫缀合物的两个变体恒定区中的每一个都具有至少一个FcRn结合突变,所述FcRn结合突变是相同或不同的。

[0100] 在一个实施方案中,所述螯合剂包括DOTA或DOTA衍生物。在一个实施方案中,所述螯合剂包括DOTAGA。在一个实施方案中,所述螯合剂包括macropa或macropa衍生物。在一个实施方案中,所述螯合剂包括Py4Pa或Py4Pa衍生物。在一个实施方案中,所述螯合剂包括噬铁蛋白(siderocalin)或噬铁蛋白衍生物。

[0101] 在一个实施方案中,所述螯合剂包含放射性同位素螯合组分和允许与抗原结合臂共价连接的官能团。在一个实施方案中,所述官能团直接与所述放射性同位素螯合组分连接。在一个实施方案中,所述螯合剂还包含在所述官能团与所述放射性同位素螯合组分之

间的接头。

[0102] 在一个实施方案中,所述放射性同位素螯合组分包括DOTA或DOTA衍生物。在一个实施方案中,所述放射性同位素螯合组分包括DOTAGA。在一个实施方案中,所述放射性同位素螯合组分包括macropa或macropa衍生物。在一个实施方案中,所述放射性同位素螯合组分包括Py4Pa或Py4Pa衍生物。

[0103] 在一个实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含本发明的放射性免疫缀合物和药学上可接受的载剂。

[0104] 在一个实施方案中,本发明提供将 α 发射放射性同位素递送至患者体内的癌细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用本发明的放射性免疫缀合物或药物组合物。在一个实施方案中,所述患者是人类患者。

[0105] 在一个实施方案中,本发明提供抑制癌细胞生长的方法,所述方法包括使所述癌细胞与本发明的放射性免疫缀合物接触。在一个实施方案中,所述癌细胞在患者体内。在一个实施方案中,所述方法涉及向所述患者施用本发明的药物组合物。在一个实施方案中,所述患者是人类患者。

[0106] 在一个实施方案中,本发明提供杀伤癌细胞的方法,所述方法包括使所述癌细胞与本发明的放射性免疫缀合物接触。在一个实施方案中,所述癌细胞在患者体内。在一个实施方案中,所述方法涉及向所述患者施用本发明的药物组合物。在一个实施方案中,所述患者是人类患者。

[0107] 在一个实施方案中,本发明提供治疗有需要的患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用本发明的放射性免疫缀合物或药物组合物。在一个实施方案中,所述患者是人类患者。

[0108] 在一个实施方案中,本发明提供靶向成像复合物,其包含本发明的免疫缀合物并进一步包含成像金属。在一个方面,本发明提供靶向成像复合物,其包含本发明的免疫缀合物的抗体构建体并进一步包含成像金属。在一个实施方案中,所述成像金属是放射性同位素。在一个实施方案中,所述成像金属选自以下: ^{111}In 、 ^{89}Zr 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 和 ^{134}Ce 。在一个实施方案中,所述成像金属选自 ^{111}In 、 ^{89}Zr 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 和 ^{134}Ce 。在一个实施方案中,所述成像金属是 ^{111}In 。在一个实施方案中,所述成像金属与所述免疫缀合物或抗体构建体共价结合。在一个实施方案中,所述成像金属与免疫缀合物的螯合剂缔合。在一个实施方案中,本发明提供确定患者体内癌细胞的位置的方法,所述方法包括向所述患者施用本发明的靶向成像复合物。在一个实施方案中,所述患者是人类患者。

[0109] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备本发明的放射性药物的试剂盒,其包含本发明的免疫缀合物。在一个实施方案中,本发明提供包含本发明的放射性免疫缀合物的试剂盒。在一个实施方案中,本发明提供用于制备本发明的药物组合物的试剂盒,其包含本发明的免疫缀合物。在一个实施方案中,本发明提供用于制备本发明的药物组合物的试剂盒,其包含本发明的放射性免疫缀合物。在一个实施方案中,本发明提供包含本发明的药物组合物的试剂盒。

[0110] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物包含二聚化结构域或基序。在一些另外的实施方案中,所述二聚化结构域或基序在铰链区和/或变体恒定区中。

[0111] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或药物组合物在人血清中的半衰期小于96小时。在一些另外的实施方案中,在人血清中的半衰期小于72小时。在一些另外的实施方案中,所述半衰期小于48、36、24和/或12小时。在一些实施方案中,所述半衰期在4与8小时之间、在6与12小时之间、在8与16小时之间、在12与24小时之间或在24与48小时之间。

[0112] 在一个方面,本发明提供放射性免疫缀合物,其包含本发明的免疫缀合物并进一步包含 β 粒子发射体,诸如例如, ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 或 ^{153}Sm 。在一个方面,本发明提供包含这种放射性免疫缀合物的药物组合物。

[0113] 在一个方面,本发明提供放射性免疫缀合物,其包含本发明的免疫缀合物并进一步包括 α 粒子发射体和 β 和/或 γ 粒子发射体。在一个方面,本发明提供包含这种放射性免疫缀合物的药物组合物。

[0114] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒除了本发明的免疫缀合物、放射性免疫缀合物或药物组合物之外,还包括试剂或药物装置。

[0115] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒是用于特异性检测生物样品中的抗原的免疫测定试剂盒,其包含:(a)如本文所述的免疫缀合物、放射性免疫缀合物或靶向成像复合物和/或其组合物;和(b)用于检测所述免疫缀合物、放射性免疫缀合物或靶向成像复合物的说明书。

[0116] 在另一个方面,本发明提供分离的核酸,其编码如本文提供的抗原结合臂或其组分。在一个方面,本发明提供分离的核酸,其编码本文的免疫缀合物的抗原结合区。在一个方面,本发明提供分离的核酸,其编码本文的免疫缀合物的VHH多肽。在一个方面,本发明提供分离的核酸,其编码本文的免疫缀合物的铰链区。在一个方面,本发明提供分离的核酸,其编码本文的免疫缀合物的变体恒定区。在一个方面,本发明提供分离的核酸,其编码本文的免疫缀合物的VHH多肽和本文的免疫缀合物的铰链区。在一个方面,本发明提供分离的核酸,其编码本文的免疫缀合物的VHH多肽、本文的免疫缀合物的铰链区和本文的免疫缀合物的变体恒定区。

[0117] 在另一个方面,本发明提供载体,其包含如本文提供的核酸。在一些实施方案中,所述载体是表达载体。

[0118] 在另一个方面,本发明提供使用本发明的免疫缀合物、放射性免疫缀合物、靶向成像复合物或药物组合物的方法。在一些实施方案中,本发明提供治疗疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向有需要的患者施用药学上有效量的本文的放射性免疫缀合物或药物组合物。

[0119] 在一些实施方案中,本发明的方法包括向有需要的对象施用本文所述的放射性免疫缀合物或药物组合物中的任一种的步骤。对于一些另外的实施方案,所述方法用于抑制癌细胞或肿瘤的生长和/或杀伤癌细胞或肿瘤。

[0120] 在一些实施方案中,提供了本文所述的免疫缀合物或放射性免疫缀合物用于制造用以治疗对象的疾病、病症或病状诸如例如癌症的药物的用途。

[0121] 在另一个方面,本发明提供用于制备本发明的放射性免疫缀合物或药物组合物的方法,所述方法包括用适当的同位素诸如例如 α 或 β 粒子发射体放射性标记所述免疫缀合物。

[0122] 本发明的这些和其他特征、方面和优点将关于以下描述和所附权利要求变得更好理解。为了形成本发明的其他实施方案,本发明的上述元素可以单独地组合或自由地去除,而在下文没有任何反对这种组合或去除的说明。

附图说明

- [0123] 图1A和1B显示抗HER2和抗DLL3 VHH-Fc构建体的结合。
- [0124] 图2A、2B和2C显示抗HER2和抗DLL3 VHH-Fc构建体与表达HER2和/或DLL3的细胞的结合。
- [0125] 图3A和3B显示抗HER2和抗DLL3 VHH-Fc构建体在表达HER2和DLL3的细胞中的内化。
- [0126] 图4显示抗HER2和抗DLL3 VHH-Fc构建体的自身相互作用数据。
- [0127] 图5显示接头分子的化学合成的示意图。
- [0128] 图6显示接头分子的化学合成的示意图。
- [0129] 图7A、7B和7C显示不同VHH-Fc构建体的免疫反应性分数。
- [0130] 图8显示用¹¹¹In标记的VHH-Fc进行的成像与²²⁵Ac标记的VHH-Fc的生物分布的比较。
- [0131] 图9A、9B、9C和9D显示标记的抗HER2 VHH-Fc构建体的随时间推移的生物分布。
- [0132] 图10A、10B和10C显示标记的抗HER2 VHH-Fc构建体的肿瘤:非肿瘤组织比率。
- [0133] 图11显示标记的抗HER2 VHH-Fc构建体的生物分布。
- [0134] 图12显示用¹¹¹In标记的VHH-Fc (H101) 和VHH-Fc变体 (H105、H107和H108) 的全身清除。
- [0135] 图13显示标记的抗DLL3 VHH-Fc构建体的随时间推移的生物分布。
- [0136] 图14显示标记的抗DLL3 VHH-Fc构建体的生物分布。
- [0137] 图15A和15B显示²²⁵Ac标记的抗HER2 (15A) 和抗DLL3 (15B) VHH-Fc构建体的生物分布。
- [0138] 图16A、16B和16C显示用²²⁵Ac标记的抗HER2 VHH-Fc构建体进行的毒性研究的结果。
- [0139] 图17显示负载了¹⁷⁷Lu的不同抗DDL3 VHH-Fc构建体的免疫反应性分数。
- [0140] 图18显示本文所述的某些接头整合因子的化学结构。
- [0141] 图19A和19B显示在未处理小鼠中用¹¹¹In进行的成像实验,以使用不同的缀合物测量放射性的全身清除(参见实施例B-26)。

具体实施方式

[0142] 下面使用说明性、非限制性实施方案更全面地描述本发明。然而,本发明可以以许多不同的形式来体现,并且不应被解释为限于下文阐述的实施方案。相反,提供这些实施方案,使得本公开是透彻的并且向本领域技术人员传达本发明的范围。为了更容易理解本发明,下文定义了某些术语。另外的定义可以在本发明的详细描述中找到。

[0143] 具体地,在实施方案中,本发明通过特异性免疫缀合物和放射性免疫缀合物组分的选择和特定组装解决了体内放射性同位素的靶向递送中固有的许多挑战。本发明的放射

性同位素递送平台提供相比于传统IgG更短的半衰期,但相比于较小单体抗体片段形式更长的半衰期。在一些实施方案中,主题放射性同位素递送平台的分子大小足够大(例如,60kDa至110kDa)以大幅降低脱靶毒性,尤其是肾损伤(例如,来自 α 或 β 发射同位素货物),并且其大小足够小,以实现相较于传统IgG增加的组织渗透,同时维持了靶标特异性,并且靶组织中的首次衰变事件的概率增加。在一些实施方案中,主题放射性同位素递送平台部分地通过减少由半衰期超过5天和/或分子量低于60kDa的平台引起的某些不良作用而可用于安全且有效地在体内靶向递送放射性同位素(诸如 α 或 β 发射体)。在一些实施方案中,主题放射性同位素递送平台部分地通过相较于其他可能的递送平台,表现出由于辐射分解引起的靶向能力损失减少而可用于安全且有效地在体内靶向递送放射性同位素(诸如 α 或 β 发射体)。在一些实施方案中,主题放射性同位素递送平台部分地通过相较于使用抗体片段的其他可能的递送平台,表现出在某些放射标记过程(例如,使用某些螯合因子的高温螯合)所需的温度下制造稳定性增加而可用于安全且有效地在体内靶向递送放射性同位素(诸如 α 或 β 发射体)。

[0144] 免疫缀合物

[0145] 在一个方面,本发明提供以高亲和力特异性结合靶抗原的免疫缀合物。在一些实施方案中,本发明提供特异性结合癌细胞的细胞表面抗原的免疫缀合物。在一些实施方案中,免疫缀合物包含三个、四个、五个、六个或更多个CDR或HVR(Kabat)。在一些实施方案中,免疫缀合物以特征在于 $KD \leq 1\mu M$ 、 $<100nM$ 、 $<10nM$ 、 $<1nM$ 、 $<0.1nM$ 、 $<0.01nM$ 或 $<0.001nM$ (例如 $10^{-8}M$ 或更小,例如 $10^{-8}M$ 至 $10^{-13}M$,例如 $10^{-9}M$ 至 $10^{-13}M$)的亲和力结合特定抗原和/或表位。

[0146] 本文所述的免疫缀合物可以充当放射性同位素递送的平台。本文提供放射性同位素递送平台,其具有相对短的半衰期(例如,少于一周或两周,但多于两小时至八小时)。

[0147] 在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)抗原结合区;b)免疫球蛋白重链恒定区;和c)螯合部分或其放射性核素复合物。在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)抗原结合区;b)免疫球蛋白重链恒定区;和c)螯合部分或其放射性核素复合物;其中所述免疫缀合物的分子量在60与110kDa之间。

[0148] 在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)VHH抗原结合区;b)免疫球蛋白重链恒定区;和c)螯合部分或其放射性核素复合物。在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)VHH抗原结合区;b)免疫球蛋白重链恒定区;和c)螯合部分或其放射性核素复合物;其中所述免疫缀合物的分子量在60与110kDa之间。

[0149] 在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)VHH抗原结合区;b)免疫球蛋白Fc区,一起称为VHH-Fc;和c)螯合部分或其放射性核素复合物。在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)VHH抗原结合区;b)免疫球蛋白Fc区;和c)螯合部分或其放射性核素复合物;其中所述免疫缀合物的分子量在60与110kDa之间。

[0150] 在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)VHH抗原结合区;b)变体免疫球蛋白Fc区;和c)螯合部分或其放射性核素复合物。在一个实施方案中,本公开的免疫缀合物包含:a)VHH抗原结合区;b)变体免疫球蛋白Fc区;和c)螯合部分或其放射性核素复合物;其中所述免疫缀合物的分子量在60与110kDa之间。在某些实施方案中,变体免疫球蛋白Fc区包含一个或多个缩短免疫缀合物的血清或血浆半衰期的氨基酸改变。

[0151] 在一些实施方案中,放射性同位素递送平台的大小大于约60kDa,以避免来自 α 发

射同位素货物的某些毒性,诸如例如脱靶肾毒性。在一些实施方案中,放射性同位素递送平台的大小小于约110kDa以提高肿瘤渗透。在一些实施方案中,放射性同位素递送平台的大小介于60kDa与110kDa之间,这是由于其二聚体结构具有两个单独的抗原结合臂,每个抗原结合臂具有与铰链区和野生型或变体恒定区融合的VHH多肽。在一些实施方案中,变体恒定区相对于野生型Fc区具有特定的氨基酸取代,以缩短半衰期和/或消除一种或多种Fc效应子功能。

[0152] 在一个实施方案中,免疫缀合物的抗体构建体由彼此共价连接(例如,经由介于缔合的重链恒定区或免疫球蛋白铰链区之间的二硫键联)的两个抗原结合臂组成。抗原结合臂中的每一个独立地由抗原结合区、铰链区和变体恒定区组成。在每个抗原结合臂内,臂的抗原结合区共价连接至臂的铰链区,并且臂的铰链区共价连接至臂的变体恒定区,使得铰链区插置在抗原结合臂的抗原结合区与变体恒定区之间,并由此连接它们。

[0153] 在优选的实施方案中,免疫缀合物中两个抗原结合区中的至少一个由一个或两个仅重链可变(VHH)多肽组成。在优选的实施方案中,两个抗原结合区中的至少一个由一个VHH多肽组成。在优选的实施方案中,免疫缀合物的两个抗原结合区中的每一个都由一个VHH多肽组成,所述VHH多肽是相同或不同的。

[0154] 在一个实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区结合相同抗原。在一个实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区结合不同抗原。在一个实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区是相同的。在一个实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区是不同的。在一个实施方案中,每个抗原结合臂的抗原结合区都由一个或两个VHH多肽组成。

[0155] 在一个实施方案中,一个抗原结合臂的抗原结合区由两个VHH多肽组成,并且另一抗原结合臂的抗原结合区不包含VHH多肽。在一个实施方案中,两个抗原结合臂结合相同抗原。在一个实施方案中,两个抗原结合臂结合不同抗原。在一个实施方案中,两个VHH多肽是相同的。在一个实施方案中,两个VHH多肽是不同的。在一个实施方案中,免疫缀合物是双特异性的。

[0156] 在一个实施方案中,一个抗原结合臂的抗原结合区由一个VHH多肽组成,并且另一抗原结合臂的抗原结合区由两个VHH多肽组成。在一个实施方案中,两个抗原结合臂结合相同抗原。在一个实施方案中,两个抗原结合臂结合不同抗原。在一个实施方案中,三个VHH多肽是相同的。在一个实施方案中,三个VHH多肽中的两个是相同的并且与第三个VHH多肽不同。在一个实施方案中,三个VHH多肽是不同的。在一个实施方案中,免疫缀合物是双特异性的。

[0157] 在一个实施方案中,免疫缀合物的每个抗原结合臂的抗原结合区由一个VHH多肽组成。在一个实施方案中,VHH多肽结合相同抗原。在一个实施方案中,VHH多肽结合不同抗原。在一个实施方案中,VHH多肽是相同的。在一个实施方案中,VHH多肽是不同的。在一个实施方案中,免疫缀合物是双特异性的。

[0158] 抗原结合区

[0159] 抗原结合区赋予免疫缀合物特异性并且可以适当地包含小抗原结合多肽。此类小抗原结合多肽赋予诸如减小免疫缀合物分子的总体大小以实现肿瘤渗透和标记的优点。小抗原结合多肽可以缺乏某些对于结合来说可有可无的区域,诸如轻链恒定区、重链恒定区、CH1区或铰链区。在某些实施方案中,抗原结合区可以缺乏轻链可变区。在某些实施方案中,

小抗原结合区的分子量可以在10kDa与40kDa之间。

[0160] 在一些实施方案中,小抗原结合区的分子量为约10kDa至约40kDa。在一些实施方案中,小抗原结合区的分子量为约10kDa至约15kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约25kDa、约10kDa至约30kDa、约10kDa至约35kDa、约10kDa至约40kDa、约15kDa至约20kDa、约15kDa至约25kDa、约15kDa至约30kDa、约15kDa至约35kDa、约15kDa至约40kDa、约20kDa至约25kDa、约20kDa至约30kDa、约20kDa至约35kDa、约20kDa至约40kDa、约25kDa至约30kDa、约25kDa至约35kDa、约25kDa至约40kDa、约30kDa至约35kDa、约30kDa至约40kDa或约35kDa至约40kDa。在一些实施方案中,小抗原结合区的分子量为约10kDa、约15kDa、约20kDa、约25kDa、约30kDa、约35kDa或约40kDa。在一些实施方案中,小抗原结合区的分子量为至少约10kDa、约15kDa、约20kDa、约25kDa、约30kDa或约35kDa。在一些实施方案中,小抗原结合区的分子量为至多约15kDa、约20kDa、约25kDa、约30kDa、约35kDa或约40kDa。

[0161] 抗原结合区可以包含VHH多肽、scFv多肽或VNAR多肽。在某些实施方案中,抗原结合区包含VHH多肽。在某些实施方案中,抗原结合区包含ScFv多肽。在某些实施方案中,抗原结合区包含VNAR多肽。在某些实施方案中,抗原结合区是人源化的。

[0162] 抗原区可以包含针对技术人员所选择的抗原的特异性,以实现所需的功能,诸如靶向适合用所述的免疫缀合物或放射性免疫缀合物治疗的特定癌症、肿瘤或细胞类型。如本文所述,抗原结合区可以是本领域已知的抗体的片段或形式。完整的抗体可以被工程化以符合本文所述的各种小抗原结合区形式(例如,scFv)。抗原结合区可以特异性结合肿瘤抗原(例如,在癌性细胞中特异性表达或富集的抗原)。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括Her2、Trop2、CEA、NaPi2b、uPAR、CDCP1、MUC-1、MUC-16、CEACAM-5、MR-1、Fn14、MAGE-3、NY-ESO-1、EGFR、PDGFR、IGF1R、CSF-1R、PSMA、PSCA、STEAP-1、FAP、TEM8、5T4、VEGFR、NRP1、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD39、CD44、CD47、CD52、CD70、CD71、CD74、CD79b、CD132、CD133、CD138、CD166、CD205、CD276、ROR1、ROR2、Glypican 3、Trail受体2(DR5)、PD-L1、间皮素、蛙皮素(Bombesin)、EpCAM、DARPP、CSPG4、半乳凝素-3、整合素 $\alpha\beta$ 1、整合素 $\alpha\beta$ 3、整合素 $\alpha\beta$ 5、整合素 $\alpha\beta$ 6、整合素 α 5 β 1、整合素 α -3、整合素 α -5、整合素 β -6、连接素(Nectin)-4、Wnt激活的抑制因子1、DLL3、转铁蛋白受体、叶酸受体 α 、组织因子、BCMA、c-Met、LIV-1、AXL、AFP、ENPP3、CLDN6/9、DPEP3、RNF43、LRRC15、PTK7、P-钙粘蛋白、FLT3、EphA2、MTI-MMP、CXCR6、GD2或Smoothered抗原(Smo)。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括人表皮生长因子受体2(HER2)、 δ 样配体3(DLL3)、叶酸受体 α (FOLR1)或Wnt激活的抑制因子1(WAIF1)。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括HER2。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括DLL3。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括FOLR1。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括WAIF1。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括TROP2。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括EGFR。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括PSA。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括MUC-1。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括CEA。在某些实施方案中,肿瘤抗原包括NY-ESO-1。

[0163] 在某些实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区包含与SEQ ID NO:20所示的序列具有至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性并且结合HER2的序列。

[0164] 在某些实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区包含:a)CDR1,其包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;b)CDR2,其包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;和c)CDR3,其包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列。

[0165] 在某些实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区包含与SEQ ID NO:30所示的序列具有至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性并且结合DLL3的序列。

[0166] 在某些实施方案中,免疫缀合物的抗原结合区包含:a)CDR1,其包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列;b)CDR2,其包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列;和c)CDR3,其包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。

[0167] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含合成工程化的抗体衍生物,诸如例如,包含自主V_H结构域的蛋白质或多肽(诸如例如,来自骆驼科动物、鼠科动物或人来源);单结构域抗体结构域(sdAb);衍生自骆驼科动物的重链抗体结构域(V_HH片段或V_H结构域片段);衍生自骆驼科动物V_HH片段或V_H结构域片段的重链抗体结构域;衍生自软骨鱼的重链抗体结构域;免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR);V_{NAR}片段;单链可变(scFv)片段;纳米抗体;包含V_H结构域的“骆驼化”(“camelized”或“camelised”)支架;由重链和C_H1结构域组成的Fd片段;单链Fv-C_H3微抗体;Fc抗原结合结构域(Fcab);scFv-Fc融合物;多聚化scFv片段(双抗体、三抗体、四抗体);二硫键稳定的抗体可变(Fv)片段(dsFv);由V_L、V_H、C_L和C_H1结构域组成的二硫键稳定的抗原结合(Fab)片段;包含二硫键稳定的重链和轻链的scFv(sc-dsFv);二价纳米抗体;二价微抗体;二价F(ab')₂片段(Fab二聚体);双特异性串联V_HH片段;双特异性串联scFv片段;双特异性纳米抗体;双特异性微抗体;以及前述保留互补位和靶抗原结合功能的任何遗传操作的配对物。

[0168] 在一些实施方案中,免疫缀合物是单价的。在其他实施方案中,免疫缀合物是多价的,诸如例如二价的。在一些另外的实施方案中,免疫缀合物是二价且二聚体的。在一些另外的实施方案中,二价免疫缀合物是同二聚体。

[0169] 在一个方面,本发明提供抗体构建体(单独或在本发明的免疫缀合物、放射性免疫缀合物或靶向成像复合物各自的情境下),其包含VHH片段,所述VHH片段包含重链可变区,所述重链可变区包含衍生自骆驼科动物的三个重链CDR,它们以特异性和高亲和力结合抗原。

[0170] 在一些实施方案中,抗体构建体、免疫缀合物、放射性免疫缀合物或靶向成像复合物特异性结合细胞表面上表达的抗原的至少一个细胞外部分。在一些实施方案中,免疫缀合物特异性结合靶细胞(诸如例如,肿瘤细胞)所表达的抗原的至少一个细胞外部分。

[0171] 在一些实施方案中,本公开提供特异性结合抗原的免疫缀合物。在一些实施方案中,免疫缀合物包含抗体构建体,所述抗体构建体包含重链可变区(HVR-H),所述重链可变区包含三个CDR:hCDR1、hCDR2和hCDR3,诸如例如,衍生自骆驼科动物抗体或IgNAR的那些。在一些实施方案中,免疫缀合物包含:(a)轻链可变区(HVR-L),其包含三个CDR:lCDR1、lCDR2和lCDR3,和(b)重链可变区(HVR-H),其包含三个CDR:hCDR1、hCDR2和hCDR3。在一些实施方案中,抗体构建体是嵌合的或人源化的。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗体构建体,所述抗体构建体包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域是抗体片段,包括但不限于例如Fv、Fab、Fab'、scFv、HcAb片段、VHH片段、sdAb片段、双抗体或F(ab')₂片段。在一些另外的实施方案中,本发明的免疫缀合物包含两个或更多个抗体片段的多聚体,诸如例如,包含两个抗体片段的同二聚体或异二聚体,每个抗体片段能够以特异性和高亲和力结合抗原并且每个抗体片段包含重链可变区(HVR-H),所述重链可变区包含三个CDR:hCDR1、hCDR2和hCDR3。

[0173] 重链恒定区

[0174] 本文所述的免疫缀合物的抗原结合区可以包含Fc或重链恒定区。抗原结合分子可以直接地、通过合适的接头或通过IgG铰链区与Fc或重链恒定区偶联。包含重链恒定区或Fc区赋予了以下优点,诸如允许优化和调节血清半衰期、添加另外的缀合螯合剂或细胞毒性剂的位点以及允许使用标准过程和方法纯化免疫缀合物。添加重链恒定区还增加了大小,从而可以将免疫缀合物的分解代谢和消除从肾转移到肝。这可以赋予安全性优点,特别是对于放射性免疫缀合物,因为与肝相比,肾对辐射更敏感。可以对负责结合新生儿Fc受体(FcRn)的重链恒定区中存在的残基进行影响效应子功能或血清半衰期的改变。与FcRn的结合通常促成包含免疫球蛋白Fc的分子的半衰期增加,因此减少与FcRn的结合可以缩短包含Fc的分子的半衰期。FcRn结合的减少可以赋予以下优点,诸如缩短免疫缀合物的半衰期,以及因此减少随后归因于细胞毒性剂或放射性同位素的毒性。在某些实施方案中,免疫球蛋白恒定区包含Fc区或由其组成。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白的CH2结构域、免疫球蛋白的CH3结构域或免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。对于人类个体的治疗或成像,免疫球蛋白重链恒定区可以是人的,从而防止或减少针对免疫缀合物的内源性免疫应答。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区是人免疫球蛋白重链恒定区。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区是IgA、IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区是IgG1同种型。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区是IgG4同种型。

[0175] 免疫球蛋白重链恒定区可以是变体恒定区,其包含一个或多个赋予本文所述的免疫缀合物另外的效用和有利性质的氨基酸残基改变。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区包含降低免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能或改变免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区包含降低免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区包含降低免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能并减少免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区包含降低免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对同一个或多个氨基酸残基的改变。在某些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区包含减少免疫缀合物与新生儿Fc受体(FcRn)的结合同一个或多个氨基酸残基的改变。

[0176] 免疫缀合物重链恒定区改变可以降低与重链恒定区相关联的效应子功能,诸如固定补体、促进吞噬作用或将其他免疫效应细胞(例如,NK细胞)募集至重链恒定区的能力。在某些实施方案中,降低免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对同一个或多个氨基酸残基的改变是降低补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞-细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用ADCP或其组合的改变。在某些实施方案中,降低免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对同一个或多个氨基酸残基的改变选自根据EU编号的以下组成的列表:(a) 297A、297Q、297G或297D, (b) 279F、279K或279L, (c) 228P, (d) 235A、235E、235G、235Q、235R或235S, (e) 237A、237E、237K、237N或237R, (f) 234A、234V或234F, (g) 233P, (h) 328A, (i) 327Q或327T, (j) 329A、329G、329Y或329R, (k) 331S, (l) 236F或236R, (m) 238A、238E、238G、238H、

238I、238V、238W或238Y, (n) 248A, (o) 254D、254E、254G、254H、254I、254N、254P、254Q、254T或254V, (p) 255N, (q) 256H、256K、256R或256V, (r) 264S, (s) 265H、265K、265S、265Y或265A, (t) 267G、267H、267I或267K, (u) 268K, (v) 269N或269Q, (w) 270A、270G、270M或270N, (x) 271T, (y) 272N, (z) 292E、292F、292G或292I, (aa) 293S, (bb) 301W, (cc) 304E, (dd) 311E、311G或311S, (ee) 316F, (ff) 328V, (gg) 330R, (hh) 339E或339L, (ii) 343I或343V, (jj) 373A、373G或373S, (kk) 376E、376W或376Y, (ll) 380D, (mm) 382D或382P, (nn) 385P, (oo) 424H、424M或424V, (pp) 434I, (qq) 438G, (rr) 439E、439H或439Q, (ss) 440A、440D、440E、440F、440M、440T或440V, (tt) K322A, (uu) L235E, (vv) L234A和L235A, (ww) L234A、L235A和G237A, (xx) L234A、L235A和P329G, (yy) L234F、L235E和P331S, (zz) L234A、L235E和G237A, (aaa) L234A、L235E、G237A和P331S, (bbb) L234A、L235A、G237A、P238S、H268A、A330S和P331S, (ccc) L234A、L235A和P329A, (ddd) G236R和L328R, (eee) G237A, (fff) F241A, (ggg) V264A, (hhh) D265A, (iii) D265A和N297A, (jjj) D265A和N297G, (kkk) D270A, (lll) A330L, (mmm) P331A或P331S, 或 (nnn) E233P, (ooo) L234A、L235E、G237A、A330S和P331S, 或 (ppp) (a) - (ooo) 的任何组合。在某些实施方案中,降低免疫球蛋白重链恒定区的效应子功能的对一个或多个氨基酸残基的改变包括根据EU编号的L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。

[0177] 免疫缀合物重链恒定区改变可以缩短免疫缀合物的血清半衰期。在某些实施方案中,改变或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的氨基酸改变缩短免疫缀合物的血清半衰期。在某些实施方案中,改变或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基: 251、252、253、254、255、288、309、310、312、385、386、388、400、415、433、435、436、439、447及其组合。在某些实施方案中,改变或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基: 253、254、310、435、436及其组合。在某些实施方案中,改变或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基: I253A、I253D、I253P、S254A、H310A、H310D、H310E、H310Q、H435A、H435Q、Y436A及其组合。在某些实施方案中,改变或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基: I253A、S254A、H310A、H435Q、Y436A及其组合。在某些实施方案中,改变或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基: I253A、H310A、H435Q及其组合。在某些实施方案中,改变或减少免疫缀合物与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的改变是针对选自根据EU编号的以下组成的列表的氨基酸残基: H310A、H435Q及其组合。

[0178] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:1相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的I253A取代。

[0179] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:2相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含

与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的S254A取代。

[0180] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:3相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的H310A取代。

[0181] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:4相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的H435Q取代。

[0182] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:5所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:5相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:5所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的Y436A取代。

[0183] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:6所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:6相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:6所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的H310A/H435Q取代。

[0184] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:7所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:7相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:7所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的L234A、L235E、G237A、A330S和P331S取代。

[0185] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:8所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:8相同的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的L234A、L235E、G237A、H310A、A330S和P331S取代。

[0186] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:9所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:9相同的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:9相同的序列,其中重链恒定区包含根据EU编号的L234A、L235E、G237A、H435Q、A330S和P331S取代。

[0187] 在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与SEQ ID NO:10所示的序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列。在某些实施方案中,免疫缀合物的重链恒定区包含与根据EU编号的SEQ ID NO:10相同的序列。

[0188] 在一个实施方案中,两个变体恒定区中的每一个都具有至少一个FcRn结合突变。在一个实施方案中,两个变体恒定区中的每一个都具有相同的FcRn结合突变。在一个实施方案中,两个变体恒定区中的每一个都具有不同的FcRn结合突变。

[0189] 在一个实施方案中,免疫缀合物中变体恒定区中的至少一个具有至少一个FcRn结合突变。在优选的实施方案中,免疫缀合物的两个变体恒定区中的每一个都具有至少一个FcRn结合突变,所述FcRn结合突变是相同或不同的。

[0190] 影响FcRn结合的改变可以缩短免疫缀合物的血清半衰期,因此允许技术人员选择适合于特定成像或治疗目标的半衰期。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为约12小时至约120小时。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为约12小时至约24小时、约12小时至约36小时、约12小时至约48小时、约12小时至约60小时、约12小时至约72小时、约12小时至约84小时、约12小时至约96小时、约12小时至约108小时、约12小时至约120小时、约24小时至约36小时、约24小时至约48小时、约24小时至约60小时、约24小时至约72小时、约24小时至约84小时、约24小时至约96小时、约24小时至约108小时、约24小时至约120小时、约36小时至约48小时、约36小时至约60小时、约36小时至约72小时、约36小时至约84小时、约36小时至约96小时、约36小时至约108小时、约36小时至约120小时、约48小时至约60小时、约48小时至约72小时、约48小时至约84小时、约48小时至约96小时、约48小时至约108小时、约48小时至约120小时、约60小时至约72小时、约60小时至约84小时、约60小时至约96小时、约60小时至约108小时、约60小时至约120小时、约72小时至约84小时、约72小时至约96小时、约72小时至约108小时、约72小时至约120小时、约84小时至约96小时、约84小时至约108小时、约84小时至约120小时、约96小时至约108小时、约96小时至约120小时或约108小时至约120小时。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为约12小时、约24小时、约36小时、约48小时、约60小时、约72小时、约84小时、约96小时、约108小时或约120小时。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为至少约12小时、约24小时、约36小时、约48小时、约60小时、约72小时、约84小时、约96小时或约108小时。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为至多约24小时、约36小时、约48小时、约60小时、约72小时、约84小时、约96小时、约108小时或约120小时。

[0191] 在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为约1天至约10天。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为约1天至约2天、约1天至约3天、约1天至约4天、约1天至约5天、约1天至约6天、约1天至约7天、约1天至约8天、约1天至约9天、约1天至约10天、约2天至约3天、约2天至约4天、约2天至约5天、约2天至约6天、约2天至约7天、约2天至约8天、约2天至约9天、约2天至约10天、约3天至约4天、约3天至约5天、约3天至约6天、约3天至约7天、约3天至约8天、约3天至约9天、约3天至约10天、约4天至约5天、约4天至约6天、约4天至约7天、约4天至约8天、约4天至约9天、约4天至约10天、约5天至约6天、约5天至约7天、约5天至约8天、约5天至约9天、约5天至约10天、约6天至约7天、约6天至约8天、约6天至约9天、约6天至约10天、约7天至约8天、约7天至约9天、约7天至约10天、约8天至约9天、约8天至约10天或约9天至约10天。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天或约9天。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为至少约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天或约9天。在某些实施方案中,免疫缀合物的血清半衰期为至多约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9

天或约10天。

[0192] 在某些实施方案中,重链恒定区的分子量为约10kDa至约25kDa。在某些实施方案中,重链恒定区的分子量为约10kDa至约15kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约25kDa、约15kDa至约20kDa、约15kDa至约25kDa或约20kDa至约25kDa。在某些实施方案中,重链恒定区的分子量为约10kDa、约15kDa、约20kDa或约25kDa。在某些实施方案中,重链恒定区的分子量为至少约10kDa、约15kDa或约20kDa。在某些实施方案中,重链恒定区的分子量为至多约15kDa、约20kDa或约25kDa。

[0193] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含接头或铰链区,其是将抗原结合区连接至本发明的重链恒定区或变体恒定区的多肽。连接免疫球蛋白组分的天然存在的和合成的铰链区是本领域中熟知的并且可用于本发明。例如,参见US 8,067,548及其中的参考文献。

[0194] 在一个实施方案中,免疫缀合物的铰链区是相同的。在一个实施方案中,免疫缀合物的铰链区是不同的。

[0195] 抗原结合区和重链恒定区(氨基酸序列改变或不改变)可以通过合适的铰链或接头序列连接。在某些实施方案中,抗原结合区通过接头氨基酸序列或人IgG铰链区与免疫球蛋白重链恒定区偶联。适当的IgG铰链区包含并包括IgG1或IgG4铰链区。在某些实施方案中,铰链区是IgG1铰链区。在某些实施方案中,铰链区是具有根据EU编号的C220S取代的IgG1铰链区。合适的铰链区包括以下所述的那些:Wu等人,“Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange,”Protein Engineering, Design and Selection,第14卷,第12期,2001年12月,第1025-1033页;Shu等人,“Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells.”Proceedings of the National Academy of Sciences 1993年9月,90(17) 7995-7999;Davis等人,“Abatacept binds to the Fc receptor CD64 but does not mediate complement-dependent cytotoxicity or antibody-dependent cellular cytotoxicity.”J Rheumatol.2007年11月;334(11): 2204-10。适当的铰链还可以包括基于非IgG的多肽接头。接头氨基酸序列可以主要包括以下氨基酸残基:Gly、Ser、Ala或Thr。接头肽的长度应足够以使两个分子相对于彼此呈现正确的构象并且因此它们保留所需的活动的方式连接两个分子。在一个实施方案中,接头的长度为约1至50个氨基酸或长度为约1至30个氨基酸。在一个实施方案中,可以使用长度为1至20个氨基酸的接头。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n和(GGGGS)_n,其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。示例性地,用于连接抗体片段或单链可变片段的接头可以包括AAEPKSS、AAEPKSSDKTHTCPPCP、GGGG或GGGGDKTHTCPPCP。可替代地,多种非蛋白质性聚合物,包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物,可以用作接头,即可以用作接头。

[0196] 免疫缀合物的总大小可以使得其促进组织渗透、稳定性和/或清除。在某些实施方案中,免疫缀合物的分子量为约60kDa至约120kDa。在某些实施方案中,免疫缀合物的分子量为约60kDa至约65kDa、约60kDa至约70kDa、约60kDa至约75kDa、约60kDa至约80kDa、约60kDa至约90kDa、约60kDa至约100kDa、约60kDa至约110kDa、约60kDa至约120kDa、约65kDa

至约70kDa、约65kDa至约75kDa、约65kDa至约80kDa、约65kDa至约90kDa、约65kDa至约100kDa、约65kDa至约110kDa、约65kDa至约120kDa、约70kDa至约75kDa、约70kDa至约80kDa、约70kDa至约90kDa、约70kDa至约100kDa、约70kDa至约110kDa、约70kDa至约120kDa、约75kDa至约80kDa、约75kDa至约90kDa、约75kDa至约100kDa、约75kDa至约110kDa、约75kDa至约120kDa、约80kDa至约90kDa、约80kDa至约100kDa、约80kDa至约110kDa、约80kDa至约120kDa、约90kDa至约100kDa、约90kDa至约110kDa、约90kDa至约120kDa、约100kDa至约110kDa、约100kDa至约120kDa或约110kDa至约120kDa。在某些实施方案中,免疫缀合物的分子量为约60kDa、约65kDa、约70kDa、约75kDa、约80kDa、约90kDa、约100kDa、约110kDa或约120kDa。在某些实施方案中,免疫缀合物的分子量为至少约60kDa、约65kDa、约70kDa、约75kDa、约80kDa、约90kDa、约100kDa或约110kDa。在某些实施方案中,免疫缀合物的分子量为至多约65kDa、约70kDa、约75kDa、约80kDa、约90kDa、约100kDa、约110kDa或约120kDa。

[0197] 在一些实施方案中,免疫缀合物的分子量大于60、70、75、80、82、83、85、86、87、88或89kDa。在一些实施方案中,免疫缀合物的分子量小于110、100、95、93、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81或80kDa。在一些实施方案中,免疫缀合物的分子量大于60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78或79kDa并且小于110、100、95、93、91或90kDa。

[0198] 本文所述的免疫缀合物和/或重链恒定区变体的大小使本文所包括的免疫缀合物的安全性或治疗指数增加。这种安全性可以反映在放射敏感性主要组织(诸如肾和骨髓)中放射积聚的减少和/或靶组织(即,肿瘤或癌性组织)或放射耐受性更强的器官(诸如肝)中的放射积聚的增加。

[0199] 在某些实施方案中,本公开的免疫缀合物导致每次治疗的总放射暴露,如以格雷(Gy)为单位所测量。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于20Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于19Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于18Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于17Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于16Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于15Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于14Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于13Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于12Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于11Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于10Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于9Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于8Gy或更小。在某些实施方案中,肾在每次治疗时暴露于5Gy或更小。

[0200] 在某些实施方案中,本公开的免疫缀合物导致每次治疗的总放射暴露,如以格雷(Gy)为单位所测量。在某些实施方案中,骨髓在每次治疗时暴露于4Gy或更小。在某些实施方案中,骨髓在每次治疗时暴露于3Gy或更小。在某些实施方案中,骨髓在每次治疗时暴露于2Gy或更小。在某些实施方案中,骨髓在每次治疗时暴露于1.5Gy或更小。在某些实施方案中,骨髓在每次治疗时暴露于1.0Gy或更小。在某些实施方案中,骨髓在每次治疗时暴露于0.5Gy或更小。

[0201] 在某些实施方案中,当以每克注射剂量百分比测量时,本公开的免疫缀合物导致肿瘤中的放射量相较于肾增加。在某些实施方案中,肿瘤的每克注射剂量百分比与肾的每克注射剂量百分比的比率大于2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。

[0202] 在某些实施方案中,当以每克注射剂量百分比测量时,本公开的免疫缀合物导致

肿瘤中的放射量相较于血液增加。在某些实施方案中,肿瘤的每克注射剂量百分比与血液的每克注射剂量百分比的比率大于2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。

[0203] 在某些实施方案中,当以每克注射剂量百分比测量时,本公开的免疫缀合物导致肿瘤中的放射量相较于骨髓增加。在某些实施方案中,肿瘤的每克注射剂量百分比与骨髓的每克注射剂量百分比的比率大于2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。

[0204] 在某些实施方案中,当以每克注射剂量测量时,本公开的免疫缀合物导致肝中的放射量相较于肾增加。在某些实施方案中,肿瘤的每克注射剂量百分比与骨髓的每克注射剂量百分比的比率大于3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。

[0205] 在一些实施方案中,本发明考虑了包含Fc区的本发明的免疫缀合物的变体,其中所述变体具有一些但不是所有效应子功能,这使其成为其中免疫缀合物在体内的半衰期是重要的,但是某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的应用的期望候选者。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保免疫缀合物缺乏Fc γ γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ γ RIII,而单核细胞表达Fc γ γ RI、Fc γ γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)的第464页的表3汇总了造血细胞上的FcR表达。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述于US 5,500,362(参见例如, Hellstrom, I.等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7059-7063(1986))以及Hellstrom等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1499-1502(1985); 5,821,337中(参见Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361(1987))。可替代地,可以采用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA);以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。用于此类测定的有效效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,可以在体内,例如在动物模型中(诸如 Clynes等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:652-656(1998))中披露的那些)评估感兴趣分子的ADCC活性。还可以进行C1q结合测定以确认免疫缀合物不能结合C1q并因此缺乏CDC活性(参见例如, WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA)。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见例如, Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996); Cragg, M.S.等人, *Blood* 101:1045-1052(2003); Cragg, M.S.和M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除率/半衰期确定也可以使用本领域中已知的方法进行(参见例如, Petkova, S.B.等人, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769(2006))。

[0206] 效应子功能降低的免疫缀合物包括Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个被取代的免疫缀合物(US 6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括将残基265和297取代为丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(US 7,332,581)。

[0207] 免疫缀合物可以通过包含根据EU编号的以下改变L234A、L235E、G237A、A330S和P331S来具有改变的效应子功能,所述改变减少Fc受体结合。参见例如, US 8,613,926或 Andersson C, Wenander等人, “Rapid-onset clinical and mechanistic effects of anti-C5aR treatment in the mouse collagen-induced arthritis model.” *Clin Exp Immunol.* 2014年7月; 177(1):219-33。

[0208] 描述了与FcR的结合提高或减弱的某些免疫缀合物变体(参见例如,US 6,737,056;WO 2004/056312;Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0209] 在一些实施方案中,改变在Fc区中进行,导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)改变(即,提高或减少),例如,如US 6,194,551;WO 1999/051642;Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0210] US2005/0014934中描述了半衰期延长并且与负责将母体IgG转移至胎儿的新生儿Fc受体(FcRn)的结合提高的抗体(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976);Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。这些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,所述取代提高Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在Fc区残基434或435的一个或多个处具有取代的那些,例如Fc区残基N434A或R435A的取代(US 7,371,826)。还参见,Duncan和Winter,Nature 322:738-40(1988);US 5,648,260;US 5,624,821;和WO 1994/029351,这些文献涉及Fc区变体的其他例子。

[0211] 为了增加抗体的血清半衰期,可以将补救受体结合表位掺入抗体(尤其是抗体片段)中,例如,如美国专利5,739,277中所述。如本文所用,术语“补救受体结合表位”是指负责增加IgG分子的体内血清半衰期的IgG分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区的表位。

[0212] 如本领域普通技术人员将认识到的,本文的某些教导适用于本发明的抗体构建体、靶向成像复合物、免疫缀合物和放射性免疫缀合物,尽管在本文中仅提及一种或两种此类组合物(例如,免疫缀合物)作为非限制性例子。所有此类应用都被本发明所涵盖。

[0213] 螯合剂

[0214] 如本文所述,在一些实施方案中,螯合剂(即R¹)与肿瘤靶向部分(例如,包含本文所述的抗原结合区和免疫球蛋白重链恒定区的多肽)偶联。螯合部分允许肿瘤靶向部分负载适当的放射性同位素,诸如 β 发射体或 α 发射体。螯合因子可以与抗原结合区、重链恒定区、免疫球蛋白Fc区或其任何组合偶联。此类偶联可以适当地通过共价附接至免疫缀合物、抗原结合区、重链恒定区、免疫球蛋白Fc区或其任何组合的一个或多个氨基酸来进行。

[0215] 在一个实施方案中,免疫缀合物的螯合剂共价连接至抗原结合区、重链恒定区、免疫球蛋白Fc区或其任何组合。在一个实施方案中,螯合剂直接共价连接至抗原结合区、重链恒定区、免疫球蛋白Fc区或其任何组合(例如,不使用间隔序列(spacer)、延伸序列(stretcher)或接头)。在一个实施方案中,螯合剂通过接头共价连接至抗原结合臂,所述接头共价连接至螯合剂并且共价连接至抗原结合臂。在一个实施方案中,接头是亲水性的(例如,PEG链)。在一个实施方案中,接头是疏水性的(例如,烷基或烯炔链)。螯合因子可以与免疫缀合物连接或偶联,如Sadiki,A.等人,“Site-specific conjugation of native antibody.”Antibody Therapeutics 2020,3,271-284中所述。

[0216] 在一些实施方案中,免疫缀合物通过以位点特异性方式(引导至特定氨基酸或聚糖残基中)附接螯合因子-接头而形成。在一些实施方案中,位点特异性缀合涉及对具有螯合因子-接头的框架区中的特定赖氨酸残基的定向官能化。在其他实施方案中,此残基可以用不同的反应性官能团官能化,然后在第二步中与螯合因子-接头反应以得到免疫缀合物。在一些实施方案中,此反应性官能团是硫代丙酸酯基。

[0217] 在一些实施方案中,将非天然半胱氨酸残基工程化到抗体的框架中,作为硫醇定

向缀合以得到免疫缀合物的位点。在一些实施方案中,将其他非天然氨基酸或氨基酸序列工程化到框架中以用作螯合因子-接头或第二反应性基团的附接位点,螯合因子-接头将缀合至所述附接位点以得到免疫缀合物。

[0218] 在一些实施方案中,将含有交联基团的非天然氨基酸工程化到框架中以用于附接螯合因子-接头。在一些实施方案中,这种非天然氨基酸含有叠氮化物。

[0219] 在一些实施方案中,螯合因子-接头通过转谷氨酰胺酶的作用附接至谷氨酰胺残基。在其他实施方案中,第二反应性基团通过转谷氨酰胺酶附接,将螯合因子-接头添加至转谷氨酰胺酶以得到免疫缀合物。

[0220] 在一些实施方案中,通过糖苷酶的作用,用反应性官能团修饰一个或多个N-聚糖,然后将螯合因子-接头缀合至所述位点,来附接螯合因子-接头。在一些实施方案中,通过 β -半乳糖苷酶的作用来修饰聚糖。在一些实施方案中,用含有叠氮化物的糖苷修饰聚糖,以用于附接适当官能化的螯合因子-接头。

[0221] 在一个实施方案中,免疫缀合物包含多于一种螯合剂,它们是相同或不同的。

[0222] 在一个实施方案中,具有多于一种螯合剂的免疫缀合物具有多于一种附接至同一抗原结合臂的螯合剂。

[0223] 在一个实施方案中,具有多于一种螯合剂和少于十一种螯合剂的免疫缀合物具有多于两种螯合剂、多于三种螯合剂、多于四种螯合剂、多于五种螯合剂、多于六种螯合剂、多于七种螯合剂、多于八种螯合剂或多于九种螯合剂。在一个实施方案中,螯合剂是相同的。在一个实施方案中,每个抗原结合臂直接或间接连接至多于一种螯合剂。

[0224] 在一个实施方案中,螯合剂包含放射性同位素螯合组分和允许与抗原结合臂共价附接的官能团。在一个实施方案中,官能团直接附接至放射性同位素螯合组分。在一个实施方案中,螯合剂还包含在官能团与放射性同位素螯合组分之间的接头。

[0225] 在一个实施方案中,放射性同位素螯合组分包括DOTA或DOTA衍生物。在一个实施方案中,放射性同位素螯合组分包括DOTAGA。在一个实施方案中,放射性同位素螯合组分包括macropa或macropa衍生物。在一个实施方案中,所述放射性同位素螯合组分包括Py4Pa或Py4Pa衍生物。

[0226] 在优选的实施方案中,免疫缀合物的螯合剂不与免疫缀合物的抗原结合臂中的抗原结合区附接。

[0227] 在一个实施方案中,免疫缀合物的螯合剂与抗原结合臂非共价缔合。在优选的实施方案中,螯合因子不与免疫缀合物的抗原结合臂中的抗原结合区缔合。

[0228] 在一个实施方案中,螯合剂包括DOTA或DOTA衍生物。在一个实施方案中,螯合剂包括DOTAGA。在一个实施方案中,螯合剂包括macropa或macropa衍生物。在一个实施方案中,螯合剂包括Py4Pa或Py4Pa衍生物。在一个实施方案中,螯合剂包括噬铁蛋白或噬铁蛋白衍生物。

[0229] 在某些实施方案中,螯合剂是放射性同位素螯合剂。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂选自自由以下组成的列表:四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、 α -(2-羧乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTAGA)或(Py4Pa)。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂是DOTA。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂是DOTAGA。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂是Py4Pa。在某些实施方案中,放射性同位素,其中放射

性同位素螯合剂直接与抗原结合区和/或免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂通过接头与抗原结合区或免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,接头选自:6-马来酰亚胺基己酰基(MC)、马来酰亚胺基丙酰基(MP)、缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)、对氨基苄氧基羰基(PAB)和通过与以下接头试剂缀合得到的那些:形成接头部分4-巯基戊酸的4-(2-吡啶基硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺酯(SPP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDB)、(4-碘代-乙酰基)氨基苯甲酸N-琥珀酰亚胺酯(SIAB)、聚乙二醇(PEG)、聚乙二醇聚合物(PEGn)和S-2-(4-异硫氰基苄基)(SCN)。在某些实施方案中,接头选自:聚乙二醇(PEG)、聚乙二醇聚合物(PEG)和S-2-(4-异硫氰基苄基)(SCN)。在某些实施方案中,接头是PEG5。在某些实施方案中,接头是SCN。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂是选自由以下组成的列表的接头-螯合因子:TFP-Ad-PEG5-DOTAGA、p-SCN-Bn-DOTA、p-SCN-Ph-Et-Py4Pa和TFP-Ad-PEG5-Ac-Py4Pa。

[0230] 在一些实施方案中,螯合因子以多肽(即,抗原结合区和/或免疫球蛋白重链恒定区)与螯合因子的预定比例缀合。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂以1:1至8:1的比例与抗原结合区和/或免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂以1:1至6:1的比例与抗原结合区和/或免疫球蛋白重链恒定区偶联。在某些实施方案中,放射性同位素螯合剂以2:1至6:1的比例与抗原结合区和/或免疫球蛋白重链恒定区偶联。

[0231] 例如,使用双功能螯合因子来将放射性同位素缀合至本发明的放射性同位素递送平台,以产生本发明的免疫缀合物。(参见例如,Scheinberg D,McDevitt M,Curr Radiopharm 4:306-20(2011))。本领域中已知的双功能螯合因子的例子包括DOTA、DTPA、DO3A-NHS、DOTAGA-NHS、DOTAGA-酸酐DOTAGA-TFP、p-SCN-Bn-DOTA、p-SCN-Bn-DTPA、p-SCN-Bn-CHX'A"-DTPA、p-SCN-Bn-TCMC、macropa-NCS、crown、p-SCN-Ph-Et-Py4Pa、3,2-HOPO和TCMC。

[0232] 双功能螯合因子的例子是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)以及前述的相关类似物。此类螯合因子适于配位金属离子,如 α 和 β 发射放射性核素。

[0233] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物的螯合剂选自双功能螯合因子、DOTA、DO3A-NHS、DOTAGA-NHS、DOTAGA-酸酐DOTAGA-TFP、p-SCN-Bn-DOTA、p-SCN-Bn-DTPA、p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA、p-SCN-Bn-TCMC、macropa-NCS(Thiele NA等人,Angew.Chem.Int.Ed.56:1(2017))、crown(Yang H等人,Chem.Eur.J.26:11435(2020))、P-SCN-Ph-Et-Py4Pa(Li L等人,Bioconjugate Chem.ASAP(2020))、3,2-HOPO(Wickstroem K等人,Int.J.Rad.Onc.Biol.Phys.105:410(2019)) (对这些和其他双功能螯合因子的综述,参见例如,Price EW和Orvig C Chem.Soc.Rev.,2014,43:260(2014)以及Brecht MW Q.J.Nucl.Med.Mol.Imaging 52:166(2008))。

[0234] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物的螯合剂选自双功能螯合因子、DOTA、DO3A-NHS、DOTAGA-NHS、DOTAGA-酸酐DOTAGA-TFP、p-SCN-Bn-DOTA、p-SCN-Bn-DTPA、p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA、p-SCN-Bn-TCMC、macropa-NCS(Thiele NA等人,Angew.Chem.Int.Ed.56:1(2017))、crown(Yang H等人,Chem.Eur.J.26:11435(2020))、P-SCN-Ph-Et-Py4Pa(Li L等人,Bioconjugate Chem.ASAP(2020))、3,2-HOPO(Wickstroem K

等人, Int. J. Rad. Onc. Biol. Phys. 105:410 (2019)) (对这些和其他双功能螯合因子的综述, 参见例如, Price EW 和 Orvig C Chem. Soc. Rev., 2014, 43:260 (2014) 以及 Brechbiel MW Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 52:166 (2008))。

[0235] 对于²²⁵Ac 免疫缀合物, 存在多种本领域中已知的无环和环状配体作为合适的螯合因子 (参见例如, Davis I 等人, Nucl Med Biol 26:581 (1999); Chappell L 等人, Bioconjug Chem 11:510 (2000); Chappell, L 等人, Nucl Med Biol 30:581 (2003); McDevitt M 等人, Appl Radiat Isot 57:841 (2002); Gouin S 等人, Org Biomol Chem 3:453 (2005); Thiele N 等人, Angew Chem Int Ed Engl 56:14712 (2017))。

[0236] 在某些实施方案中, 螯合因子是适于 α 发射体螯合的螯合因子。适于 α 发射体的一些螯合因子描述于 Yang 等人, “Harnessing α -Emitting Radionuclides for Therapy: Radiolabeling Method Review.” J Nucl Med. 2022 年 1 月; 63(1):5-13 中。

[0237] 在某些实施方案中, 适于 α 发射体螯合的螯合因子选自由以下组成的列表: DOTA, 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸; D03A, 1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷; DOTAGA, α -(2-羧乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸; DOTAGA 酸酐, (2,2',2''-(10-(2,6-二氧化四氢-2H-吡喃-3-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸; Py4Pa, 6,6',6'',6'''-(((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双(氮烷三基))-四(亚甲基))四皮考啉酸; Py4Pa-NCS, 6,6'-((((4-异硫氰吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双(羧甲基)氮烷二基))-双(亚甲基))二皮考啉酸; Crown, 2,2',2'',2'''-(1,10-二氧杂-4,7,13,16-四氮杂环-十八烷-4,7,13,16-四基)四乙酸; Macropa, 6,6'-((1,4,10,13-四氧杂-7,16-二氮杂环十八烷-7,16-二基)双(亚甲基))-二皮考啉酸; Macropa-NCS, 6-((16-((6-羧基吡啶-2-基)甲基)-1,4,10,13-四氧杂-7,16-二氮杂环十八烷-7-基)甲基)-4-异硫氰皮考啉酸; HEHA, 1,4,7,10,13,16-六氮杂环十六烷-1,4,7,10,13,16-六乙酸; CHXoctapa, 6,6'-[(1R,2R)-1,2-环己烷二基双[(羧甲基)亚氨基]亚甲基]]双[2-吡啶甲酸]; Bisp, 3,7-二氮杂双环[3.3.1]壬烷-1,5-二羧酸, 7-[(6-羧基-2-吡啶基)甲基]-9-羟基-3-甲基-2,4-二-2-吡啶基-, 1,5-二甲酯; Noneunpa, 6,6'-(((氧基双(乙烷-2,1-二基))双(羧甲基)氮烷二基))双(亚甲基))-二皮考啉酸; 及其组合。

[0238] 在某些实施方案中, 螯合因子是适于 β 或 γ 发射体螯合的螯合因子。在某些实施方案中, 适于 β 或 γ 发射体螯合的螯合因子选自由以下组成的列表: DOTMA, (1R,4R,7R,10R)-a,a',a'',a'''-四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸; DOTAM, (1,4,7,10-四(氨基甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷); DOTPA, 1,4,7,10-四氮杂环-十二烷-1,4,7,10-四丙酸; D03AM-乙酸, (2-(4,7,10-三(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)乙酸); DOTP, 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(亚甲基膦酸); DOTMP, 1,4,6,10-四氮杂环癸烷-1,4,7,10-四亚甲基膦酸; DOTA-4AMP, 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四(乙酰胺基-亚甲基膦酸); CB-TE2A, 1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷-4,11-二乙酸; NOTA, 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; NOTP, 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三(亚甲基膦酸); TETPA, 1,4,8,11-四氮杂环-十四烷-1,4,8,11-四丙酸; TETA, 1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸; PEPA, 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷-N,N',N'',N''',N''''-五乙酸; H4Octapa, N,N'-双(6-羧基-2-吡啶基甲基)-乙二胺-N,N'-二乙酸; H2Dedpa, 1,2-[[6-(羧基)-吡啶-2-基]-甲基氨基]乙烷; H6phospa, N,N'-(亚甲基膦酸酯)-N,N'-[6-(甲

氧基羰基)吡啶-2-基]-甲基-1,2-二氨基乙烷;TTHA,三亚乙基-四胺-N,N,N',N'',N''',N''''-六乙酸;D02P,四氮杂环十二烷二甲烷-膦酸;HP-D03A,羟丙基四氮杂环十二烷三乙酸;EDTA,乙二胺四乙酸;DTPA,二亚乙基三胺五乙酸;DTPA-BMA,二亚乙基三胺五乙酸-双甲基酰胺;HOP0,八齿羟基吡啶酮;3,2,3-LI (HOP0),N,N'-(丁烷-1,4-二基)双(1-羟基-N-(3-(1-羟基-6-氧代-1,6-二氢-吡啶-2-甲酰胺基)丙基)-6-氧代-1,6-二氢吡啶-2-甲酰胺);3,2-HOP0,N,N'-(((2-(4-氨基苄基)-3-((2-(3-羟基-1-甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-4-甲酰胺基)乙基)(2-(3-羟基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-4-甲酰胺基)乙基)氨基)-丙基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基))双(3-羟基-1-甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-4-甲酰胺);Neunpa,6,6'-(((氮烷二基双(乙烷-2,1-二基))双((羧甲基)氮烷二基))-双(亚甲基))二皮考啉酸;Neunpa-NCS,6,6'-((((4-异硫氰苯乙基)氮烷二基)-双(乙烷-2,1-二基))双((羧甲基)氮烷二基))双(亚甲基))二皮考啉酸;Octapa,6,6'-((乙烷-1,2-二基双((羧甲基)氮烷二基))双(亚甲基))二皮考啉酸;Octox,2,2'-(乙烷-1,2-二基双(((8-羟基喹啉-2-基)甲基)氮烷二基))二乙酸;PyPa,6,6'-((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双((羧甲基)氮烷二基))双(亚甲基))二皮考啉酸;卟啉,21,22,23,24-四氮杂五环[16.2.1.13,6.18,11.113,16]二十四-1,3,5,7,9,11(23),12,14,16,18(21),19-十一碳烯;去铁胺,30-氨基-3,14,25-三羟基-3,9,14,20,25-五氮杂三十烷-2,10,13,21,24-戊酮;DF0*,N1-[5-(乙酰基羟基氨基)-戊基]-N26-(5-氨基戊基)-N26,5,16-三羟基-4,12,15,23-四氧代-5,11,16,22-四氮杂二十六烷二酰胺;及其组合。

[0239] 在一些实施方案中,R¹包含选自由以下组成的列表的螯合部分:DOTA、D03A、D03Apic、DOTAGA、DOTAGA酸酐、Py4Pa、Py4Pa-NCS、Crown、Macropa、Macropa-NCS、HEHA、CHXoctapa、Bispa和Noneunpa或其放射性核素复合物。

[0240] 在一些实施方案中,R¹包含选自由以下组成的列表的螯合部分:DOTMA、DTPA、D03Apic、D03AM-乙酸、DOTP、DOTMP、DOTA-4AMP、CB-TE2A、NOTA、NOTP、TETPA、TETA、PEPA、H4Octapa、H2Dedpa、D02P、EDTA、DTPA-BMA、3,2,3-LI (HOP0)、3,2-HOP0、Neunpa、Neunpa-NCS、Octapa、PyPa、卟啉和去铁胺或其放射性核素复合物。

[0241] 在一些实施方案中,R¹是选自由以下组成的列表的螯合部分:

[0242] 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA);

[0243] 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸(D03A);

[0244] 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,7-二乙酸(D02A);

[0245] $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTMA);

[0246] 1,4,7,10-四(氨基甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(DOTAM);1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四丙酸(DOTPA);

[0247] 2,2',2''-(10-(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸;

[0248] 10-((6-羧基吡啶-2-基)甲基)-1,4,7,10-四-氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸(D03Apic);

[0249] 6,6'-(((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双((羧甲基)氮烷二基))-双(亚甲基))二皮考啉酸(H₄pypa);

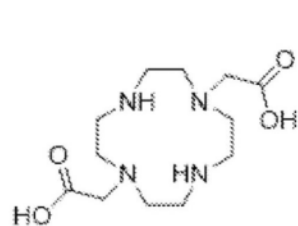
[0250] 6,6',6'',6'''-(((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双(氮烷三基))四(亚甲基))-四皮

考啉酸 (H_4py4pa) ; 和

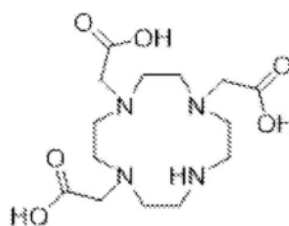
[0251] 3,6,9,12-四(羧甲基)-3,6,9,12-四氮杂十四烷二酸 (TTHA) ;

[0252] 或其放射性核素复合物。

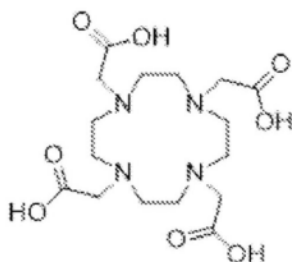
[0253] 在一些实施方案中, R^1 包含具有以下结构之一的螯合部分:



(DO2A),



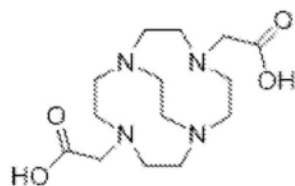
(DO3A),



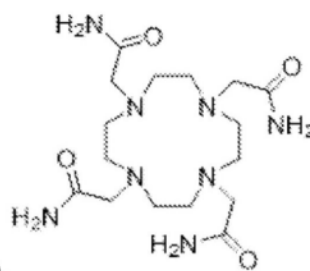
(DOTA),



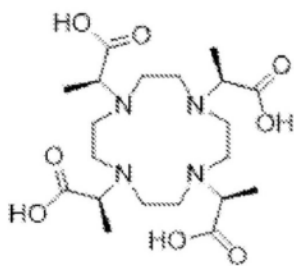
(DOTP),



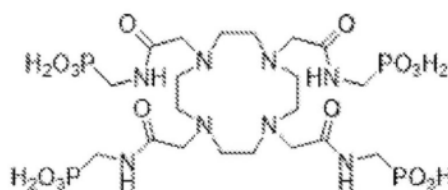
(CB-DO2A),



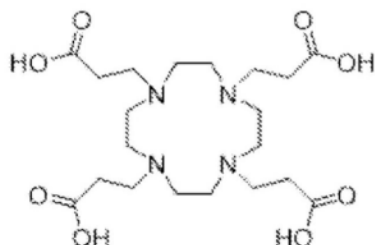
(DOTAM),



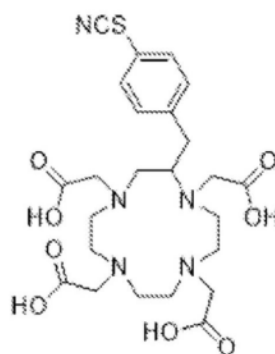
(DOTMA),



(DOTA-4AMP),

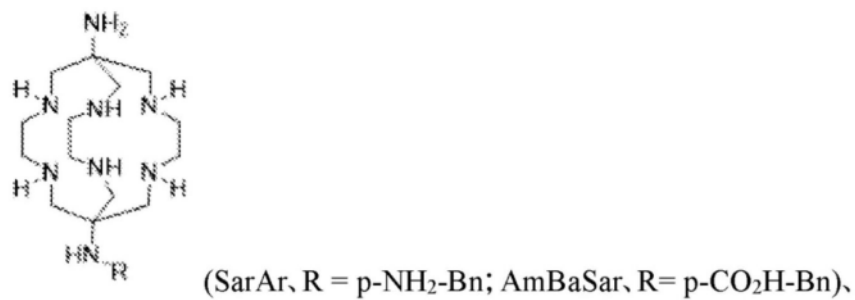
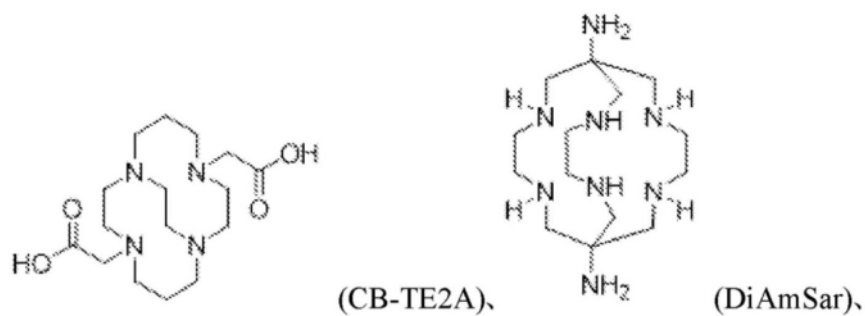
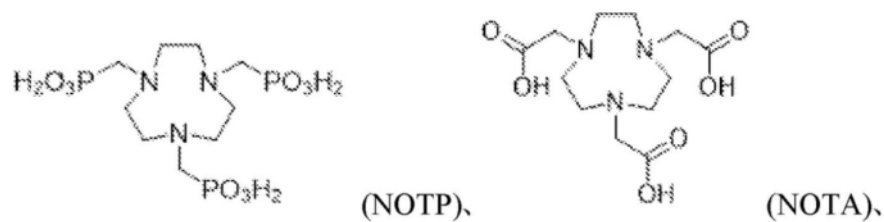
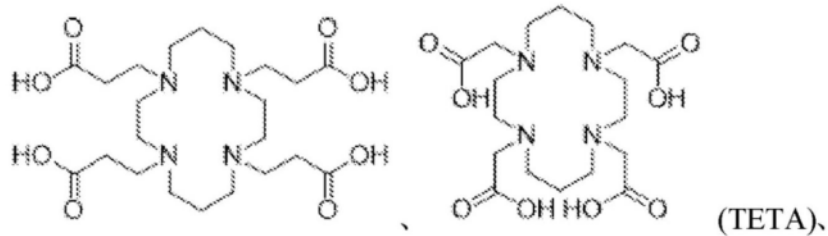
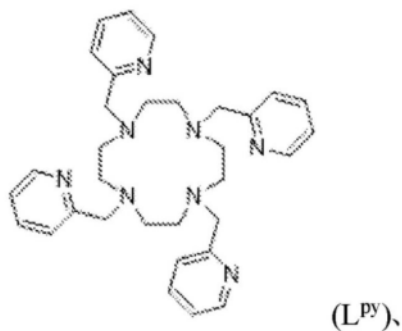
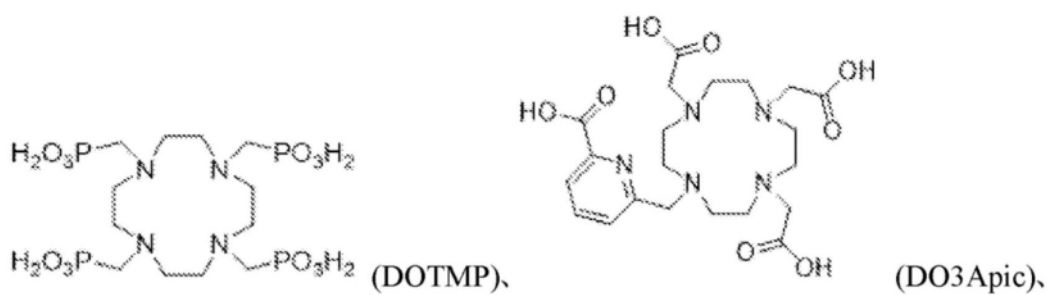


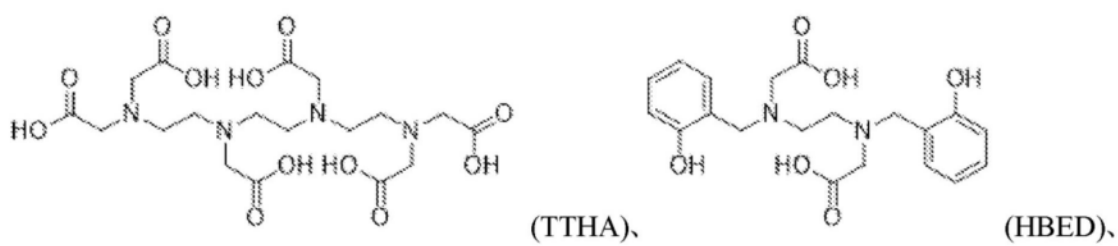
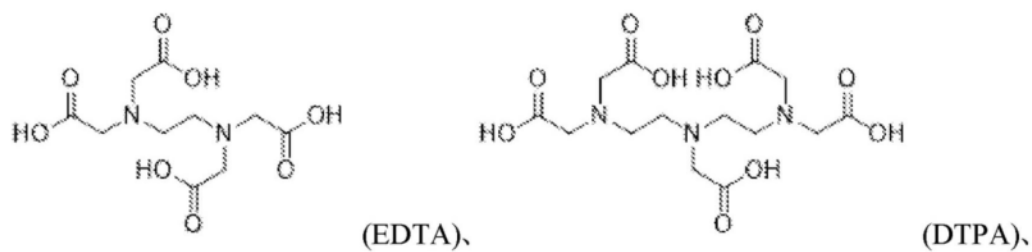
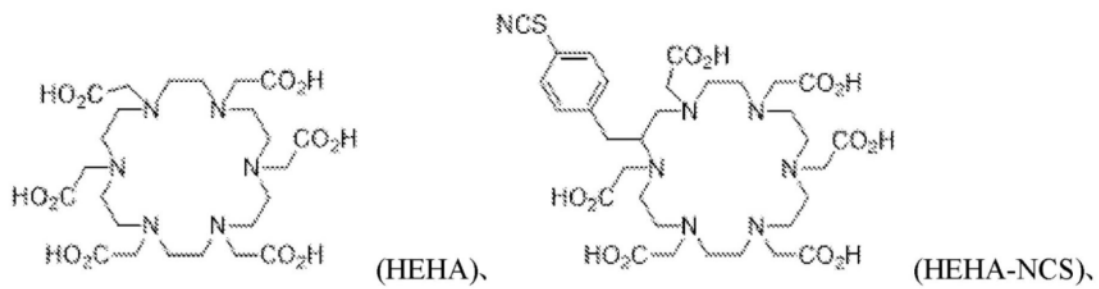
(DOTPA),



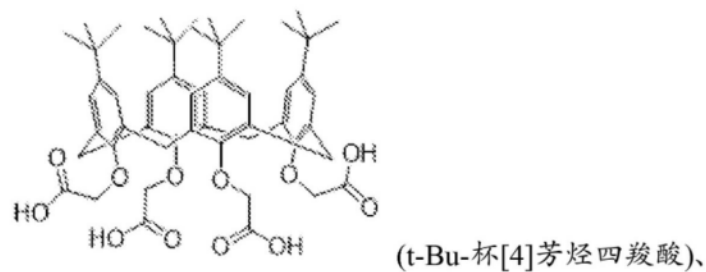
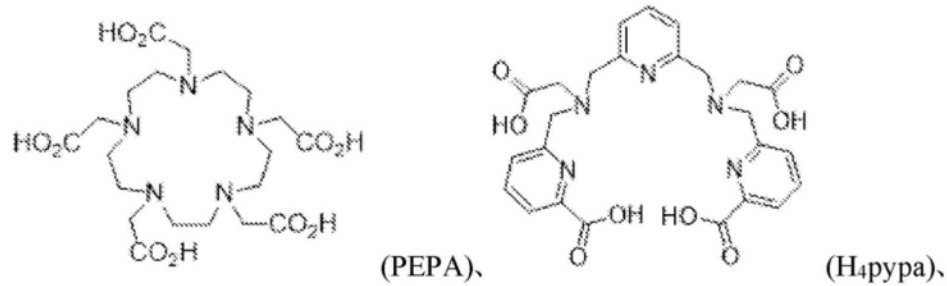
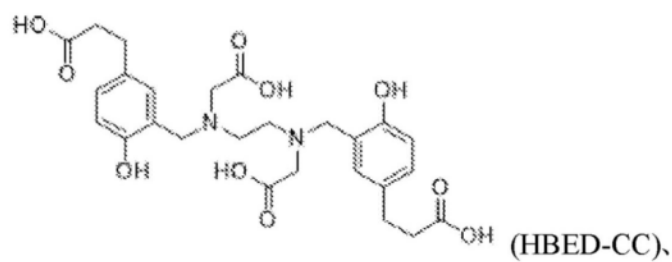
(p-SCN-Bn-DOTA),

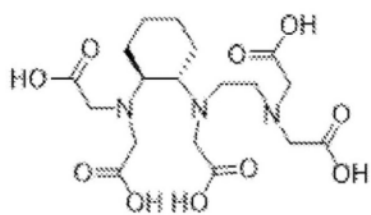
[0254]



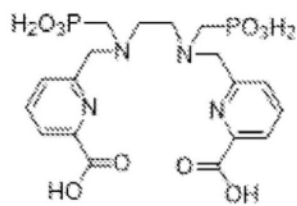
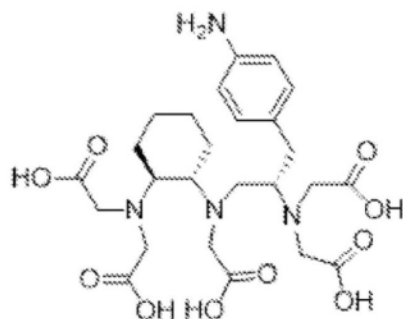
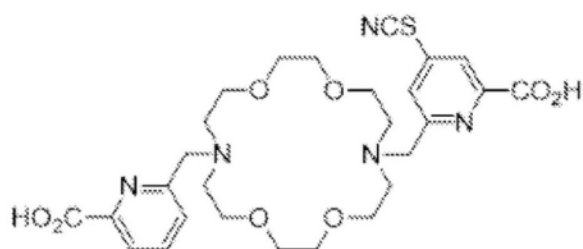


[0256]



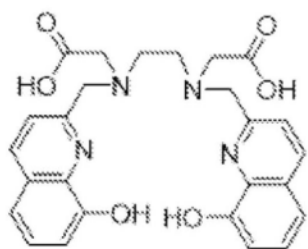
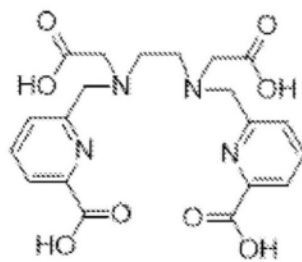
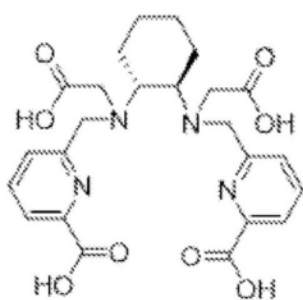
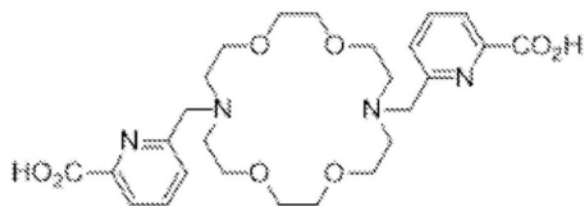
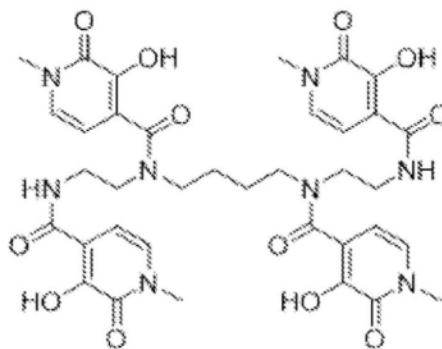


(CHX-A''-DTPA),

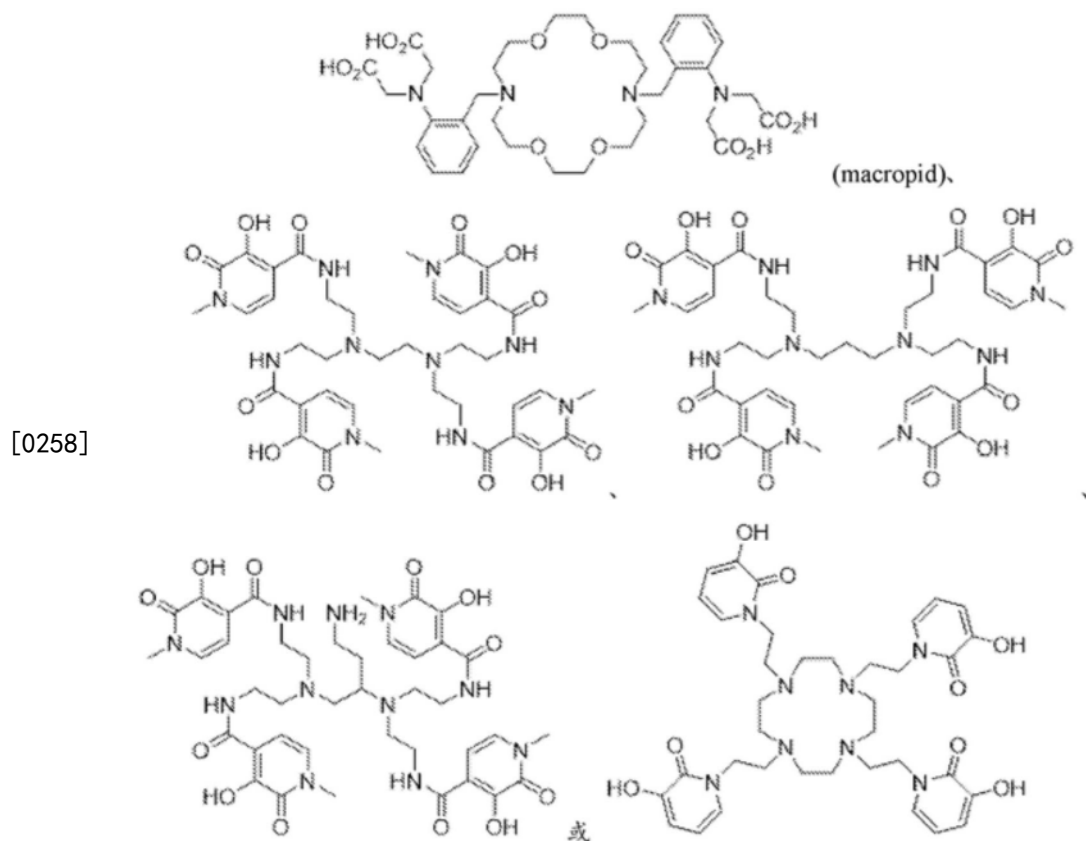
(H₆phospha),(p-NH₂-Bn-CHXA''-DTPA),

(macropa-NCS),

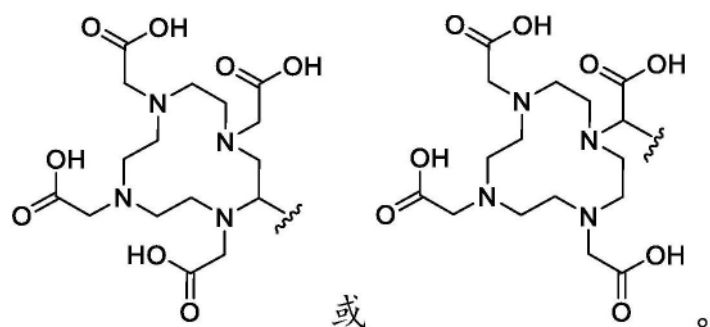
[0257]

(H₄octox),(H₄octapa),(H₄CHXoctapa),

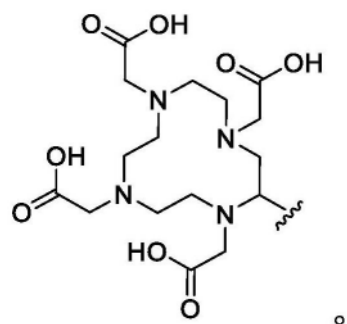
(macropa),



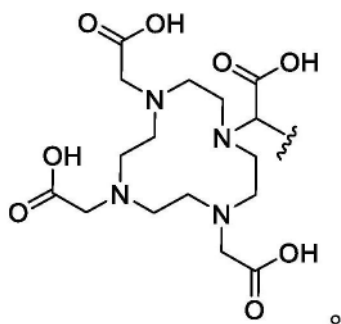
[0259] 在一些实施方案中, R^1 包含 DOTA 并在所示位置处与肿瘤靶向部分衔接:



[0260] 在一些实施方案中, R^1 包含 DOTA 并在所示位置处与肿瘤靶向部分衔接:



[0261] 在一些实施方案中, R^1 包含 DOTA 并在所示位置处与肿瘤靶向部分衔接:



[0262] 应理解,本文所述的免疫缀合物包含一个或多个 R^1 部分。在一些实施方案中,本文所述的免疫缀合物包含一个或多于一个 R^1 部分,其中每个 R^1 部分是相同的。

[0263] 放射性核素

[0264] 在一些实施方案中,本文所述的免疫缀合物中的放射性核素是俄歇电子发射放射性核素。在一些实施方案中,放射性核素是 α 发射放射性核素。在一些实施方案中,放射性核素是 β 发射放射性核素。在一些实施方案中,放射性核素是 γ 发射放射性核素。在一些实施方案中,在非肽靶向治疗性化合物中使用的放射性核素的类型可以针对癌症的具体类型、靶向部分(例如,非肽配体)的类型等进行定制。经过 α 衰变的放射性核素从其原子核发射 α 粒子(带有+2电荷的氦离子)。由于 α 衰变,子体核素比母体核素少2个质子和2个中子。这意味着在 α 衰变中,质子数减少2,而核子数减少4。经过 β 衰变的放射性核素从其原子核发射 β 粒子(电子)。在 β 衰变期间,中子之一变成质子和电子。质子留在原子核中,而电子以 β 粒子形式发射。这意味着在 β 衰变中,原子核失去中子但获得质子。在 γ 衰变中,处于激发态(较高能态)的原子核发射 γ 射线光子以变为较低能态。在 γ 衰变期间,质子数和核子数无变化。 γ 射线的发射通常伴随着 α 粒子和 β 粒子的发射。

[0265] 俄歇电子(AE)是由通过电子捕获(EC)而衰变的放射性核素(例如, ^{111}In 、镓-67(^{67}Ga)、锝-99m($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、铂-195m($^{195\text{m}}\text{Pt}$)、碘-125(^{125}I)和碘-123(^{123}I))发射的极低能电子。该能量沉积在纳米-微米距离上,导致高线性能量传递,这对于引起癌细胞致命损伤是有效的。因此,发射AE的放射性治疗剂具有治疗癌症的巨大潜力。

[0266] β 粒子是从原子核发射的电子。它们通常在组织中具有较长范围(为1-5mm),并且它们是最常用的。

[0267] α 粒子是从放射性原子的原子核发射出的氦核(两个质子和两个中子)。根据其发射能量,其可以在组织中移动50-100 μm 。它们带正电荷,并且数量级比电子大。 α 粒子的每移动路径长度上沉积的能量的量(称为“线性能量传递”)是电子的大约400倍。这导致沿其路径的损害比电子引起的损害大得多。 α 粒子轨迹导致大量复杂且大部分不可修复的DNA双链断裂。达到细胞毒性所需的吸收剂量与穿过细胞核的 α 粒子的数量有关。使用此作为量度,可以在细胞核的1至20个 α 粒子穿过的范围内达到细胞毒性。所得高效力与 α 粒子的短程(其减少正常器官毒性)的组合已引起对开发 α 粒子发射剂的浓厚兴趣。通常使用的 α 粒子发射体包括 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 和 ^{229}Th 。

[0268] 在一些实施方案中,放射性核素是诊断性或治疗性放射性核素。

[0269] 代表性放射性核素

[0270]

同位素	$t_{1/2}$ (h)	衰变模式
^{66}Ga	9.5	β^+ (56%), EC (44%)

^{67}Ga	78.2	EC (100%)
^{68}Ga	1.1	β^+ (90%), EC (10%)
^{111}In	67.2	EC (100%)
$^{114\text{m}}\text{In}$	49.5d	EC (100%)
^{114}In (子体)	73s	β^- (100%)
^{177}Lu	159.4	β^- (100%)
^{89}Zr	78.5	β^+ (23%), EC (77%)
^{212}Bi	1.1	α (36%), β^- (64%)
^{213}Bi	0.76	α (2.2%), β^- (97.8%)
^{212}Pb (子体是 ^{212}Bi)	10.6	β^- (100%)
^{225}Ac	240	α (100%)

[0271] 在一些实施方案中,放射性核素是俄歇电子发射放射性核素。在一些实施方案中,放射性核素是俄歇电子发射放射性核素,其是 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 或 $^{195\text{m}}\text{Pt}$ 。在一些实施方案中,放射性核素是俄歇电子发射放射性核素,其是 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

[0272] 在一些实施方案中,放射性核素是 α 发射放射性核素。在一些实施方案中,放射性核素是 α 发射放射性核素,其是 ^{225}Ac 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 或 ^{212}Pb 。在一些实施方案中,放射性核素是 α 发射放射性核素,其是 ^{225}Ac 。在一些实施方案中,放射性核素是 β 发射放射性核素。在一些实施方案中,放射性核素是 β 发射放射性核素,其是 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、铼-186 (^{186}Re)、铼-188 (^{188}Re)、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{153}Sm 、 ^{89}Sr 、金-198 (^{198}Au)、铒-169 (^{169}Er)、镝-165 (^{165}Dy)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{89}Zr 或锰-52 (^{52}Mn)。在一些实施方案中,放射性核素是 β 发射放射性核素,其是 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{89}Zr 。

[0273] 在一些实施方案中,放射性核素是 γ 发射放射性核素。在一些实施方案中,放射性核素是 γ 发射放射性核素,其是 ^{60}Co 钴-60 (^{60}Co)、钯-103 (^{103}Pd)、铯-137 (^{137}Cs)、镱-169 (^{169}Yb)、铱-192 (^{192}Ir)、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 或 ^{226}Ra 。

[0274] 接头

[0275] 在一些实施方案中,使用连接肿瘤靶向部分和放射性核素螯合因子部分 R^1 的接头。在一些实施方案中,L是疏水性接头。在一些其他实施方案中,L是亲水性接头。在一些实施方案中,接头是柔性的。在一些实施方案中,接头是刚性的。在一些实施方案中,接头是线性的。在其他实施方案中,接头是分支的。在一些实施方案中,分支接头允许与多于一个 R^1 部分缀合。在一些实施方案中,分支接头允许与细胞渗透肽(CPP)缀合以增强细胞渗透。在一些实施方案中,接头包含线性结构。在一些实施方案中,接头包含非线性结构。在一些实施方案中,接头包含分支结构。在一些实施方案中,接头包含环状结构。在一些实施方案中,接头包含一种或多种线性结构、一种或多种非线性结构、一种或多种分支结构、一种或多种环状结构、一种或多种柔性部分、一种或多种刚性部分或其组合。

[0276] 可以根据放射性核素螯合因子部分 R^1 与肿瘤靶向部分之间的线性原子数来观察接头长度,其中通过取围绕环的最短路径对环状部分进行计数。在一些实施方案中,接头的线性拉伸为在1至100个原子之间、在1-50个原子之间、在1-40个原子之间、在1-30个原子之间,在其他实施方案中为1-20个原子,在又其他实施方案中为1-15个原子,在又其他实施方案中为1-10个原子,以及在又其他实施方案中为1-5个原子。在一些实施方案中,接头的长度为选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10的下限和选自5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、

19、20、25和30的上限的范围。在一些实施方案中,接头的长度为选自10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20的下限和选自30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50的上限的范围。

[0277] 接头考虑因素包括对所得放射性免疫缀合物的物理或药代动力学性质(诸如溶解性、亲脂性、亲水性、疏水性、稳定性(或多或少稳定以及计划降解)、刚性、柔性、免疫原性、对抗体结合的调节等)的影响。

[0278] 最佳接头应将载剂mAb连接到放射性螯合因子上而不损害任一功能,在循环中提供稳定的连接,并在特定条件下降解。循环中的稳定性已被证明是构成成功使用这一策略的一个特别重要的因素。

[0279] 在恶性肿瘤中,肿瘤细胞的可及性能够通过特异性抗体靶向。在肿瘤细胞上表达但不在正常健康细胞上表达的抗原允许选择性靶向肿瘤细胞,同时避开非肿瘤细胞。用发射短程、高线性能量传递粒子的短寿命放射性核素标记的mAb代表治疗肿瘤的有吸引力的方式。这些短程粒子可能能够杀伤单个细胞,同时避开旁观者。用于放射免疫疗法中的高能 α -发射体包括 ^{211}At (砹-211)、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 和 ^{225}Ac 。后一种同位素是体内同位素生成器,因为它具有长(10天)半衰期并经由三个短寿命原子的 α 发射而衰变,每个原子产生一个 α 粒子。

[0280] 在一些情形下,对肿瘤靶向 ^{225}Ac 放射免疫疗法的一般用途的限制是放射性免疫缀合物对正常组织的过度辐射。除靶向白血病的抗体外,大部分(>99%)注射的抗体剂量仍在血液中循环或与靶肿瘤不缔合。延长非靶向抗体的循环时间(通常为数天至数周)导致分解代谢或保留蛋白质和肽的正常器官(主要是肝脏和肾脏)的辐射暴露。

[0281] 在 α 发射体的体内衰变的情况下,其安全使用的另外的主要潜在障碍是在初始放射性核素的初始衰变之后顺序释放三个未螯合的 α 发射子体原子。吸收至诸如肾脏或肝脏的器官中可能引起毒性。克服非靶向放射性免疫缀合物的长循环时间的一种有吸引力的方法是开发允许条件释放所螯合的放射性有效载荷的接头。在放射性螯合物与mAb之间的连接中引入切割位点意味着允许低分子量放射性螯合物从其载剂mAb中释放及其在放射性缀合物已积聚在代谢器官中后的后续快速清除。然后,所螯合的放射性金属通过肾脏快速清除身体,从而降低毒性。已经使用二硫键、酯键、酒石酰胺键和肽键尝试了此策略(Kukis DL等人,Cleavable linkers to enhance selectivity of antibody-targeted therapy of cancer.Cancer Biother Radiopharm.2001;16:457-467;Quadri SM,Vriesendorp HM.Effects of linker chemistry on the pharmacokinetics of radioimmunoconjugates.Q J Nucl Med.1998;42:250-261)。最佳接头应将载剂mAb连接到放射性螯合因子上而不损害任一功能,在循环中提供稳定的连接,并在特定条件下降解。循环中的稳定性已被证明是构成成功使用这一策略的一个特别重要的因素。

[0282] 通常比血清中的酯和二硫化物更稳定的肽接头在放射性免疫缀合物和抗体-药物缀合物(ADC)的设计中是最成功的。研究最广泛的肽接头对组织蛋白酶敏感。更准确地说,已显示并入二肽缬氨酸-瓜氨酸的ADC进入靶细胞并迁移至溶酶体,在溶酶体中它们在半胱氨酸蛋白酶的作用下特异性释放药物。从放射性免疫缀合物中释放放射性核素的最先进的策略基于组织蛋白酶敏感的肽接头(DeNardo GL等人,Preclinical evaluation of cathepsin-degradable peptide linkers for radioimmunoconjugates.Clin Cancer Res.2003;9:3865S-3872S;DeNardo GL等人Comparison of 1,4,7,10-

tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA)-peptide-ChL6, a novel immunoconjugate with catabolizable linker, to 2-iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl]-DOTA-ChL6 in breast cancer xenografts. Clin Cancer Res. 1998;4:2483-2490; DeNardo SJ 等人 Enhanced therapeutic index of radioimmunotherapy (RIT) in prostate cancer patients: comparison of radiation dosimetry for 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA)-peptide versus 2IT-DOTA monoclonal antibody linkage for RIT. Clin Cancer Res. 2003;9:3938S-3944S)。在一些情形下,使用组织蛋白酶B不稳定的放射性缀合物(例如,甘氨酸甘氨酸甘氨酸-L-p-异硫氰苯丙氨酸-)表现出肝脏剂量降低,并观察到肿瘤剂量略微增加(DeNardo GL 等人, Clin Cancer Res. 2003;9:3865S-3872S; DeNardo GL 等人 Clin Cancer Res. 1998;4:2483-2490)。

[0283] 在一些实施方案中,接头包含一个或多个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头包含1至3、1至5、1至10、5至10或5至20个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头的一个或多个氨基酸是非天然氨基酸。

[0284] 在一些实施方案中,接头可以包含柔性和/或刚性区域。示例性柔性接头区域包括包含Gly和Ser残基(“GS”接头)、甘氨酸残基、亚烷基链、PEG链等的那些。示例性刚性接头区域包括包含形成 α 螺旋的序列、富含脯氨酸的序列和富含双键和/或三键的区域的那些。

[0285] 在一些实施方案中,接头包括肽基接头。在一些实施方案中,肽基接头的长度可以在3-20个氨基酸之间,诸如单个氨基酸残基(例如聚甘氨酸)的重复序列或氨基酸残基的组合,以产生赋予有利药代动力学的肽接头。

[0286] 在一些实施方案中,接头包含肽键。肽键包含L-氨基酸和/或D-氨基酸。在一些实施方案中,优选D-氨基酸以使免疫原性和背景肽酶或蛋白酶的非特异性切割最小化。已知寡聚-D-精氨酸序列的细胞摄取与寡聚-L-精氨酸一样好或比其更好。

[0287] 在一些实施方案中,接头是可切割的。在一些实施方案中,接头被设计为在特定条件存在下或在特定环境中切割,此类条件或环境靠近此类靶细胞、组织或区域。可切割接头依赖细胞的胞质隔室对细胞毒性药物选择性释放的固有特性。此类接头主要包括对低pH(酸不稳定接头)或还原环境(二硫化物接头)有反应的可化学切割接头,以及对某些溶酶体酶(肽接头或 β -葡萄糖苷酸接头)的作用敏感的可酶促切割接头。

[0288] 在一些实施方案中,接头在生理条件下是可切割的。在一些实施方案中,接头在细胞内条件下是可切割的。在一些实施方案中,接头是可化学切割的。在一些实施方案中,接头是可酶促切割的(例如,蛋白酶敏感、肽酶敏感)接头。在一些实施方案中,接头是pH敏感的,即,在某些pH值下对水解敏感。例如,pH敏感接头可以在酸性条件下是可水解的。例如,接头可以是在溶酶体中可水解的酸不稳定接头(例如,脲、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺-乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等)。此类接头在中性pH条件下(诸如在血液中)可以是相对稳定的,但低于pH 7.0(诸如pH 6.5-4.5,溶酶体和/或核内体的近似pH)时不稳定。

[0289] 在一些实施方案中,接头被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或核内体蛋白酶)切割。在一些实施方案中,接头被糖苷酶(例如葡萄糖醛酸糖苷酶)切割。 β -葡萄糖苷酸接头可以容易被丰富的溶酶体酶 β -葡萄糖醛酸糖苷酶切割,这促进活性药物的容易和选择性释放。在其他实施方案中,接头是不可切割的。

[0290] 在一些实施方案中,接头组分包含氨基酸单元。在一个这样的实施方案中,氨基酸单元允许蛋白酶切割接头,从而在暴露于细胞内蛋白酶(诸如溶酶体酶)后促进药物从免疫缀合物中释放。示例性氨基酸单元包括但不限于二肽、三肽、四肽和五肽。示例性二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)、苯丙氨酸-赖氨酸(fk或phe-lys)或N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(Me-val-cit)。这些二肽接头在血清中显示出良好的稳定性,但是在内化后可被某些溶酶体蛋白酶(诸如组织蛋白酶B)识别并快速水解。示例性三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。

[0291] 氨基酸单元可以包含天然存在的氨基酸残基以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物(诸如瓜氨酸)。可以设计氨基酸单元并优化其对于特定酶(例如,肿瘤相关蛋白酶,组织蛋白酶B、C和D,或纤溶酶蛋白酶)的酶促切割的选择性。

[0292] 在一些实施方案中,接头被蛋白酶、基质金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶或其组合切割。在一些实施方案中,接头被还原剂切割。在一些实施方案中,接头被氧化剂或氧化应激切割。

[0293] 在一些实施方案中,接头被MMP切割。基质金属蛋白酶(MMP)的水解活性与转移性肿瘤细胞的侵袭性迁移有关。在一些实施方案中,接头包括被金属蛋白酶MMP-2、MMP-9或MMP-7(癌症和炎症所涉及的MMP)切割的氨基酸序列PLG-C(Me)-AG、PLGLAG。

[0294] 在一些实施方案中,接头被蛋白水解酶或还原环境切割,如可以在癌细胞附近发现的。此类环境或此类酶通常不在正常细胞附近发现。

[0295] 在一些实施方案中,接头被丝氨酸蛋白酶(包括但不限于凝血酶和组织蛋白酶)切割。在一些实施方案中,接头被组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶W、组织蛋白酶F、组织蛋白酶A、组织蛋白酶C、组织蛋白酶H、组织蛋白酶Z或其任何组合切割。在一些实施方案中,接头被组织蛋白酶K和/或组织蛋白酶S切割。

[0296] 在一些实施方案中,接头在坏死环境中被切割。坏死通常导致可用于触发接头切割的酶或其他细胞内容物的释放。在一些实施方案中,通过坏死酶(例如,通过钙蛋白酶)发生接头的切割。

[0297] 在一些实施方案中,接头包含一个或多个二硫键。

[0298] 可替代地,接头可以是非肽基接头。这些类型的接头的典型例子是基于不同长度的直链或支链烃或聚乙二醇的那些。这些可以掺入其他基团以影响溶解度、刚性、等电点,诸如芳香环或非芳香环、卤素、酮、醛、酯、磺酰基、磷酸酯基团等。

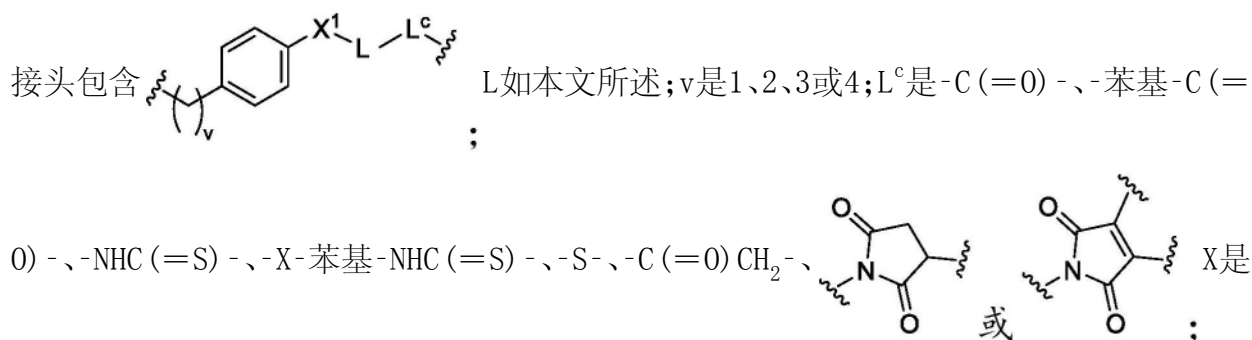
[0299] 在一些实施方案中,接头组分是“自杀式的(self-immolative)”或“非自杀式的”。“非自杀式的”间隔序列单元是其中部分或全部间隔序列单元在酶促(例如,蛋白水解)切割后保持与缀合物部分结合的间隔序列单元。非自杀式间隔序列单元的例子包括但不限于甘氨酸间隔序列单元和甘氨酸-甘氨酸间隔序列单元。也考虑了对序列特异性酶促切割敏感的肽间隔序列的其他组合。例如,通过肿瘤细胞相关蛋白酶酶促切割甘氨酸-甘氨酸间隔序列单元将导致甘氨酸-甘氨酸-药物部分从免疫缀合物的剩余部分中释放。在一个这样的实施方案中,然后使甘氨酸-甘氨酸-药物部分在肿瘤细胞中经历单独的水解步骤,从而从螯合因子部分切割甘氨酸-甘氨酸间隔序列单元。

[0300] “自杀式的”间隔序列单元允许释放药物部分,而无需单独的水解步骤。在某些实施方案中,接头的间隔序列单元包含对氨基苄基单元。在一个这样的实施方案中,对氨基苄

醇经由酰胺键附接到氨基酸单元,并且在苄醇与细胞毒性剂之间形成氨基甲酸酯、氨基甲酸甲酯或碳酸酯(参见例如,Hamann等人(2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15: 1087-103)。在一个实施方案中,间隔序列单元是对氨基苄氧基羰基(PAB)。在某些实施方案中,对氨基苄基单元的亚苄基部分被 Q_m 取代,其中Q是卤素、硝基、氰基、 $-OH$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 、 $-NHC(=O)R^5$ 和经取代的 C_1-C_6 烷基,其中经取代的 C_1-C_6 烷基被 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 和 $-NHC(=O)R^5$ 取代;并且m是0-4的整数(例如,参见Yam B. Poudel等人,ACS Medicinal Chemistry Letters 2020 11(11),2190-2194)。自杀式间隔序列单元的例子还包括但不限于在电子上与对氨基苄醇类似的芳香族化合物(参见例如,US2005/0256030 A1),诸如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237)以及邻或对氨基苄基缩醛。可以使用在酰胺键水解后进行环化的间隔序列,诸如经取代的和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等人,Chemistry Biology,1995,2,223);适当取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环体系(Storm等人,J. Amer. Chem. Soc.,1972,94: 5815);以及2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等人,J. Org. Chem.,1990,55:5867)。消除在甘氨酸的 α 位置被取代的含胺药物(Kingsbury等人,J. Med. Chem.,1984,27:1447)也是ADC中可用的自杀式间隔序列的例子。

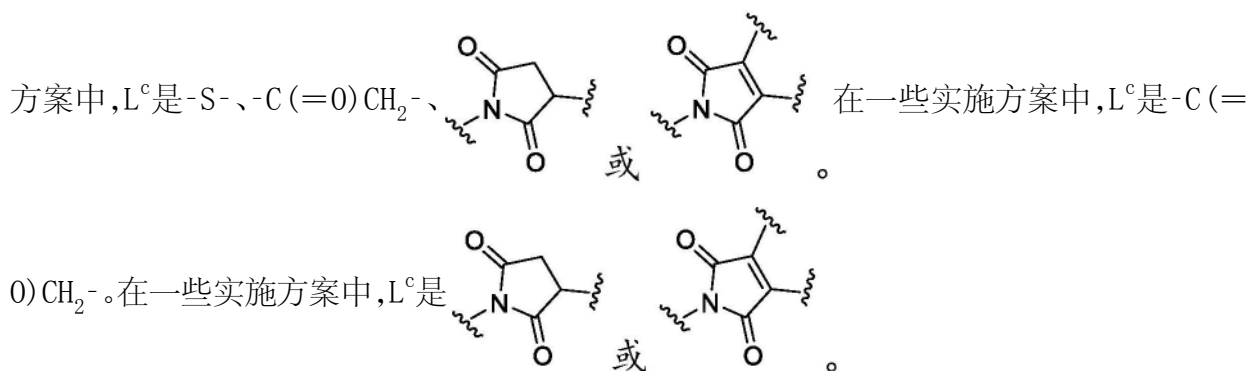
[0301] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含接头,诸如例如树突型接头,以通过分支的多功能接头部分将多于一个药物部分共价附接至抗体(Sun等人(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-5;Sun等人(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-8)。树突状接头可以增加药物与抗体的摩尔比,即负载,其与ADC的效力有关。因此,在半胱氨酸工程化抗体仅带有一个反应性半胱氨酸硫醇基团时,多个药物部分可以通过树突状接头附接。

[0302] 在一些实施方案中,连接肿瘤靶向部分与螯合部分(R^1)或其放射性核素复合物的



不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$; 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基。

[0303] 在一些实施方案中, L^c 是 $-C(=O)-$ 。在一些实施方案中, L^c 是 $-苯基-C(=O)-$ 。在一些实施方案中, L^c 是 $-NHC(=S)-$ 。在一些实施方案中, L^c 是 $-X-苯基-NHC(=S)-$ 。在一些实施方案中,X是不存在的或 $-NHC(=S)NH-$ 。在一些实施方案中, L^c 是 $-NHC(=S)NH-$ 。在一些实施



[0304] 在一些实施方案中, X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-(C_1-C_6\text{亚烷基})-X^2-$ 或 $-(C_4-C_{20}\text{聚乙二醇})-X^2-$; X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$; X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸, 其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代。

[0305] 在一些实施方案中, X^1 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 或 $-C(=O)NR^a-$ 。在一些实施方案中, X^1 是 $-O-$ 。在一些实施方案中, X^1 是不存在的、 $-S-$ 。在一些实施方案中, X^1 是 $-NR^a-$ 。在一些实施方案中, X^1 是 $-C(=O)-$ 。在一些实施方案中, X^1 是 $-C(=O)NR^a-$ 。

[0306] 在一些实施方案中, X^1 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 或 $-C(=O)NR^a-$ 。

[0307] 在一些实施方案中, X^1 是 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 。在一些实施方案中, X^1 是 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2-X^2-$ 或 $-CH_2CH_2-X^2-$ 。在一些实施方案中, X^1 是 $-CH_2CH_2-$ 。在一些实施方案中, X^1 是 $-CH_2CH_2-X^2-$ 。在一些实施方案中, X^2 是 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$ 。在一些实施方案中, X^2 是 $-C(=O)-$ 。在一些实施方案中, X^2 是 $-C(=O)NR^a-$ 。在一些实施方案中, X^2 是 $-C(=O)X^4-$ 。

[0308] 在一些实施方案中, X^1 是 $-CH_2CH_2-$ 或 $-CH_2CH_2-X^2-$; X^2 是 $-C(=O)X^4-$; X^4 是 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_2CH_3)-$ 、 $-NHS(=O)_2-$ 、 $-N(CH_3)S(=O)_2-$ 、 $-N(CH_2CH_3)S(=O)_2-$ 、赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸-缬氨酸-赖氨酸、甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸、酪氨酸-精氨酸-缬氨酸、精氨酸-缬氨酸或其组合; 其中氨基酸的任何游离胺 ($-NH_2$) 任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代。在一些实施方案中, X^4 是 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_2CH_3)-$ 、 $-NHS(=O)_2-$ 、 $-N(CH_3)S(=O)_2-$ 或 $-N(CH_2CH_3)S(=O)_2-$ 。在一些实施方案中, X^4 是 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 或 $-N(CH_2CH_3)-$ 。在一些实施方案中, X^4 是 $-NHS(=O)_2-$ 、 $-N(CH_3)S(=O)_2-$ 或 $-N(CH_2CH_3)S(=O)_2-$ 。在一些实施方案中, X^4 是赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸-缬氨酸-赖氨酸、甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸、酪氨酸-精氨酸-缬氨酸、精氨酸-缬氨酸或其组合; 其中氨基酸的任何游离胺 ($-NH_2$) 任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代。

[0309] 在一些实施方案中, L是 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 、 $-L^5-$ 、 $-L^1-L^2-L^3-L^4-L^5-$ 或其组合;

[0310] L^1 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、未取代的或经取代的 C_2-C_{20} 亚烯基、未取代的或经取代的 C_2-C_{20} 亚炔基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、 $-(X^3CH_2CH_2)_t-$ 、未取代的或经取代的环亚烷基、未取代的或经取代的杂环亚烷基、未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

[0311] 每个 X^3 独立地选自0和 NR^4 ;

[0312] 每个 t 独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12; L^2 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p$;

[0313] 每个 R^4 独立地选自氢和 C_1-C_6 烷基;

[0314] 每个 m 独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;

[0315] 每个 p 独立地是0、1或2;

[0316] L^3 是不存在的, 或是一个或多个独立选择的选自以下的基团: 天然或非天然氨基酸以及任选的氨基(未取代的或经取代的苄基)氨基甲酸酯; 其中氨基酸的任何游离胺($-NH_2$)任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代, 其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代, 并且其中经取代的苄基被1或2个选自卤素、 $-OH$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 、 $-NHC(=O)R^5$ 和经取代的 C_1-C_6 烷基的基团取代, 其中经取代的 C_1-C_6 烷基被 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 和 $-NHC(=O)R^5$ 取代;

[0317] L^4 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-(X^3CH_2CH_2)_n-$;

[0318] 每个 n 独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;

[0319] 每个 q 独立地是0、1或2;

[0320] L^5 是不存在的、 $-C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2)_n-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-(X^3CH_2CH_2)_n-$;

[0321] 每个 n 独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;

[0322] 每个 q 独立地是0、1或2;

[0323] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

[0324] 每个 R^b 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

[0325] 其中杂亚烷基是其中一个碳原子被 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-S(=O)(=NR^5)-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-P(=O)OR^b-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=N-CN)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=N-R^5)NR^a-$ 或 $-NR^aC(=O)O-$ 替代的亚烷基;

[0326] 其中当 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 和 $-L^5-$ 中的任一个被取代时, 则 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 和 $-L^5-$ 被1、2、3或4个选自卤素、 $-OH$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 、 $-NHC(=O)R^5$ 和经取代的 C_1-C_6 烷基的基团取代, 其中经取代的 C_1-C_6 烷基被 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 和 $-NHC$

(=O)R⁵取代;

[0327] 每个R⁵独立地选自C₁-C₁₀烷基、C₄-C₃₀聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基。

[0328] 在一些实施方案中,L是-L¹-、-L²-、-L³-、-L⁴-、-L⁵-、-L¹-L²-L³-L⁴-L⁵-或其组合。

[0329] 在一些实施方案中,L是-L¹-。在一些实施方案中,L是-L²-。在一些实施方案中,L是-L³-。在一些实施方案中,L是-L⁴-。在一些实施方案中,L是-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L¹-L²-。在一些实施方案中,L是-L¹-L³-。在一些实施方案中,L是-L¹-L⁴-。在一些实施方案中,L是-L¹-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L²-L³-。在一些实施方案中,L是-L²-L⁴-。在一些实施方案中,L是-L²-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L³-L⁴-。在一些实施方案中,L是-L³-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L⁴-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L¹-L²-L³-。在一些实施方案中,L是-L¹-L²-L⁴-。在一些实施方案中,L是-L¹-L²-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L¹-L⁴-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L¹-L²-L³-L⁴-。在一些实施方案中,L是-L²-L³-L⁴-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L¹-L²-L⁴-L⁵-。在一些实施方案中,L是-L¹-L²-L³-L⁴-L⁵-。

[0330] 在一些实施方案中,杂亚烷基是其中一个碳原子被-O-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-S(=O)(=NH)-、-S(=O)(=NR⁵)-、-NR⁵-、-P(=O)OH-、-NHC(=O)-、-C(=O)NH-、-OC(=O)NH-、-NHC(=N-CN)NH-或-NHC(=N-R⁵)NH-替代的亚烷基。

[0331] 在一些实施方案中,杂亚烷基是其中一个碳原子被-S(=O)(=NH)-、-S(=O)(=NR⁵)-、-P(=O)OH-、-NHC(=N-CN)NH-或-NHC(=N-R⁵)NH-替代的亚烷基。

[0332] 在一些实施方案中,L¹是未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₂₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的C₃-C₈环亚烷基、未取代的或经取代的单环C₃-C₈杂环亚烷基、未取代的或经取代的亚苯基、未取代的或经取代的单环杂亚芳基。

[0333] 在一些实施方案中,L¹是未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₁₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基。

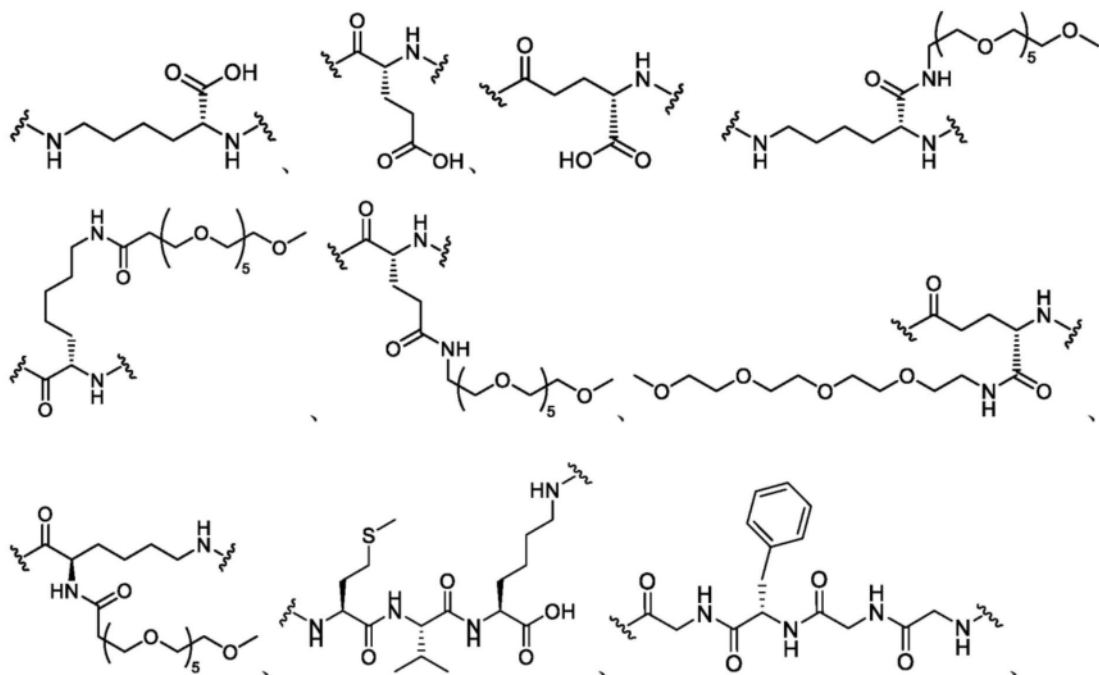
[0334] 在一些实施方案中,L²是不存在的、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基)-、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基)-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-;每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是1或2。

[0335] 在一些实施方案中,L³是不存在的,或是一个或多个独立选择的选自以下的基团:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸和氨基(未取代的或经取代的苄基)氨基甲酸酯;其中氨基酸的任何游离胺任选地被R⁵或-C(=O)(R⁵)取代,并且氨基酸的任何游离羧酸任选地被-C(=O)NH(R⁵)替代。

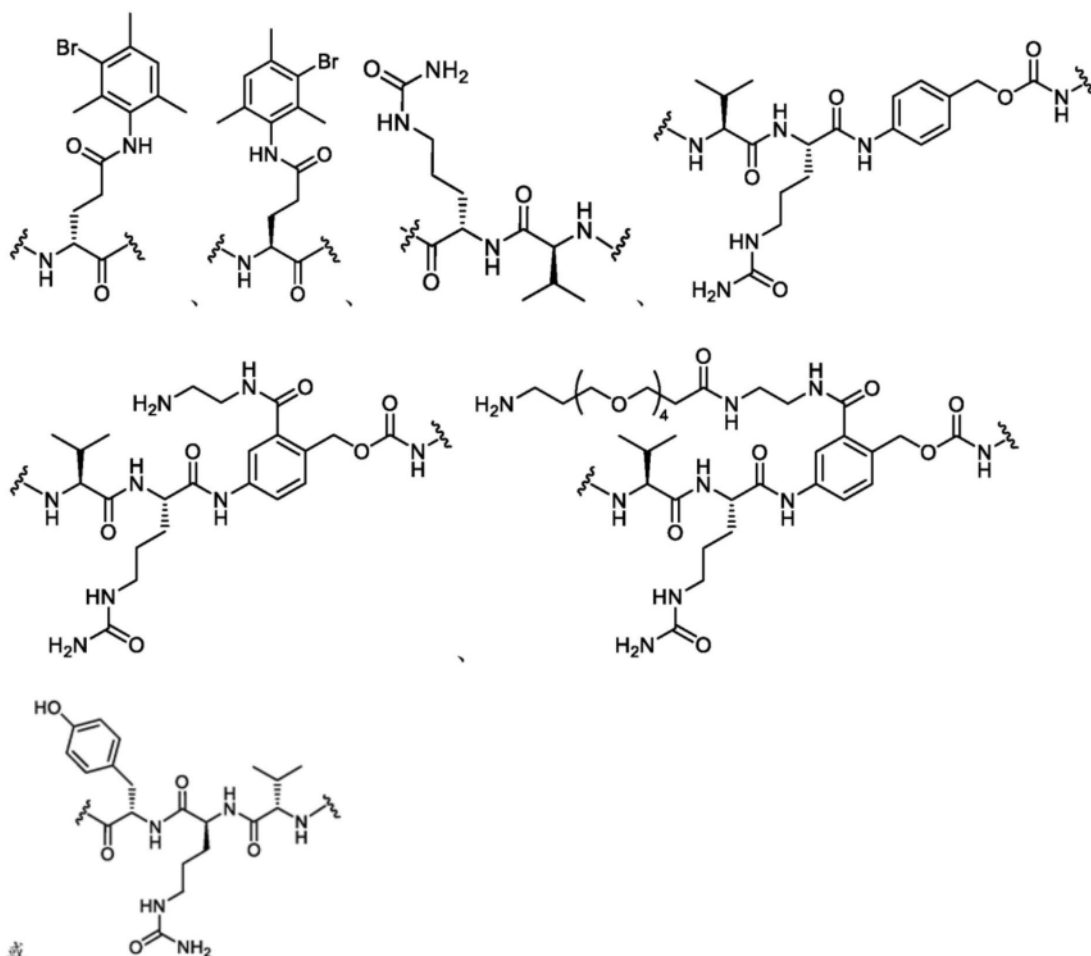
[0336] 在一些实施方案中,L³是赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸-缬氨酸-赖氨酸、甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸、酪氨酸-精氨酸-缬氨酸、精氨酸-缬氨酸、缬氨酸-瓜氨酸-(对氨基苄基氨基甲酸酯)或其组合;其中氨基酸的任何游离胺(-NH₂)任选地被-C(=O)(未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基)或-C(=O)-C₄-C₂₀聚乙二醇取代;其中任何氨基酸的任何游离羧酸(-CO₂H)任选地被-C(=O)NH-(2,4,6-三甲基-3-溴苯基)、-C(=O)NH-(未取代的或经取代

的 C_1 - C_{20} 亚烷基)或 $-C(=O)NH-$ (C_4 - C_{20} 聚乙二醇)替代。

[0337] 在一些实施方案中, L^3 是:



[0338]



[0339] 在一些实施方案中, L^4 是不存在的、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1 - C_6 亚烷

基) -、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基) -、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基) -、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。

[0340] 在一些实施方案中,L⁵是不存在的、-C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)NR⁴-(CH₂)_n-、-NR⁴C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)-(OCH₂CH₂)_n-或-(OCH₂CH₂)_n-;每个p独立地是0、1或2。

[0341] 在一些实施方案中,L⁵是不存在的、-NR⁴C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;每个q独立地是1或2。

[0342] 在一些实施方案中,

[0343] L¹是未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₁₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基;

[0344] L²是不存在的、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基) -、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基) -、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-;每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是1或2;

[0345] L⁴是不存在的、-C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基) -、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基) -、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基) -、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;

[0346] L⁵是-NR⁴C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。

[0347] 在一些实施方案中,

[0348] L¹是未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₁₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基;

[0349] L²是不存在的、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基) -、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基) -、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-;每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是1或2;

[0350] L⁴是不存在的;L⁵是不存在的、-NR⁴C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。

[0351] 在一些实施方案中,

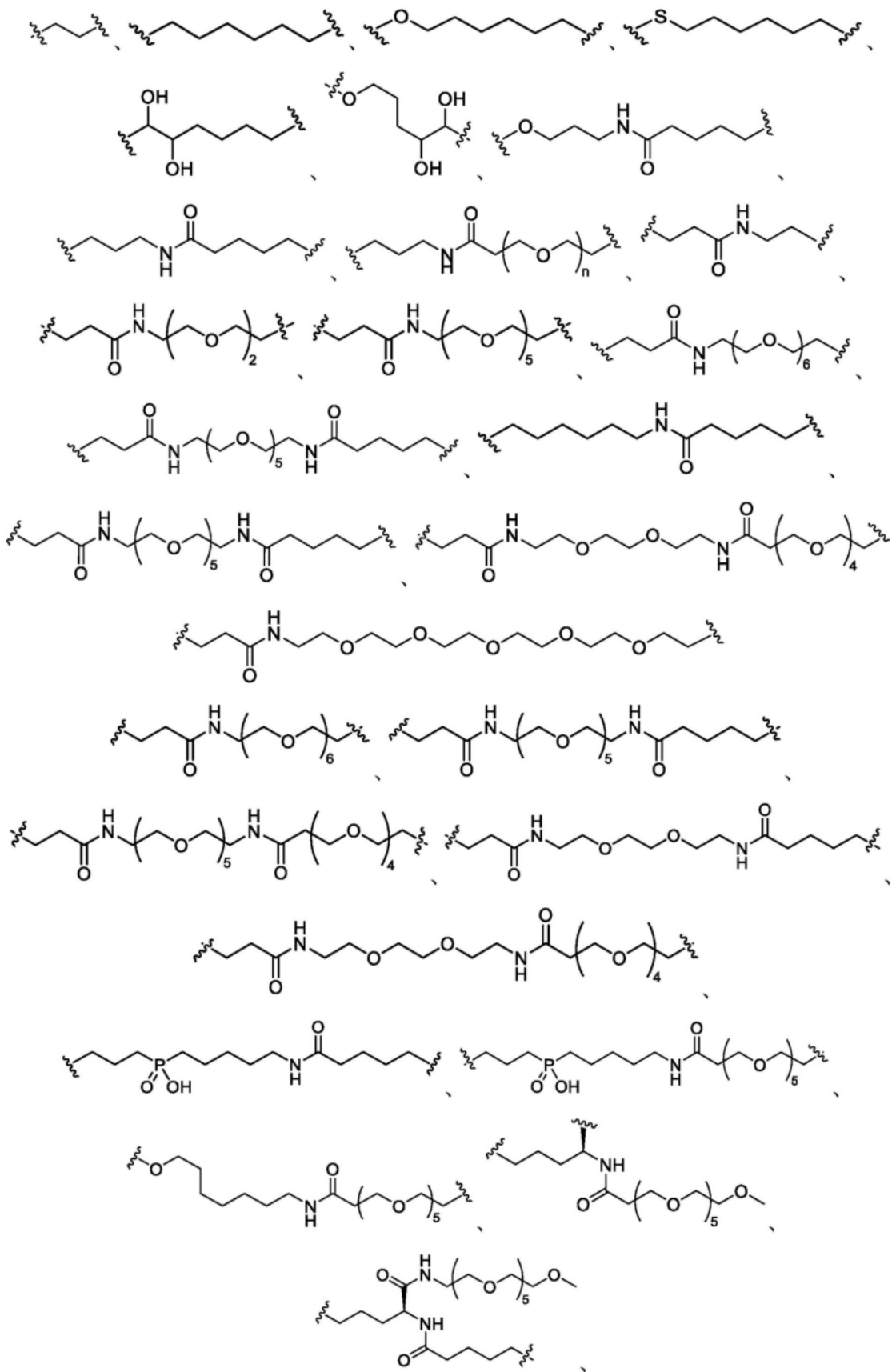
[0352] L¹是未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₁₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基;

[0353] L²是不存在的、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基) -、-NR⁴C(=O)-

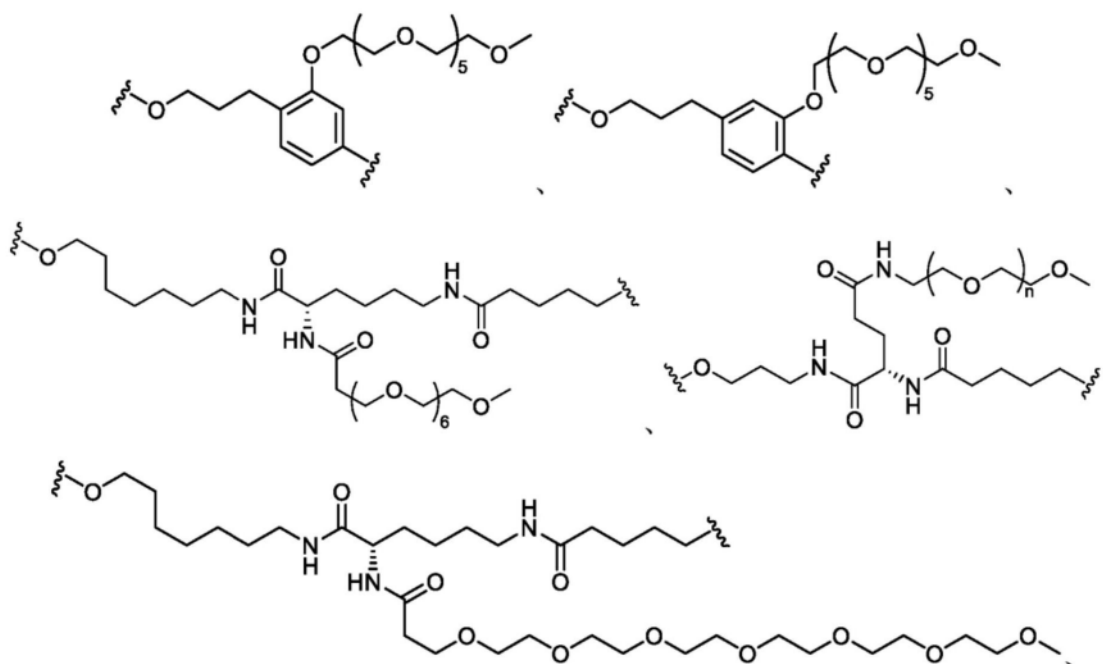
(未取代的或经取代的 C_1 - C_{10} 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ ；每个 m 独立地是1、2、3、4、5或6；每个 p 独立地是1或2； L^3 是一个或多个独立选择的选自以下的基团：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸和氨基(未取代的或经取代的苄基)氨基甲酸酯；其中氨基酸的任何游离胺任选地被 R^5 或 $-C(=O)(R^5)$ 取代，并且氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH(R^5)$ 替代；每个 R^5 独立地是未取代的或经取代的 C_1 - C_{10} 亚烷基、 C_4 - C_{20} 聚乙二醇或未取代的或经取代的苯基，其中经取代的苯基被1、2、3、4或5个独立地选自F、Cl、Br、I、 $-CH_3$ 和 CF_3 的基团取代；

[0354] L^4 是不存在的； L^5 是 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ ；每个 n 独立地是1、2、3、4、5或6；每个 q 独立地是1或2。

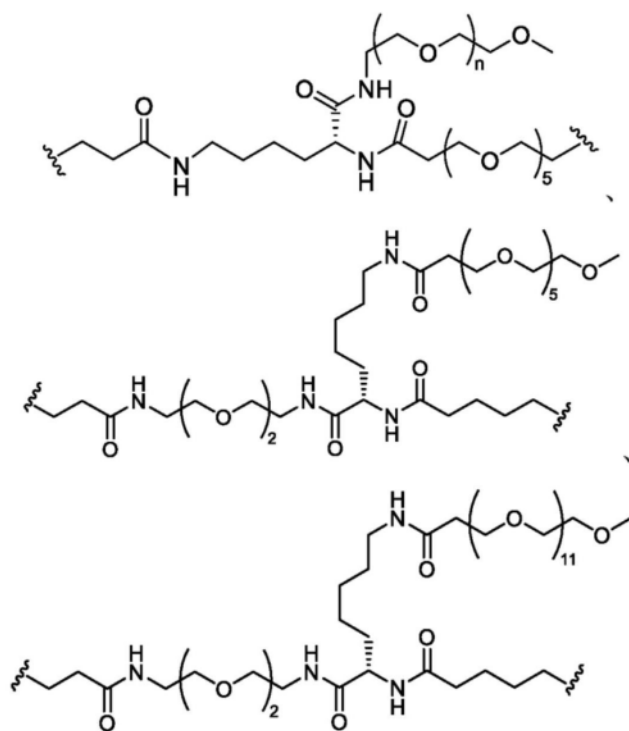
[0355] 在一些实施方案中， $-X^1-L-$ 是：



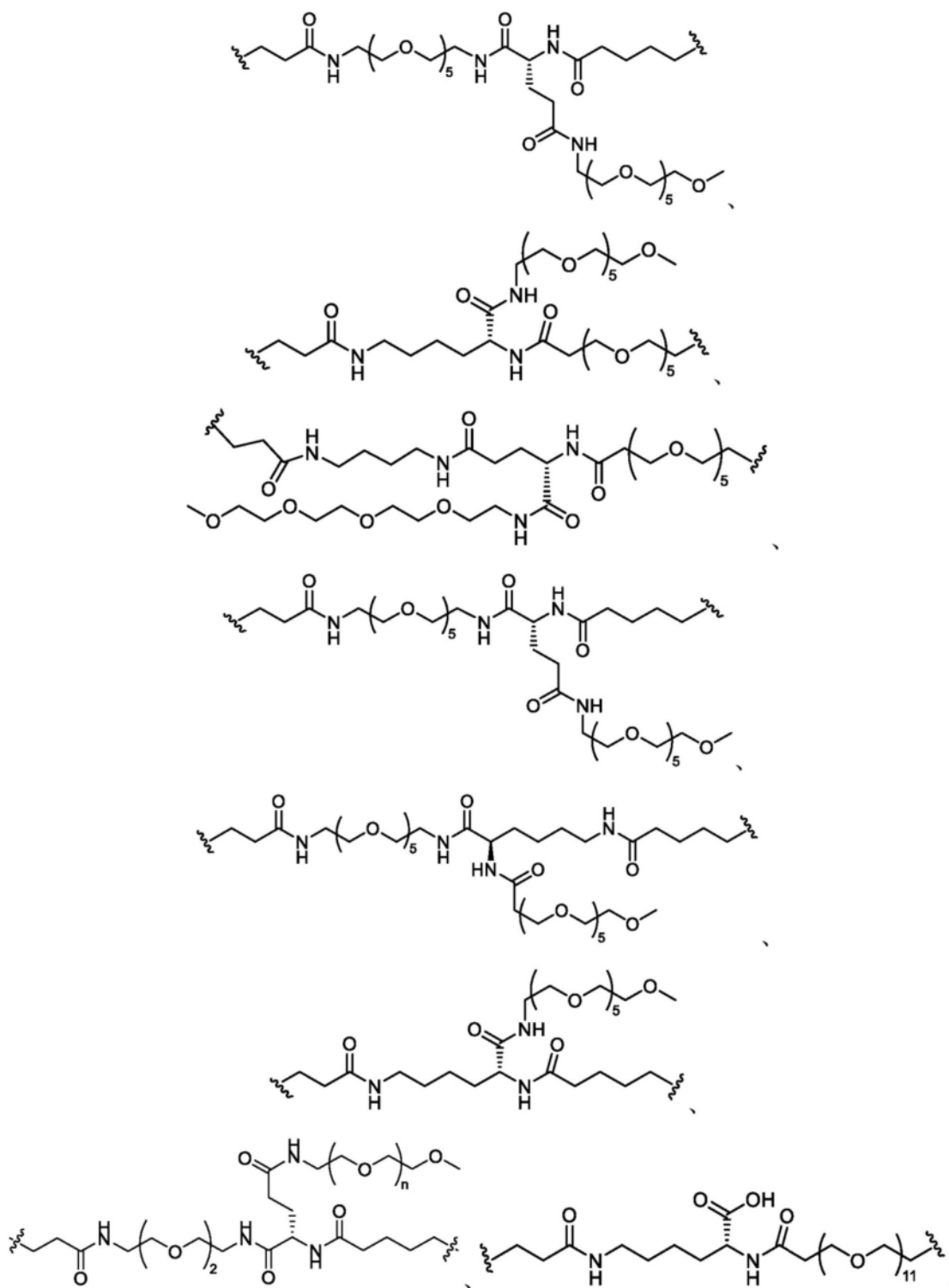
[0356]



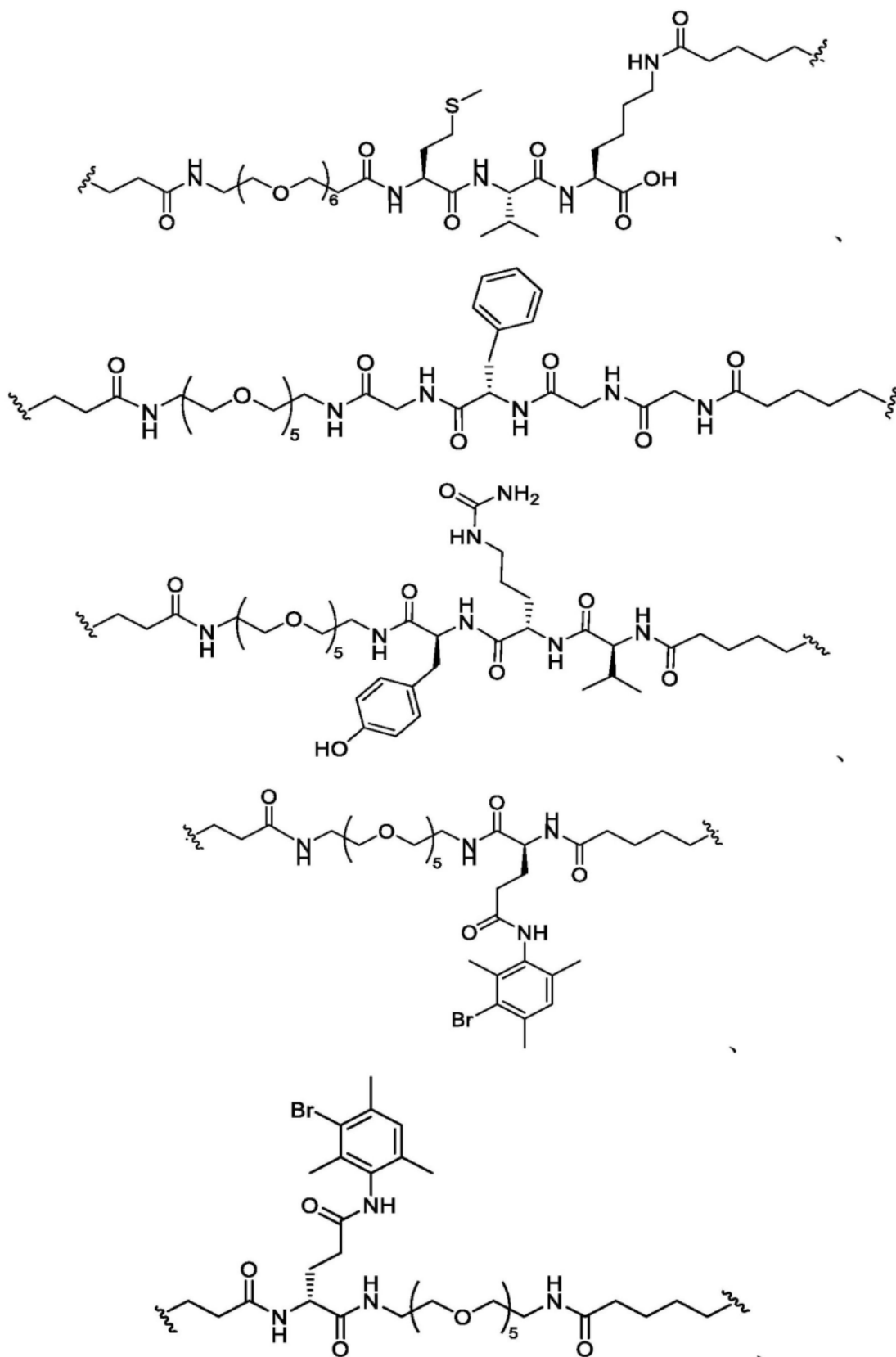
[0357]

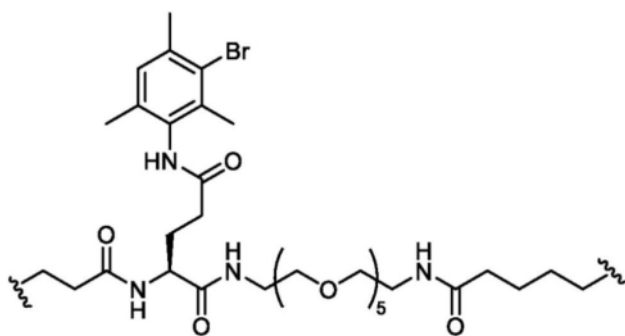
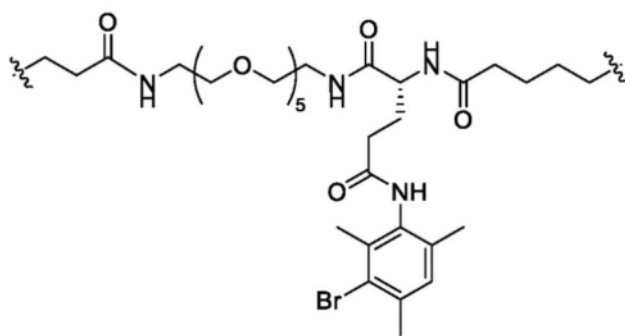


[0358]

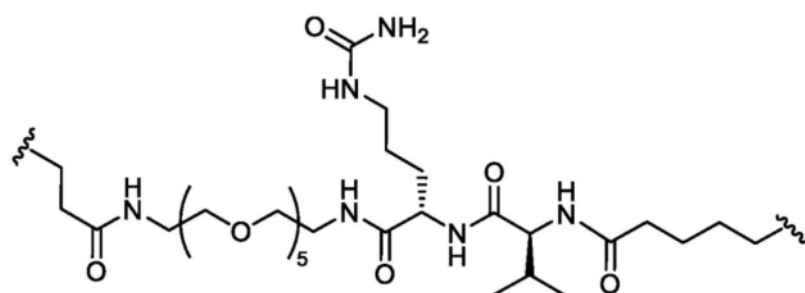
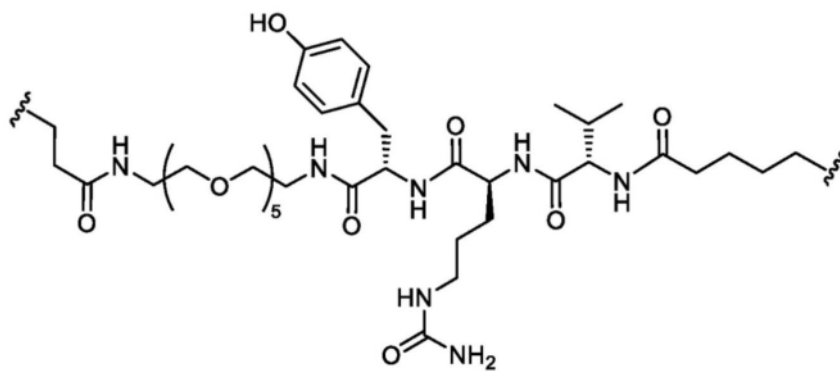
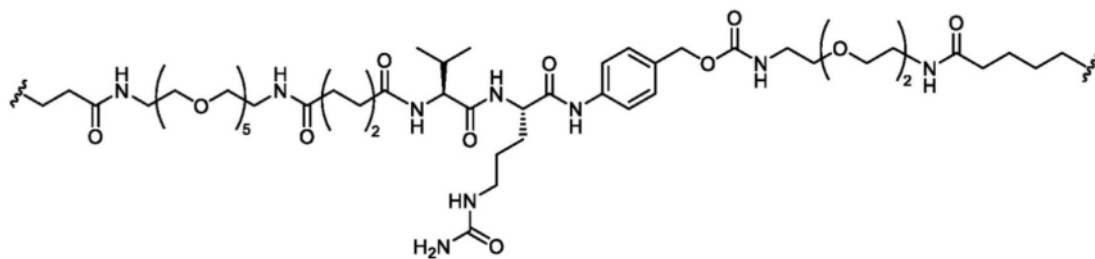


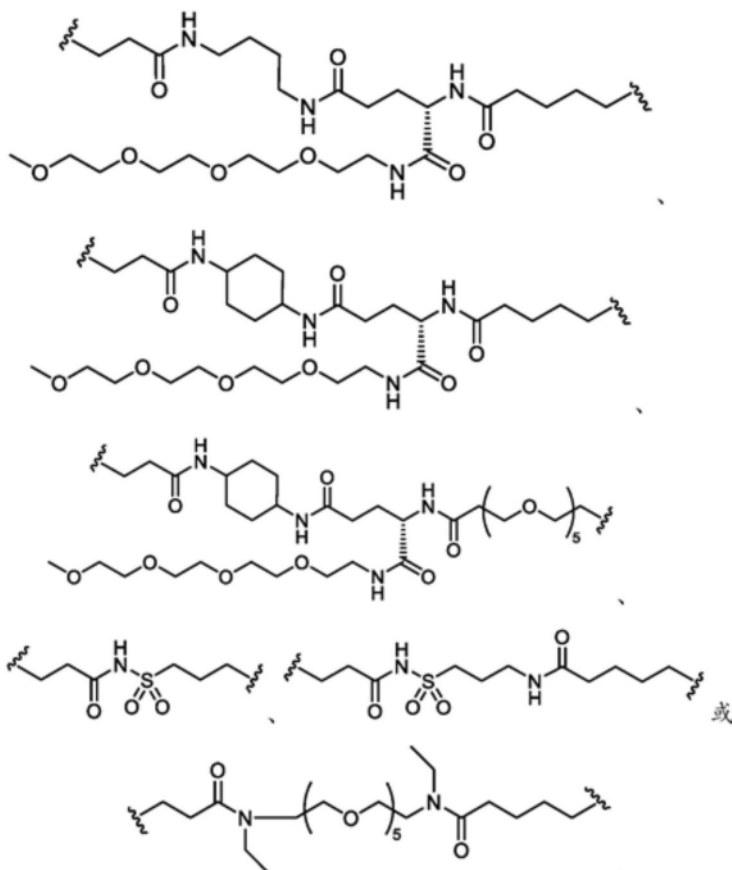
[0359]



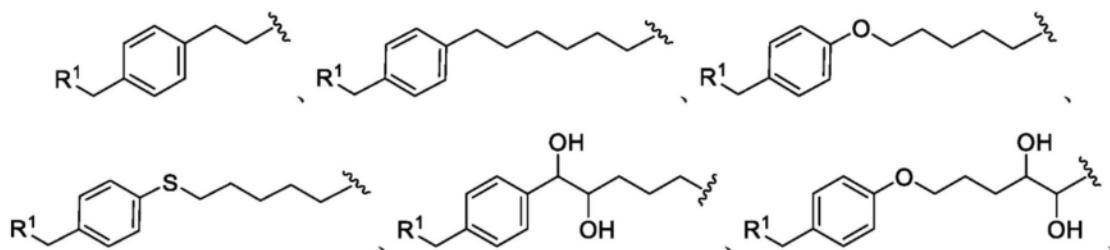


[0360]

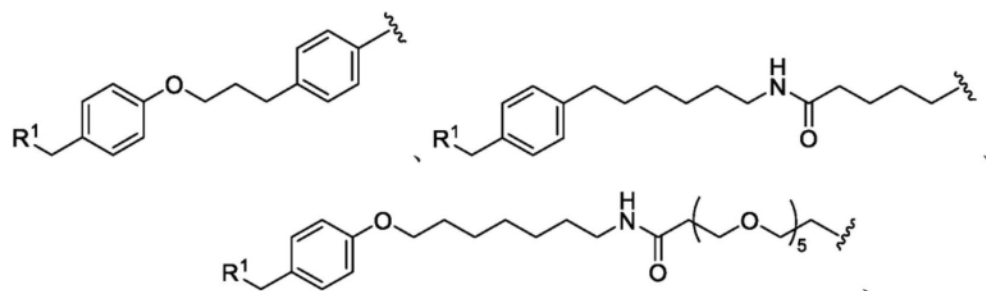




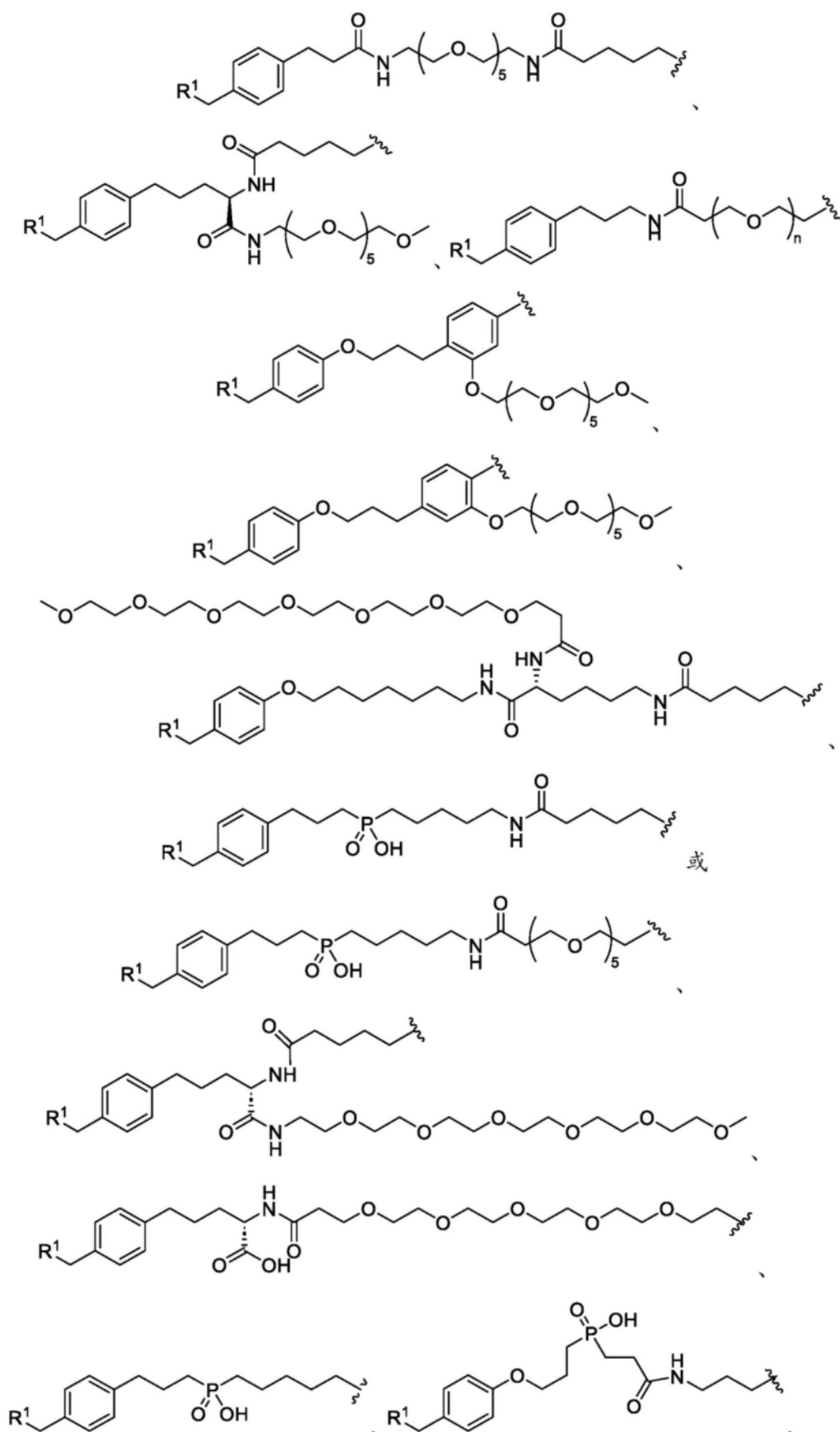
[0362] 在一些实施方案中, R^1 $\left(\text{C}_6\text{H}_4 \right)_v \text{X}^1 \text{L}$ 是:



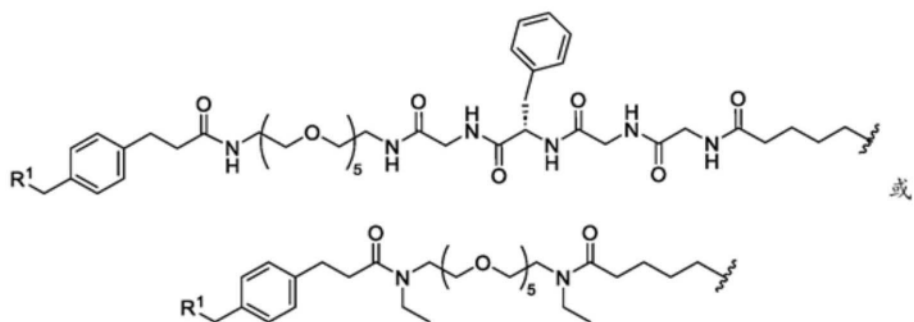
[0363]



[0364]

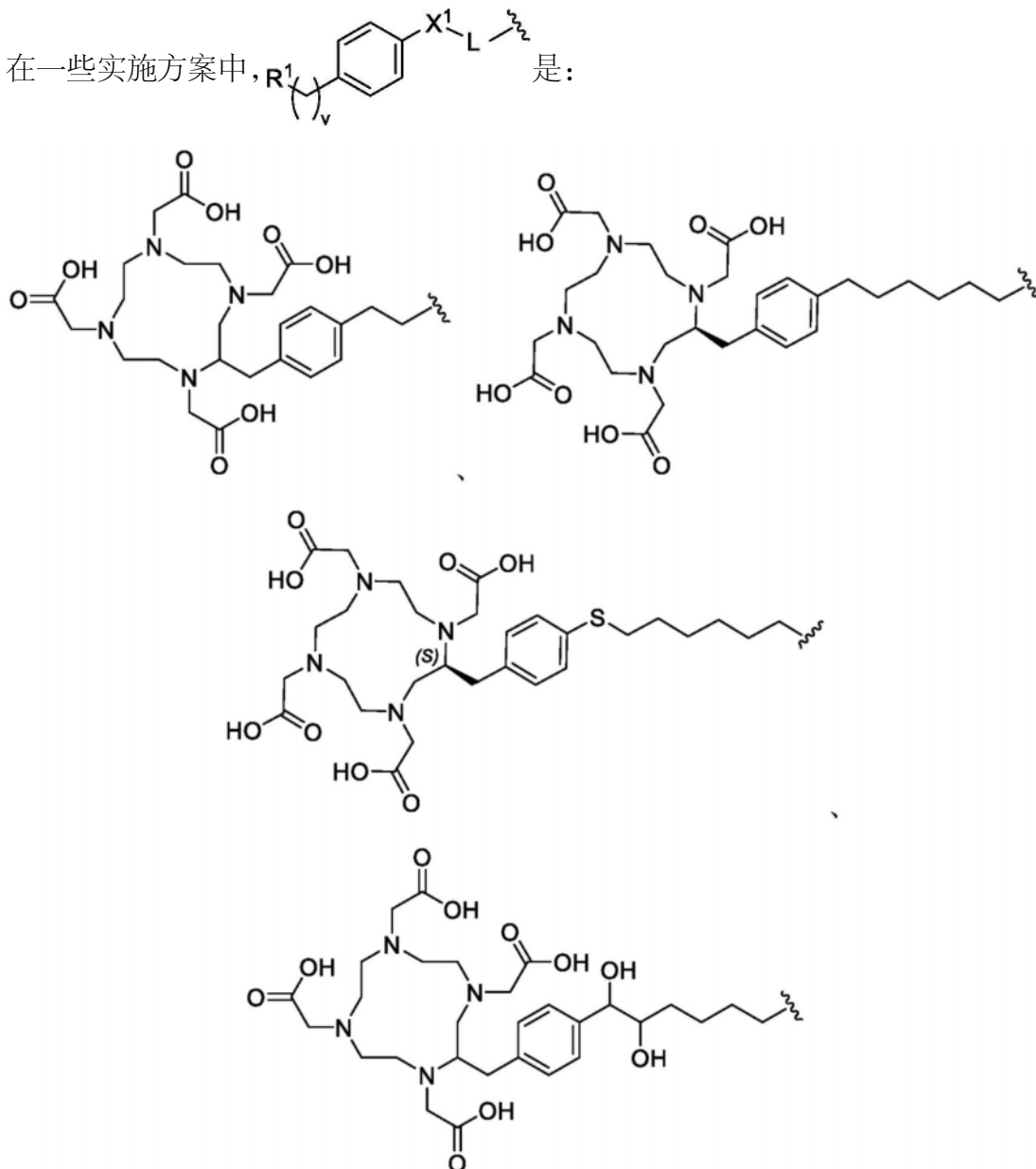


[0365]

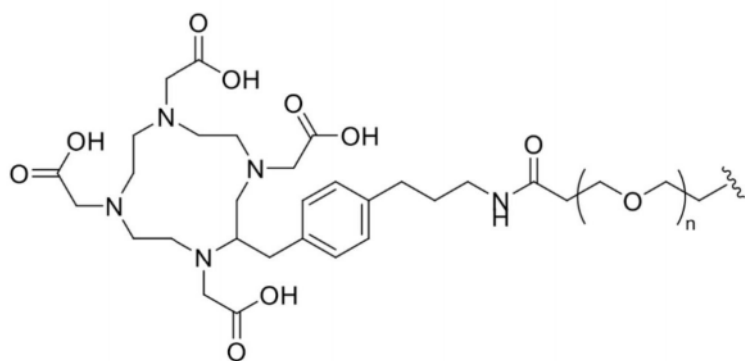
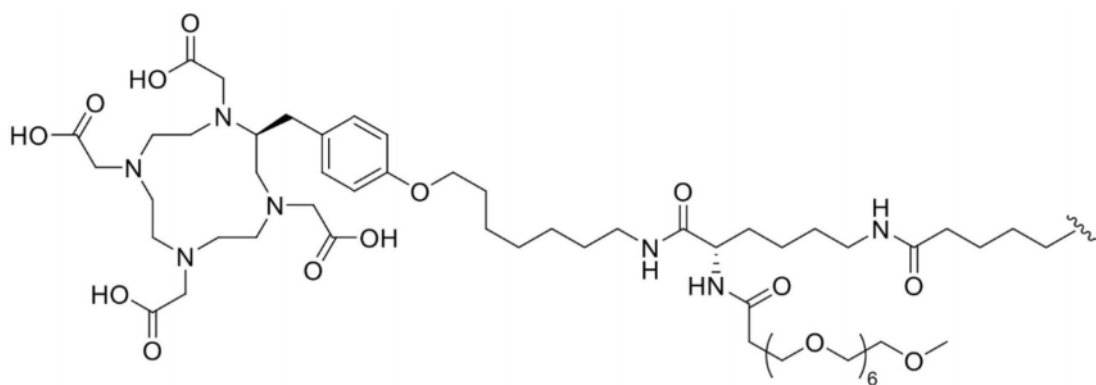


[0366]

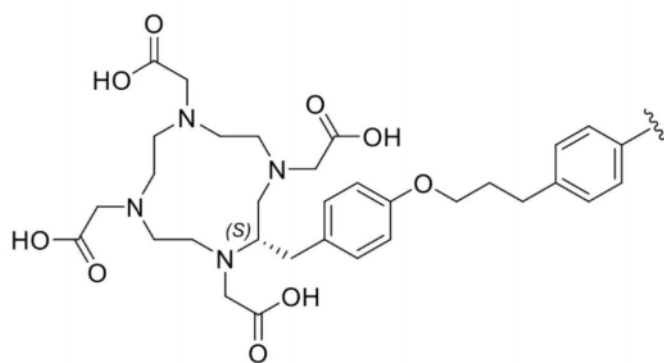
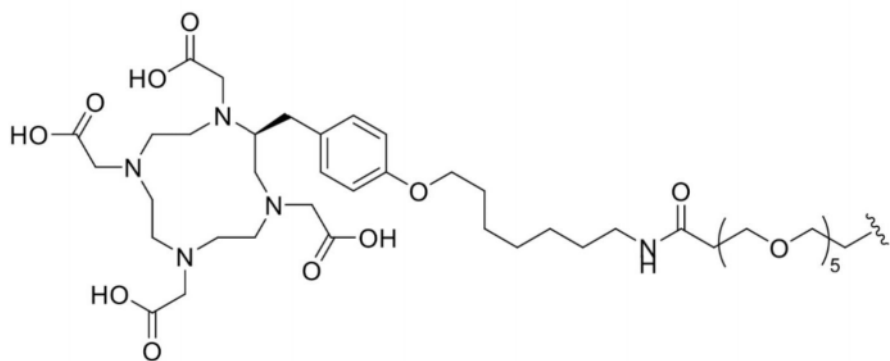
在一些实施方案中, R^1 是:

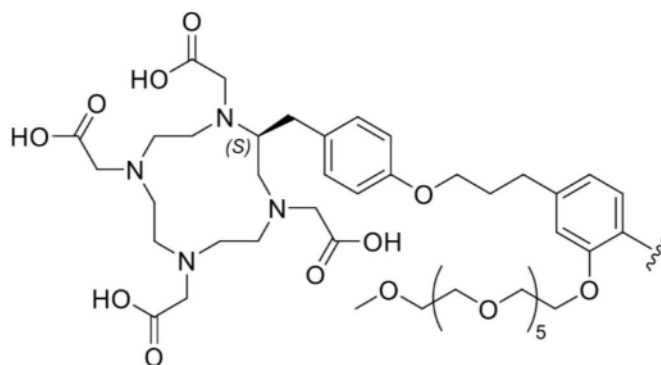
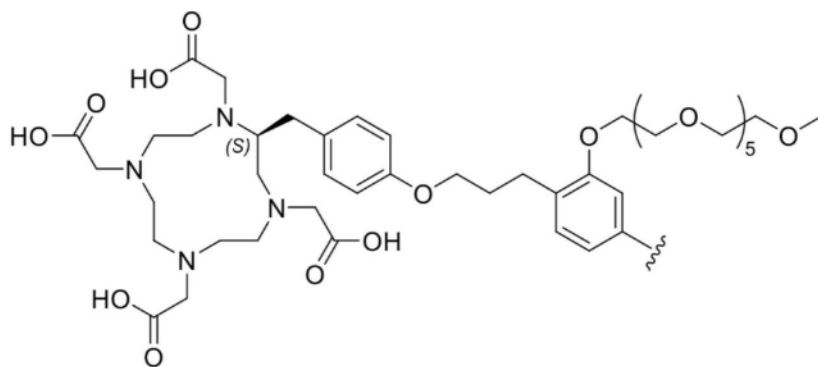


[0367]

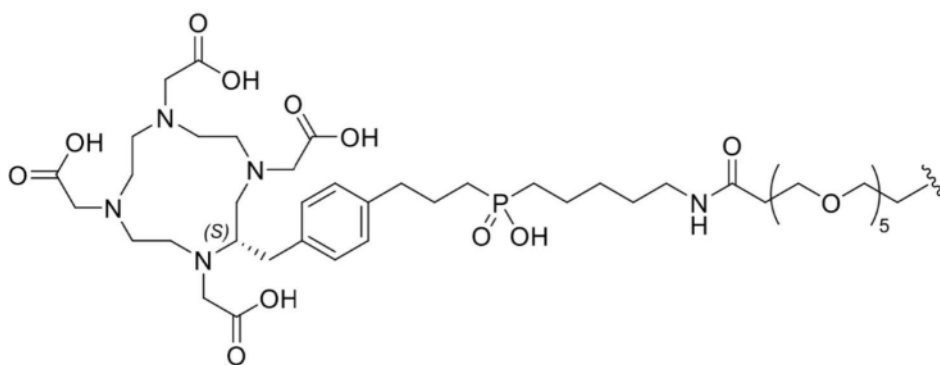
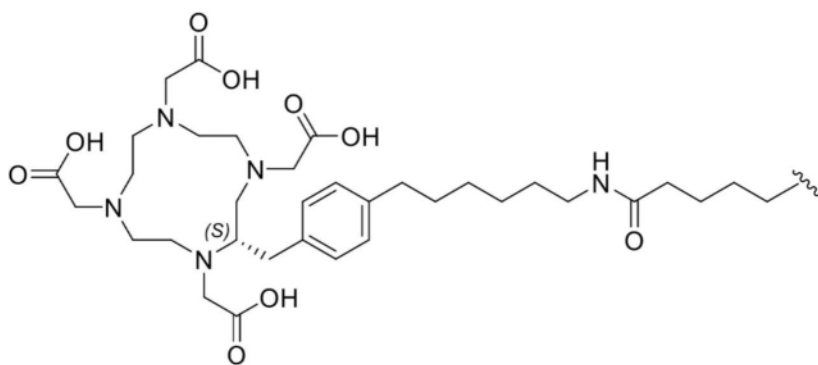


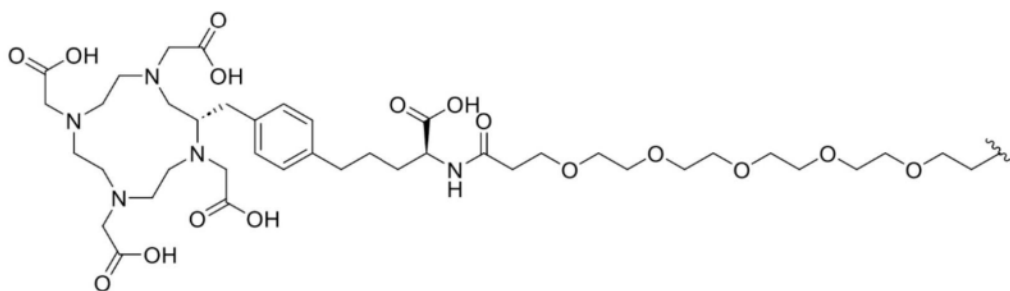
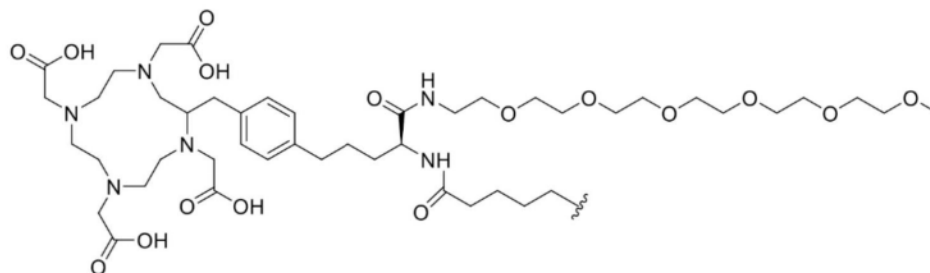
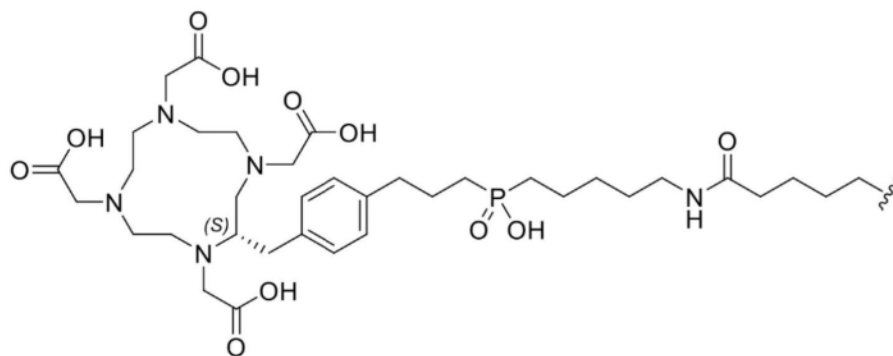
[0369]



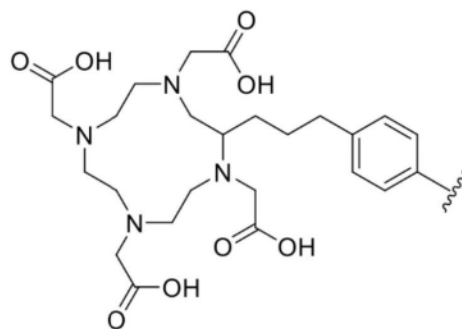
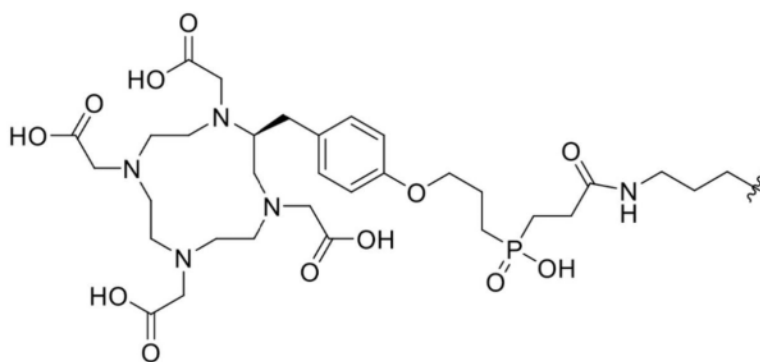


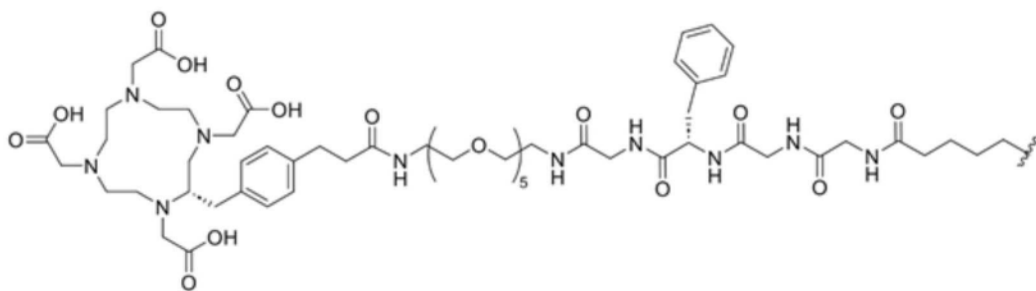
[0370]



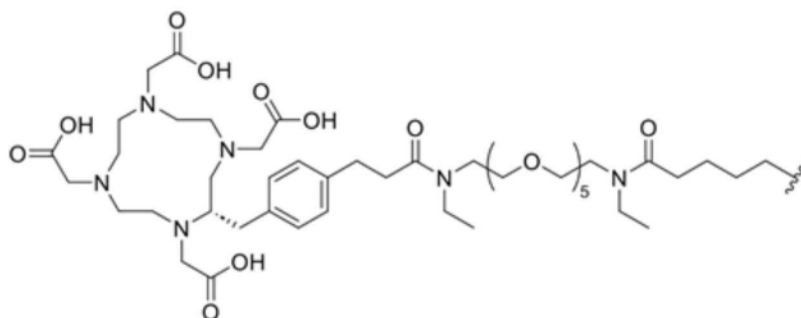


[0371]





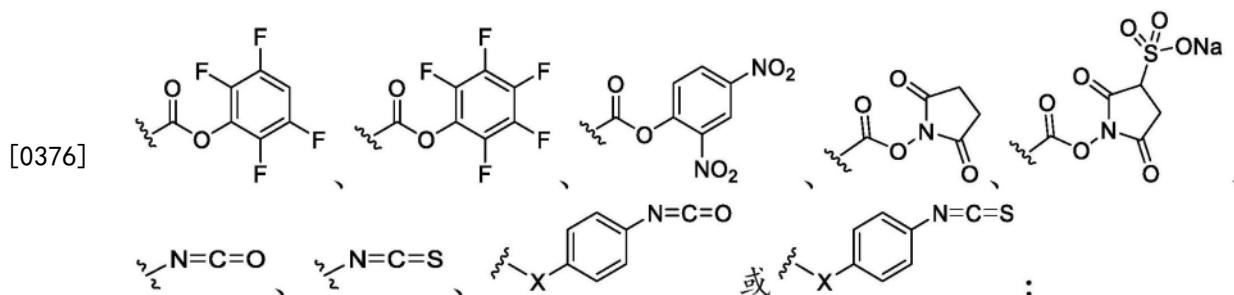
[0372]



[0373] 此外,使用缀合部分(R^2)来促进与肿瘤靶向部分的附接。在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)或硫醇($-SH$)反应的部分。在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链的胺($-NH_2$)反应的部分。

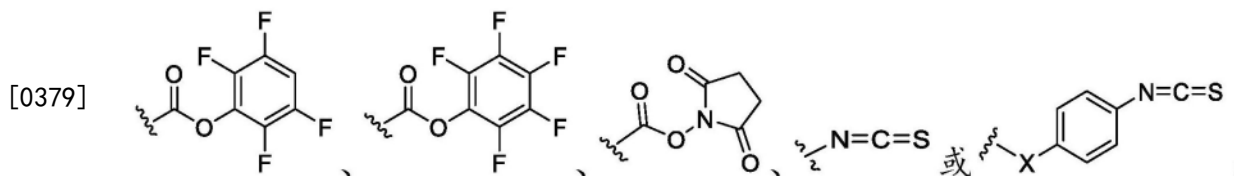
[0374] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)反应的部分并且包括四氟苯酯、五氟苯酯、二硝基苯酯、琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺酯或异硫氰酸酯。

[0375] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)反应的部分并且包括:



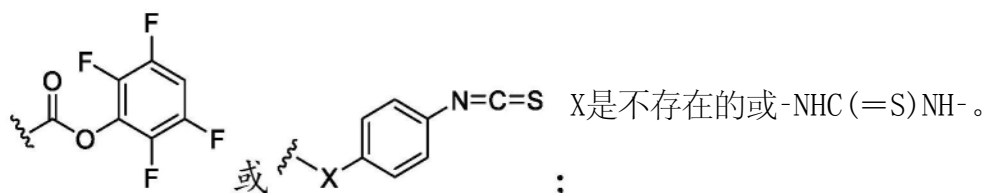
[0377] X 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$;每个 R^a 独立地选自氢和 C_1 - C_4 烷基。

[0378] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)反应的部分并且包括:

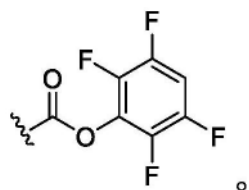


[0380] X 是不存在的或 $-NR^aC(=S)NR^a-$;每个 R^a 独立地选自氢和 C_1 - C_4 烷基。在一些实施方案中, X 是不存在的或 $-NHC(=S)NH-$ 。

[0381] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺($-NH_2$)反应的部分并且包括:



[0382] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺 ($-NH_2$) 反应的部分并且包括:



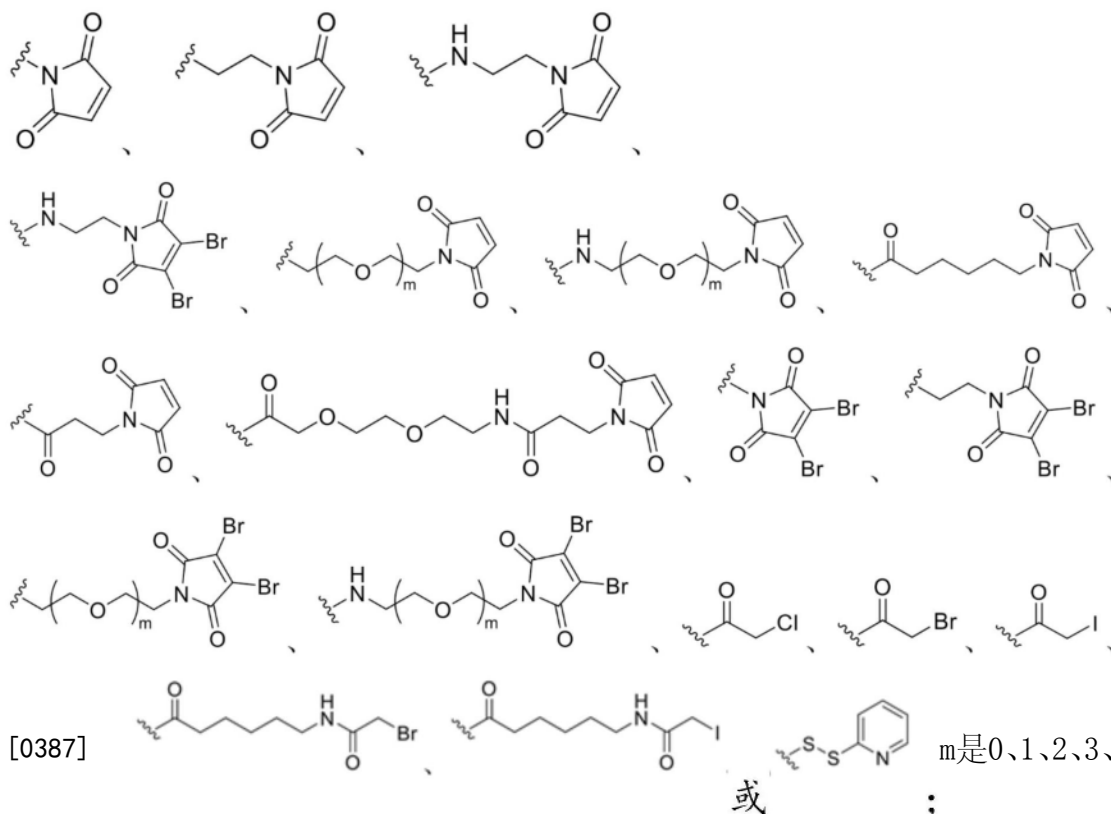
[0383] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺 ($-NH_2$) 反应的部分并且包括:



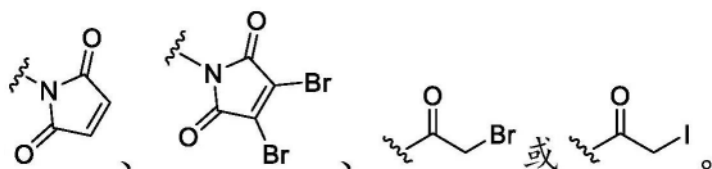
[0384] 可替代地, 或另外地, 可以使用异硫氰酸酯接头 (诸如 p-SCN-Bn-DOTA), 其涉及本发明的免疫缀合物中的赖氨酸残基。

[0385] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-SH$) 反应的部分并且包括: 马来酰亚胺基团、卤代乙酰胺基团、卤代乙酰基基团、卤代乙酸基团、吡啶基硫代基团、乙烯基羰基基团、氮丙啶基基团、二硫化物基团、乙炔基团、羟基琥珀酰亚胺基团或硫醇基团。

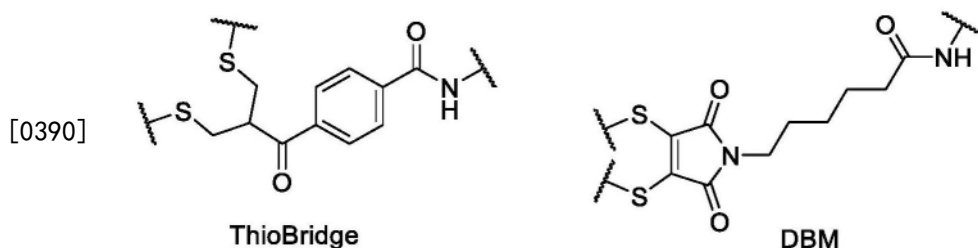
[0386] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇 ($-SH$) 反应的部分并且包括



[0388] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇 ($-SH$) 反应的部分并且包括



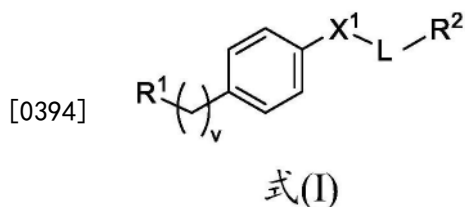
[0389] 在一些实施方案中,接头可以通过半胱氨酸桥接官能团诸如 **ThioBridge®** 或 DBM (二溴马来酰亚胺) 与抗体缀合。这些接头可以起到在还原和缀合后使链内二硫键再稳定的作用 (Bird M 等人, *Antibody-Drug Conjugates* pp.113-129 (2019) 以及 Behrens CR 等人 *Mol. Pharmaceutics* 12:3986 (2015))。示例性重新桥接延伸序列元件如下所示 (其中波浪线表示与免疫缀合物共价附接的位点):



[0391] 关于接头及其在本文所述化合物中的用途的其他细节,参见:Wu, A.M.; Senter, P.D. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23 (9): 1137-1146; Beck, A. 等人 *Discov. Med.* 2010, 10 (53): 329-339; Nolting, B. 等人 *Methods. Mol. Biol.* 2013, 1045: 71-100; Jain, N. 等人 *Pharm. Res.* 2015, 32: 3526-3540; McCombs, J.R.; Owen, S.C. *AAPS J.* 2015, 17 (2): 339-351; Jun Lu 等人, *Int J Mol Sci.* 2016 年 4 月; 17 (4): 561; 关于这样的接头披露内容,将所述文献各自通过引用并入。

[0392] 示例性免疫缀合物

[0393] 在一些实施方案中,本文描述了式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐:



[0395] 其中:

[0396] R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;

[0397] X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、

[0398] $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、

[0399] $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、(未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基) $-X^2-$ 或 $-(C_4-C_{20}$ 聚乙二醇) $-X^2-$;

[0400] X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

[0401] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

[0402] X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代,并且其中任何氨

基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

[0403] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

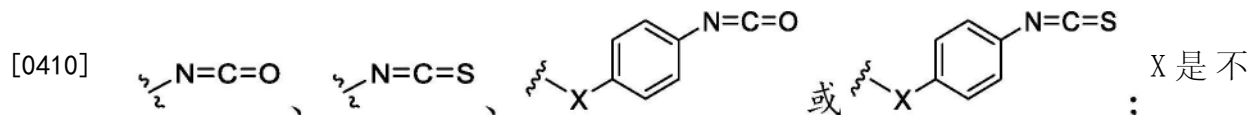
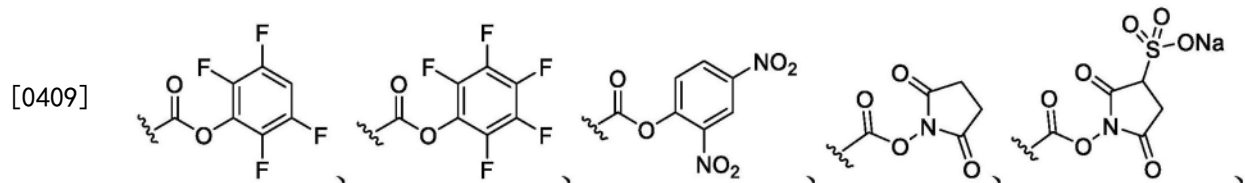
[0404] L 是任选的接头;

[0405] R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺 ($-NH_2$) 或硫醇 ($-SH$) 反应的部分; 并且

[0406] v 是 1、2、3 或 4。

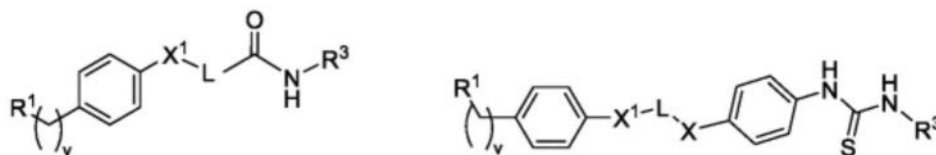
[0407] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺 ($-NH_2$) 反应的部分并且包括四氟苯酯、五氟苯酯、二硝基苯酯、琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺酯或异硫氰酸酯。

[0408] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的胺 ($-NH_2$) 反应的部分并且包括:



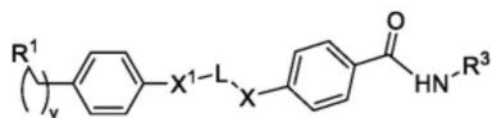
存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$; 并且每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基。

[0411] 在一些实施方案中, 本文描述了式 (II)、式 (III) 或式 (IV) 的免疫缀合物或其药学上可接受的盐:



[0412] 式 (II)

式 (III)



式 (IV)

[0413] 其中:

[0414] R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;

[0415] X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、(未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基) $-X^2-$ 或 $(C_4-C_{20}$ 聚乙二醇) $-X^2-$;

[0416] $C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、

[0417] $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、(未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基) $-X^2-$ 或 $(C_4-C_{20}$ 聚乙二醇) $-X^2-$;

[0418] X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

[0419] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

[0420] X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸,其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代,并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

[0421] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

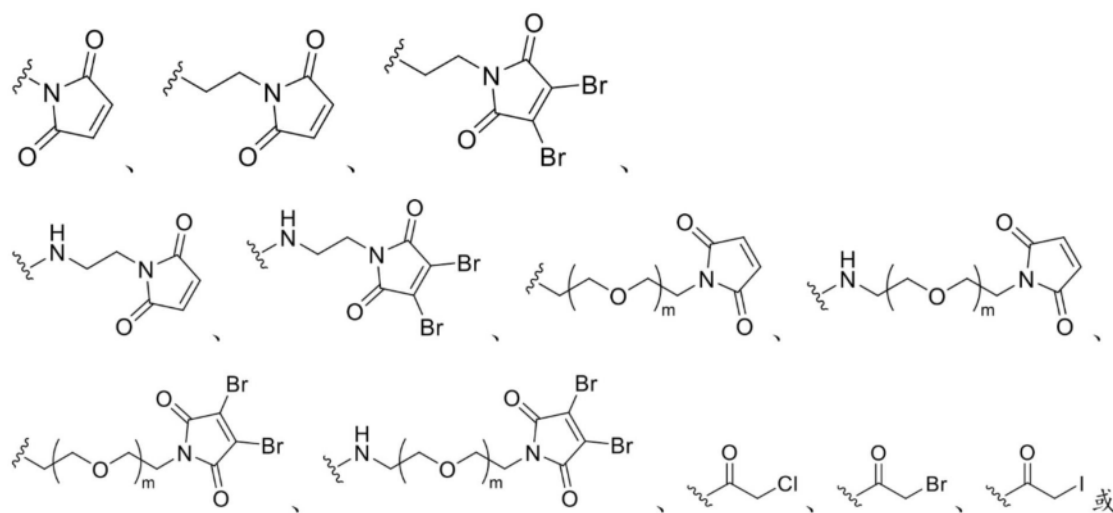
[0422] L是任选的接头;

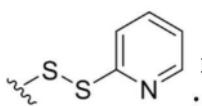
[0423] $-NH-R^3$ 是肿瘤靶向部分;并且

[0424] v 是1、2、3或4。

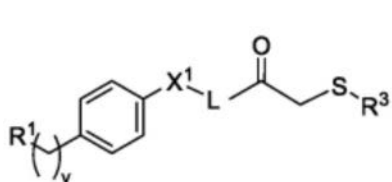
[0425] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇($-SH$)反应的部分并且包括马来酰亚胺基团、卤代乙酰胺基团、卤代乙酰基基团、卤代乙酸基团、吡啶基硫代基团、乙烯基羰基基团、氮丙啶基基团、二硫化物基团、乙炔基团、羟基琥珀酰亚胺基团或硫醇基团。

[0426] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的硫醇($-SH$)反应的部分并且包括

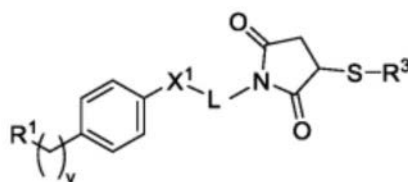


[0427]  m 是0、1、2、3、4或5。

[0428] 在一些实施方案中,本文描述了式(V)、式(VI)、式(VII)或式(VIII)的免疫缀合物或其药学上可接受的盐:

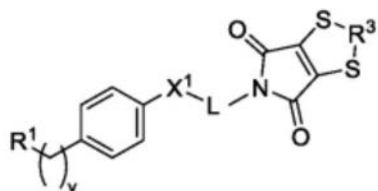


式 (V)

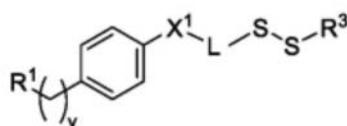


式 (VI)

[0429]



式 (VII)



式 (VIII)

[0430] 其中:

[0431] R^1 是螯合部分或其放射性核素复合物;

[0432] X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)O-$ 、(未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚烯基) $-X^2-$ 、(未取代的或经取代的 C_2-C_{10} 亚炔基) $-X^2-$ 或 $(C_4-C_{20}$ 聚乙二醇) $-X^2-$;

[0433] X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$;

[0434] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基;

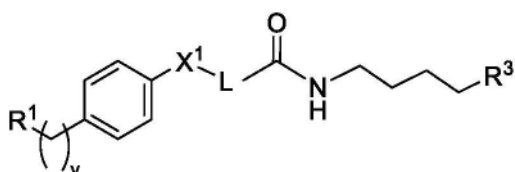
[0435] X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸, 其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代, 并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代;

[0436] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基;

[0437] L 是任选的接头; $-S-R^3$ 是肿瘤靶向部分; v 是 1、2、3 或 4。

[0438] 在一些实施方案中, R^2 是能够与肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸的胺 ($-NH_2$) 反应的部分。

[0439] 在一些实施方案中, 式 (II) 的免疫缀合物具有式 (IIa) 或其药学上可接受的盐的结构:

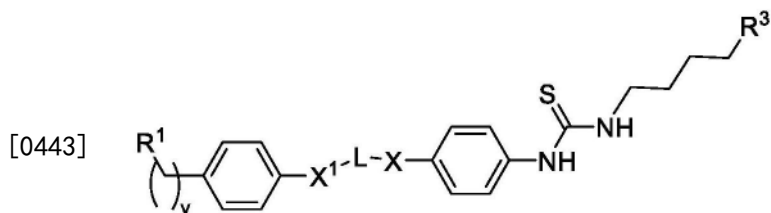


[0440]

式 (IIa)

[0441] 其中: $-NHCH_2CH_2CH_2CH_2-$ 是肿瘤靶向部分 R^3 的赖氨酸残基的侧链。

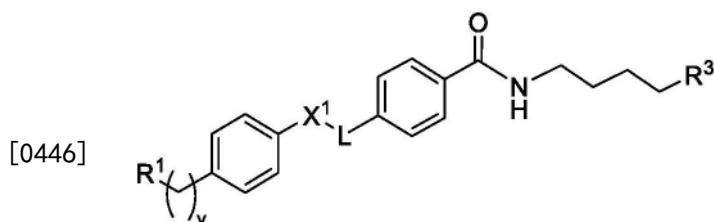
[0442] 在一些实施方案中, 式 (III) 的免疫缀合物具有式 (IIIa) 或其药学上可接受的盐的结构:



式(IIIa)

[0444] 其中：-NHCH₂CH₂CH₂CH₂-是肿瘤靶向部分R³的赖氨酸残基的侧链。

[0445] 在一些实施方案中，式(IV)的免疫缀合物具有式(IVa)或其药学上可接受的盐的结构：

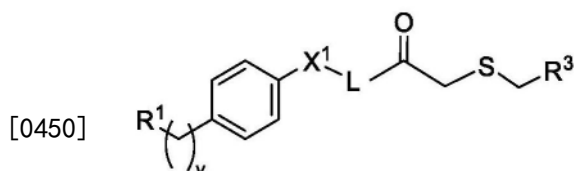


式(IVa)

[0447] 其中：-NHCH₂CH₂CH₂CH₂-是肿瘤靶向部分R³的赖氨酸残基的侧链。

[0448] 在一些实施方案中，R²是能够与肿瘤靶向部分R³的半胱氨酸的硫醇(-SH)反应的部分。

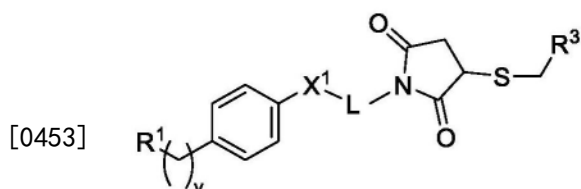
[0449] 在一些实施方案中，式(V)的免疫缀合物具有式(Va)或其药学上可接受的盐的结构：



式(Va)

[0451] 其中：-SCH₂-是肿瘤靶向部分R³的半胱氨酸残基的侧链的硫醇(-SH)。

[0452] 在一些实施方案中，式(VI)的免疫缀合物具有式(VIa)或其药学上可接受的盐的结构：

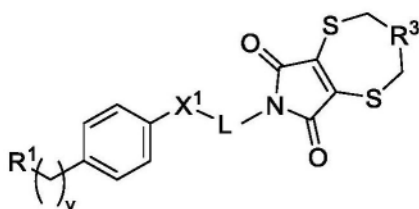


式(VIa)

[0454] 其中：-SCH₂-是肿瘤靶向部分R³的半胱氨酸残基的侧链的硫醇(-SH)。

[0455] 在一些实施方案中，式(VII)的免疫缀合物具有式(VIIa)或其药学上可接受的盐的结构：

[0456]

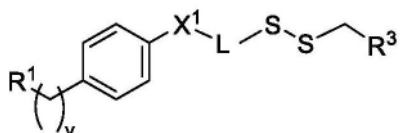


式(VIIa)

[0457] 其中: $-\text{SCH}_2-$ 是肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

[0458] 在一些实施方案中, 式 (VIII) 的免疫缀合物具有式 (VIIIa) 或其药学上可接受的盐的结构:

[0459]



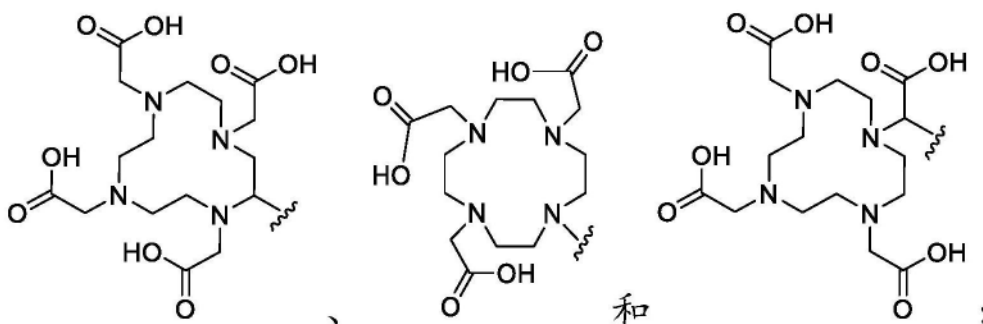
式(VIIIa)

[0460] 其中: $-\text{SCH}_2-$ 是肿瘤靶向部分 R^3 的半胱氨酸残基的侧链的硫醇 ($-\text{SH}$)。

[0461] 在一些实施方案中, R^1 是选自以下的螯合部分: 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA); 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸 (D03A); 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,7-二乙酸 (D02A); $\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTMA); 1,4,7,10-四(氨基甲酰基甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷 (DOTAM); 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四丙酸 (DOTPA); 2,2',2''-(10-(2-氨基-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸; 6,6',6''-(((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双((羧甲基)氮烷二基))-双(亚甲基))二皮考啉酸 (H_4pypa); 6,6',6''-(((吡啶-2,6-二基双(亚甲基))双(氮烷三基))四(亚甲基))-四皮考啉酸 ($\text{H}_4\text{py4pa}$); 10-((6-羧基吡啶-2-基)甲基)-1,4,7,10-四-氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸 (D03Apic); 3,6,9,12-四(羧甲基)-3,6,9,12-四氮杂十四烷二酸 (TTHA); 或其放射性核素复合物。

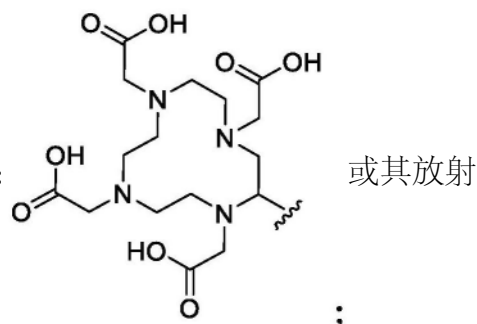
[0462] 在一些实施方案中, R^1 是选自以下的螯合部分:

[0463]

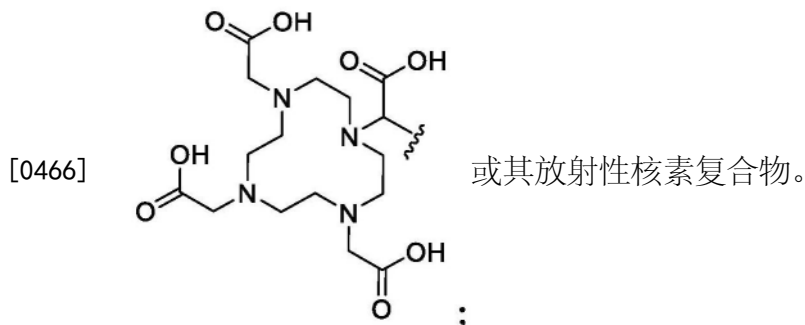


[0464] 或其放射性核素复合物。

[0465] 在一些实施方案中, R^1 是选自以下的螯合部分:



性核素复合物。在一些实施方案中, R^1 是选自以下的螯合部分:



[0467] 在一些实施方案中, X^1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-(C_1-C_6 \text{ 亚烷基})-X^2-$ 或 $-(C_4-C_{20} \text{ 聚乙二醇})-X^2-$; X^2 是不存在的、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$; X^4 是 $-NR^a-$ 、 $-NR^aS(=O)_2-$ 、 $-NR^aS(=O)_2NR^a-$ 或一种或多种独立选择的天然或非天然氨基酸, 其中氨基酸的任何游离胺任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代。

[0468] 在一些实施方案中, X^1 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 或 $-C(=O)NR^a-$ 。在一些实施方案中, X^1 是不存在的、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 或 $-C(=O)NR^a-$ 。

[0469] 在一些实施方案中, X^1 是 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-X^2-$ 。

[0470] 在一些实施方案中, X^2 是 $-C(=O)NR^a-$ 或 $-C(=O)X^4-$ 。在一些实施方案中, X^2 是 $-C(=O)NR^a-$ 。在一些实施方案中, X^2 是 $-C(=O)X^4-$ 。在一些实施方案中, X^4 是 $-NR^a-$ 或 $-NR^aS(=O)_2-$ 。

[0471] 在一些实施方案中, X^1 是 $-CH_2CH_2-$ 或 $-CH_2CH_2-C(=O)X^2-$; X^4 是 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_2CH_3)-$ 、 $-NHS(=O)_2-$ 、 $-N(CH_3)S(=O)_2-$ 、 $-N(CH_2CH_3)S(=O)_2-$ 、赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸-缬氨酸-赖氨酸、甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸、酪氨酸-精氨酸-缬氨酸、精氨酸-缬氨酸或其组合; 其中氨基酸的任何游离胺 ($-NH_2$) 任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代并且其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代。

[0472] 在一些实施方案中, L 是 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 、 $-L^5-$ 、 $-L^1-L^2-L^3-L^4-L^5-$ 或其组合;

[0473] L^1 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、未取代的或经取代的 C_2-C_{20} 亚烯基、未取代的或经取代的 C_2-C_{20} 亚炔基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、 $-(X^3CH_2CH_2)_t-$ 、未取代的或经取代的环亚烷基、未取代的或经取代的杂环亚烷基、未

取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基；

[0474] 每个 X^3 独立地选自O和 NR^4 ；

[0475] 每个t独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；

[0476] L^2 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-(CH_2CH_2X^3)_m-$ 、 $(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2X^3)_m-(CH_2)_p$ ；

[0477] 每个 R^4 独立地选自氢和 C_1-C_6 烷基；

[0478] 每个m独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；每个p独立地是0、1或2；

[0479] L^3 是不存在的，或是一个或多个独立选择的选自以下的基团：天然或非天然氨基酸以及任选的氨基（未取代的或经取代的苄基）氨基甲酸酯；其中氨基酸的任何游离胺（ $-NH_2$ ）任选地独立地被 R^5 或 $-C(=O)R^5$ 取代，其中任何氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH-R^5$ 替代，并且其中经取代的苄基被1或2个选自卤素、 $-OH$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 、 $-NHC(=O)R^5$ 和经取代的 C_1-C_6 烷基的基团取代，其中经取代的 C_1-C_6 烷基被 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 和 $-NHC(=O)R^5$ 取代；

[0480] L^4 是不存在的、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)NR^4-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-(X^3CH_2CH_2)_n-$ ；

[0481] 每个n独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；每个q独立地是0、1或2；

[0482] L^5 是不存在的、 $-C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2)_n-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-(CH_2CH_2X^3)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-(X^3CH_2CH_2)_n-$ ；

[0483] 每个n独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12；每个q独立地是0、1或2；

[0484] 每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基；

[0485] 每个 R^b 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基；

[0486] 其中杂亚烷基是其中一个碳原子被 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-S(=O)(=NR^5)-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-P(=O)OR^b-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=O)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=N-CN)NR^a-$ 、 $-NR^aC(=N-R^5)NR^a-$ 或 $-NR^aC(=O)O-$ 替代的亚烷基；

[0487] 其中当 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 和 $-L^5-$ 中的任一个被取代时，则 $-L^1-$ 、 $-L^2-$ 、 $-L^3-$ 、 $-L^4-$ 和 $-L^5-$ 被1、2、3或4个选自卤素、 $-OH$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 、 $-NHC(=O)R^5$ 和经取代的 C_1-C_6 烷基的基团取代，其中经取代的 C_1-C_6 烷基被 $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NHR^5$ 、 $-C(=O)NHR^5$ 和 $-NHC(=O)R^5$ 取代；

[0488] 每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基。

[0489] 在一些实施方案中，杂亚烷基是其中一个碳原子被 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-S(=O)(=NR^5)-$ 、 $-NR^5-$ 、 $-P(=O)OH-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=N-CN)NH-$ 或 $-NHC(=N-R^5)NH-$ 替代的亚烷基。在一些实施方案中，杂亚烷基是

其中一个碳原子被-S(=O)(=NH)-、-S(=O)(=NR⁵)-、-P(=O)OH-、-NHC(=N-CN)NH-或-NHC(=N-R⁵)NH-替代的亚烷基。在一些实施方案中,杂亚烷基是其中一个碳原子被-P(=O)OH-替代的亚烷基。在一些实施方案中,杂亚烷基是其中一个碳原子被-NHC(=N-CN)NH-或-NHC(=N-R⁵)NH-替代的亚烷基。

[0490] 在一些实施方案中,L¹是未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₂₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的C₃-C₈环亚烷基、未取代的或经取代的单环C₃-C₈杂环亚烷基、未取代的或经取代的亚苯基、未取代的或经取代的单环杂亚芳基。

[0491] 在一些实施方案中,L¹是未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基、未取代的或经取代的C₁-C₁₀杂亚烷基、C₄-C₂₀聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基。

[0492] 在一些实施方案中,L²是不存在的、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基)-、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₁₀亚烷基)-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_p-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_p-;每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是1或2。在一些实施方案中,L²不存在。

[0493] 在一些实施方案中,L³是不存在的,或是一个或多个独立选择的选自以下的基团:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸和氨基(未取代的或经取代的苄基)氨基甲酸酯;其中氨基酸的任何游离胺任选地被R⁵或-C(=O)(R⁵)取代,并且氨基酸的任何游离羧酸任选地被-C(=O)NH(R⁵)替代。在一些实施方案中,L³是不存在的。

[0494] 在一些实施方案中,L³是赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸-缬氨酸-赖氨酸、甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸、酪氨酸-精氨酸-缬氨酸、精氨酸-缬氨酸、缬氨酸-瓜氨酸-(对氨基苄基氨基甲酸酯)或其组合;其中氨基酸的任何游离胺(-NH₂)任选地被-C(=O)(未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基)或-C(=O)-C₄-C₂₀聚乙二醇取代;其中任何氨基酸的任何游离羧酸(-CO₂H)任选地被-C(=O)NH-(2,4,6-三甲基-3-溴苯基)、-C(=O)NH-(未取代的或经取代的C₁-C₂₀亚烷基)或-C(=O)NH-(C₄-C₂₀聚乙二醇)替代。

[0495] 在一些实施方案中,L⁴是不存在的、-C(=O)-(未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-、-C(=O)NR⁴- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-、-NR⁴C(=O)- (未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基)-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。在一些实施方案中,L⁴是不存在的。

[0496] 在一些实施方案中,L⁵是不存在的、-C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)NR⁴-(CH₂)_n-、-NR⁴C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)-(OCH₂CH₂)_n-或-(OCH₂CH₂)_n-;每个p独立地是0、1或2。在一些实施方案中,L⁵是不存在的。

[0497] 在一些实施方案中,L⁵是不存在的、-NR⁴C(=O)-(CH₂)_n-、-C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-、-C(=O)NR⁴-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-或-NR⁴C(=O)-(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)_q-;每个q独立地是1或2。

[0498] 在一些实施方案中,L¹是未取代的或经取代的C₁-C₆亚烷基、未取代的或经取代的

C_1-C_{10} 杂亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基; L^2 是不存在的、 $-C(=O)NR^4$ - (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$;每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是1或2; L^4 是不存在的、 $-C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基)-、 $-C(=O)NR^4$ - (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基)-、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$; L^5 是 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。

[0499] 在一些实施方案中, L^1 是未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基; L^2 是不存在的、 $-C(=O)NR^4$ - (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$;每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是1或2; L^4 是不存在的; L^5 是不存在的、 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。

[0500] 在一些实施方案中, L^1 是未取代的或经取代的 C_1-C_6 亚烷基、未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 杂亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇、未取代的或经取代的环亚己基或未取代的或经取代的亚苯基; L^2 是不存在的、 $-C(=O)NR^4$ - (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-NR^4C(=O)-$ (未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基)-、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 、 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-$;每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是1或2; L^3 是一个或多个独立选择的选自以下的基团:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸和氨基(未取代的或经取代的苄基)氨基甲酸酯;其中氨基酸的任何游离胺任选地被 R^5 或 $-C(=O)(R^5)$ 取代,并且氨基酸的任何游离羧酸任选地被 $-C(=O)NH(R^5)$ 替代;每个 R^5 独立地是未取代的或经取代的 C_1-C_{10} 亚烷基、 C_4-C_{20} 聚乙二醇或未取代的或经取代的苯基,其中经取代的苯基被1、2、3、4或5个独立地选自F、Cl、Br、I、 $-CH_3$ 和 CF_3 的基团取代; L^4 是不存在的; L^5 是 $-NR^4C(=O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 、 $-C(=O)NR^4-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$ 或 $-NR^4C(=O)-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_q-$;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。

[0501] 在一些实施方案中,每个m独立地是3、4、5或6。在一些实施方案中,每个m独立地是4、5或6。在一些实施方案中,每个p独立地是1。在一些实施方案中,每个p独立地是2。

[0502] 在一些实施方案中,每个n独立地是3、4、5或6。在一些实施方案中,每个n独立地是4、5或6。在一些实施方案中,每个q独立地是1。在一些实施方案中,每个q独立地是2。

[0503] 在一些实施方案中,每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是2;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是1或2。在一些实施方案中,每个m独立地是1、2、3、4、5或6;每个p独立地是2;每个n独立地是1、2、3、4、5或6;每个q独立地是2。

[0504] 在一些实施方案中,每个 X^3 独立地是O。在一些实施方案中,每个 X^3 独立地是 NR^4 。在一些实施方案中,每个 R^4 是氢。在一些实施方案中,每个 R^4 是 C_1-C_6 烷基。

[0505] 在一些实施方案中,每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基、 C_4-C_{30} 聚乙二醇以及未取代的或经取代的亚芳基、未取代的或经取代的杂亚芳基。在一些实施方案中,每个 R^5 独立地选自 C_1-C_{10} 烷基或 C_4-C_{30} 聚乙二醇。在一些实施方案中,每个 R^5 独立地选自未取代的或经取代的亚芳基或未取代的或经取代的杂亚芳基。

[0506] 在一些实施方案中,每个 R^a 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基。在一些实施方案中,每个 R^a 独立地是氢。在一些实施方案中,每个 R^a 独立地是 C_1-C_4 烷基。

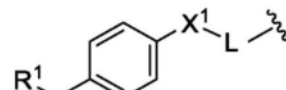
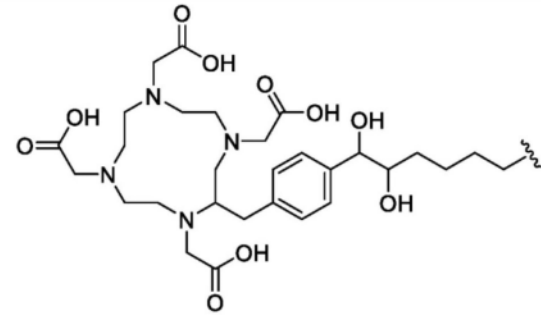
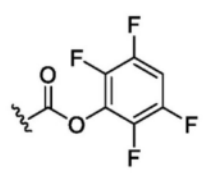
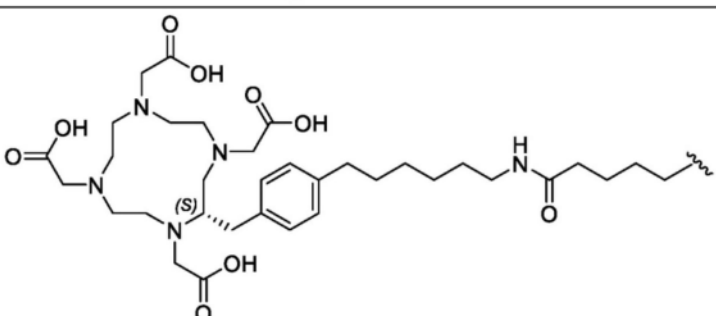
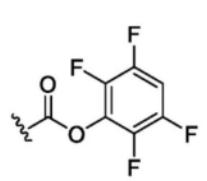
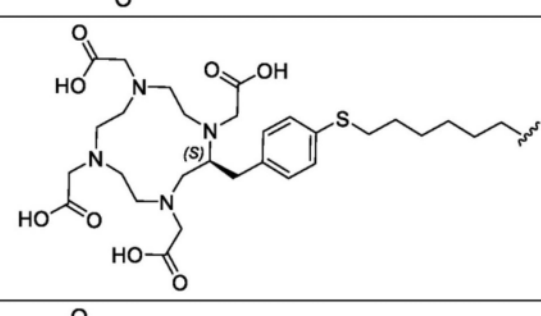
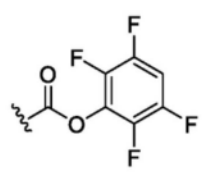
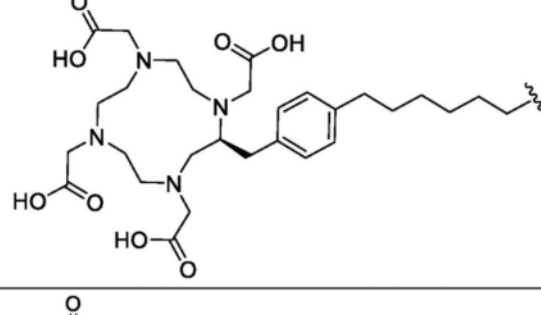
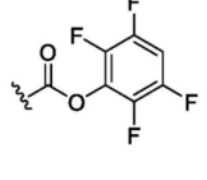
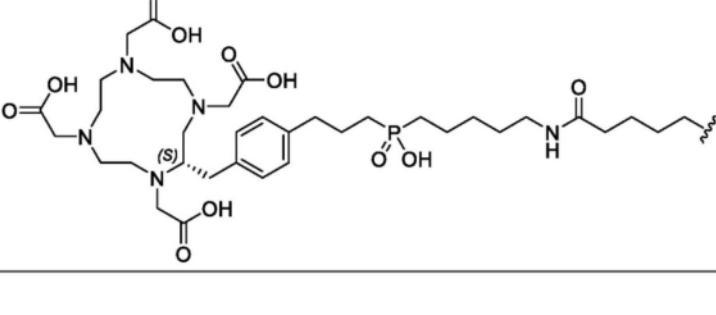
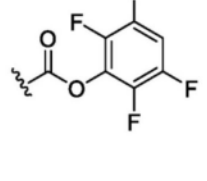
[0507] 在一些实施方案中,每个 R^b 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基。在一些实施方案中,每个 R^b 独立地是氢。在一些实施方案中,每个 R^b 独立地是 C_1-C_4 烷基。

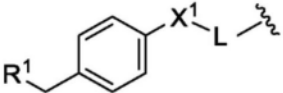
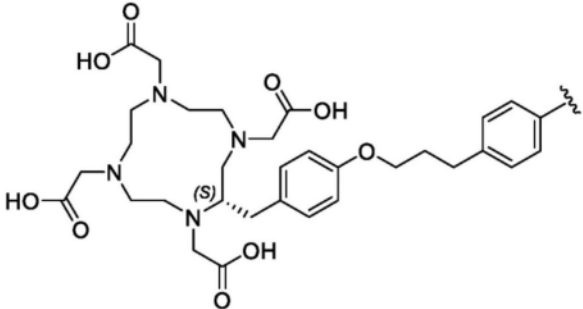
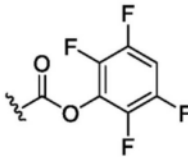
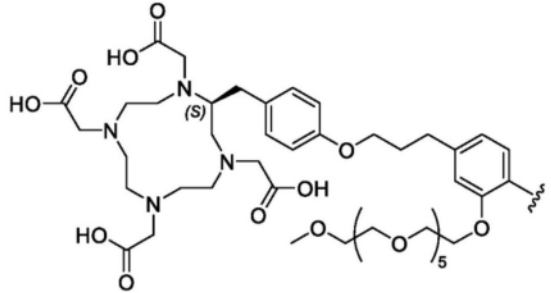
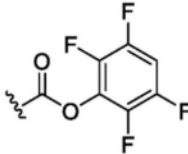
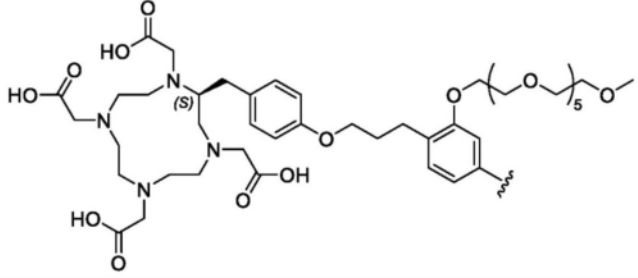
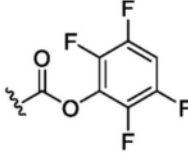
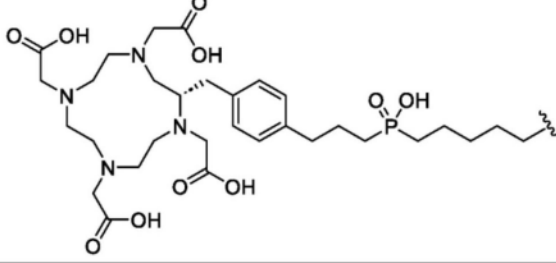
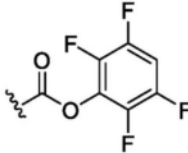
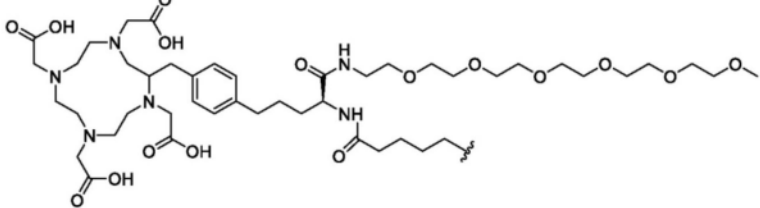
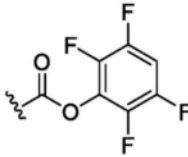
[0508] 用于制备本文所述免疫缀合物的示例性化合物包括表A中描绘的化合物。

[0509] 表A

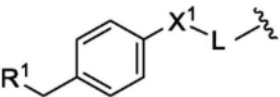
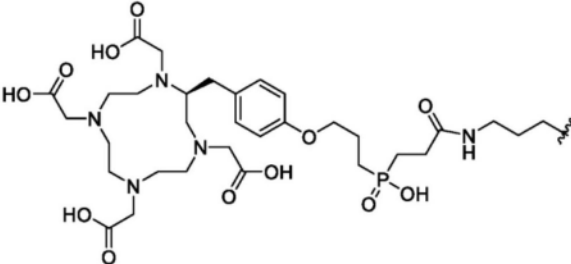
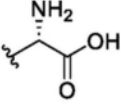
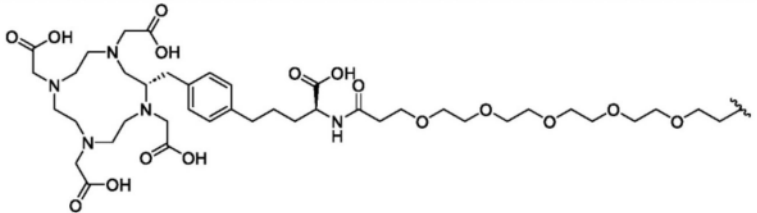
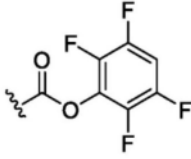
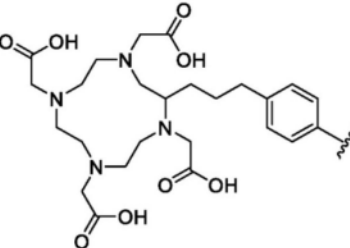
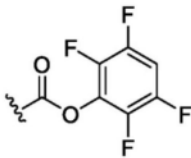
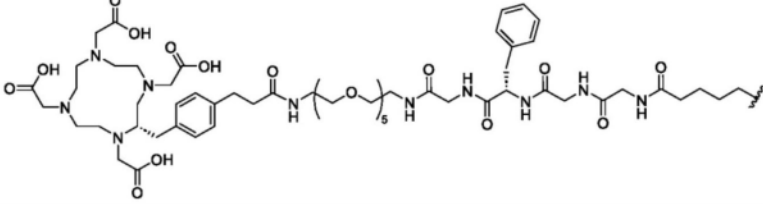
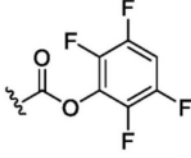
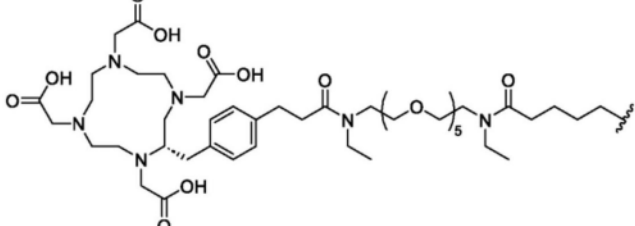
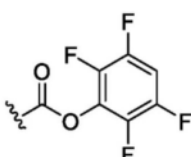
化合物 编号		R ²
2-1		
2-2		
2-3		
2-4		
2-5		

[0511]

化合物 编号		R ²
2-6		
2-7		
2-8		
2-9		
2-10		

化合物 编号		R ²
2-11		
2-12		
2-13		
3-1		
3-2		

[0513]

化合物 编号		R ²
3-3		
3-4		
3-5		
3-13		
3-16		

[0514] 放射性免疫缀合物

[0515] 在一个实施方案中,本发明提供免疫缀合物。在一个实施方案中,当如此标记、连接或负载 α -发射体时,免疫缀合物能够在体内递送 α -发射体。在一个实施方案中,当如此标记、连接或负载时,免疫缀合物还能够在体内递送其他放射性同位素(β -发射体和/或 γ -发射体)和/或其他原子。在一个实施方案中,当如此标记、连接或负载时,免疫缀合物能够在体内递送成像金属(例如, ^{111}In 、 ^{89}Zr 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 或 ^{13}Ce)。

[0516] 本公开的免疫缀合物可以负载放射性同位素以实现治疗或诊断效果。在某些实施方案中,螯合因子还可以包含放射性同位素。在某些实施方案中,放射性同位素是 α 发射体。在某些实施方案中,放射性同位素是选自由以下组成的列表的 α 发射体: ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。在某些实施方案中,放射性同位素是 ^{225}Ac 。在某些实施方案中,放

放射性同位素是 β 发射体。在某些实施方案中,放射性同位素是选自以下的 β 发射体: ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 和 ^{153}Sm 。

[0517] 本文还描述了一种制备放射性免疫缀合物的方法,所述方法包括将本公开的免疫缀合物负载或复合至放射性同位素。在某些实施方案中,放射性同位素是 α 发射体。在某些实施方案中,放射性同位素是选自由以下组成的列表的 α 发射体: ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。在某些实施方案中,放射性同位素是 ^{225}Ac 。在某些实施方案中,放射性同位素是 β 发射体。在某些实施方案中,放射性同位素是选自以下的 β 发射体: ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 和 ^{153}Sm 。

[0518] 在一个方面,本发明提供一种放射性免疫缀合物,其包含本发明的免疫缀合物和 α 发射放射性同位素。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素选自包含以下的组: ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素选自由以下组成的组: ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素是 ^{225}Ac 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素是 ^{223}Ra 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素是 ^{224}Ra 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素是 ^{227}Th 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素是 ^{212}Pb 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素是 ^{212}Bi 。在一个实施方案中,放射性免疫缀合物的 α 发射放射性同位素是 ^{213}Bi 。

[0519] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物与放射性同位素组合以提供本发明的放射性免疫缀合物。在一些实施方案中,放射性同位素是 ^{225}Ac 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{89}Sr 、 ^{153}Sm 、 ^{213}Bi 、 ^{213}Po 、 ^{212}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{149}Tb 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{137}Cs 、 ^{212}Pb 或 ^{103}Pd 。在一些实施方案中,放射性同位素是 α 发射体,诸如例如 ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。在一些实施方案中,放射性同位素是 β 粒子发射体,诸如例如 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 和 ^{153}Sm 。在一些实施方案中,放射性同位素既是 α 粒子发射体又是 β 和/或 γ 粒子发射体。在一些实施方案中,放射性同位素既是 β 粒子发射体又是 γ 粒子和/或光子发射体。在一些实施方案中,放射性免疫缀合物用 α -发射体和 β -发射体标记、连接或负载,并且因此包含它们。在一些实施方案中,诸如例如,从 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{111}In 和 ^{134}Ce 当中选择放射性同位素,以在放射成像中使用。

[0520] 本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物可以包含除放射性同位素之外的其他货物或有效载荷(payload),包括各种细胞毒性剂,诸如例如,小分子化疗剂、细胞毒性抗生素、烷化剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂和/或微管蛋白抑制剂。例如,本发明的免疫缀合物可以用于将非放射性同位素细胞毒素递送至靶细胞。细胞毒性剂的非限制性例子包括氮丙啶(aziridines)、顺铂(cisplatins)、四嗪(tetrazines)、丙卡巴肼(procarbazine)、六甲蜜胺(hexamethylmelamine)、长春花生物碱(vinca alkaloids)、紫杉烷(taxanes)、喜树碱(camptothecins)、依托泊苷(etoposide)、多柔比星(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、替尼泊苷(teniposide)、新生霉素(novobiocin)、阿柔比星(aclarubicin)、蒽环类抗生素(anthracyclines)、放线菌素(actinomycin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin)、丝裂霉素(mitomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、多拉司他汀(dolastatins)、美登素

(maytansines)、多西紫杉醇(docetaxel)、阿霉素(adriamycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、奥瑞他汀(auristatin)、吡咯苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiazepine)、卡铂(carboplatin)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨(capecitabine)、丝裂霉素C、紫杉醇(paclitaxel)、1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲(BCNU)、利福平(rifampicin)、顺铂、甲氨蝶呤(methotrexate)和吉西他滨(gemcitabine)。

[0521] 在一些实施方案中,本发明的放射性免疫缀合物包含选自包含以下的组的放射性同位素: ^{225}Ac 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{89}Sr 、 ^{153}Sm 、 ^{213}Bi 、 ^{213}Po 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{149}Tb 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{137}Cs 、 ^{212}Pb 和 ^{103}Pd 。

[0522] 在一些实施方案中,本发明的放射性免疫缀合物包含选自由以下组成的组的放射性同位素: ^{225}Ac 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{89}Sr 、 ^{153}Sm 、 ^{213}Bi 、 ^{213}Po 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{149}Tb 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{137}Cs 、 ^{212}Pb 和 ^{103}Pd 。

[0523] 在一些实施方案中,放射性同位素是发射 α 粒子的放射性同位素,其包含 ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 或 ^{213}Bi 。

[0524] 在一些实施方案中,放射性同位素是选自由以下组成的组的发射 α 粒子的放射性同位素: ^{225}Ac 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。

[0525] 免疫缀合物、抗原结合区和重链可变区的另外的实施方案描述如下:

[0526] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含二聚化结构域或基序。在一些另外的实施方案中,二聚化结构域或基序在变体恒定区、接头或铰链区中。

[0527] 技术人员可以使用本领域已知的途径和方法工程化本发明的多聚体免疫缀合物。例如,工程化的半胱氨酸残基可以形成共价键,从而使自发组装的多聚体结构稳定(参见例如,Glockshuber R等人,Biochemistry 29:1362-7(1990))。例如,可以使用在特定位置引入半胱氨酸残基来产生二硫键稳定的结构,如Cys-双抗体、scFv'多聚体、VHH多聚体、VNAR多聚体和IgNAR多聚体,诸如例如通过添加以下氨基酸残基:GGGGC和SGGGGC(Tai M等人,Biochemistry 29:8024-30(1990);Caron P等人,J Exp Med 176:1191-5(1992);Shopes B,J Immunol 148:2918-22(1992);Adams G等人,Cancer Res 53:4026-34(1993);McCartney J等人,Protein Eng 18:301-14(1994);Perisic O等人,Structure 2:1217-26(1994);George A等人,Proc Natl Acad Sci USA 92:8358-62(1995);Tai M等人,Cancer Res(Suppl)55:5983-9(1995);Olafsen T等人,Protein Eng Des Sel 17:21-7(2004))。

[0528] 可替代地,可以使用彼此自身缔合或多聚化的多肽结构域将两个或更多个多肽链连接在一起(参见例如,US 6,329,507)。例如,已使用添加羧基末端多聚化结构域来构建包含免疫球蛋白结构域的多价蛋白,诸如例如,scFv、自主 V_H 结构域、 V_HH 、 V_{NAR} 和IgNAR。技术人员已知的自身缔合结构域的例子包括:免疫球蛋白恒定结构域(诸如杵臼(knobs-into-holes);静电转向和IgG/IgA链交换);免疫球蛋白Fab链(例如,(Fab-scFv)₂和(Fab'scFv)₂);免疫球蛋白Fc结构域(例如,(sc双抗体-Fc)₂、(scFv-Fc)₂和scFv-Fc-scFv);免疫球蛋白CHX结构域;免疫球蛋白CH1-3区;免疫球蛋白CH3结构域(例如,(sc双抗体-CH3)₂、LD微抗体和Flex-微抗体);免疫球蛋白CH4结构域;CHCL结构域;两亲性螺旋束(例如,scFv-HLX);螺旋-转角-螺旋结构域(例如,scFv-dH1x);包括亮氨酸拉链和软骨寡聚基质蛋白的螺旋卷曲结构(例如,scZIP);cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)二聚化和对接结构域(DDD)与A激酶锚蛋白(AKAP)锚定结构域(AD)的组合(也称为“对接-锁定(dock-and-lock)”或“DNL”);链霉亲和

素;志贺样毒素(verotoxin)B多聚化结构域;来自p53的四聚化区;和barnase-barstar相互作用结构域(Pack P,Plückthun A,Biochemistry 31:1579-84(1992);Holliger P等人,Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-8(1993);Kipriyanov S等人,Hum Antibodies Hybridomas6:93-101(1995);de Kruif J,Logtenberg T,J Biol Chem 271:7630-4(1996);Hu S等人,Cancer Res 56:3055-61(1996);Kipriyanov S等人,Protein Eng 9:203-11(1996);Rheinnecker M等人,J Immunol157:2989-97(1996);Tershkikh A等人,Proc Natl Acad Sci USA 94:1663-8(1997);Müller K等人,FEBS Lett 422:259-64(1998);Cloutier S等人,Mol Immunol 37:1067-77(2000);Li S等人,Cancer Immunol Immunother 49:243-52(2000);Schmiedl A等人,Protein Eng 13:725-34(2000);Schoonjans R等人,J Immunol 165:7050-7(2000);Borsi L等人,Int J Cancer 102:75-85(2002);Deyev S等人,Nat Biotechnol21:1486-92(2003);Wong W,Scott J,Nat Rev Mol Cell Biol 5:959-70(2004);Zhang J等人,J Mol Biol 335:49-56(2004);Baillie G等人,FEBS Letters 579:3264-70(2005);Rossi E等人,Proc Natl Acad Sci USA 103:6841-6(2006);Simmons D等人,J Immunol Methods 315:171-84(2006);Braren I等人,Biotechnol Appl Biochem 47:205-14(2007);Chang C等人,Clin Cancer Res 13:5586-91s(2007);Liu M等人,Biochem J 406:237-46(2007);Zhang J等人,Protein Expr Purif 65:77-82(2009);Bell A等人,Cancer Lett 289:81-90(2010);Iqbal U等人,Br J Pharmacol 160:1016-28(2010);Asano R等人,FEBS J 280:4816-26(2013);Gil D,Schrum A,Adv Biosci Biotechnol4:73-84(2013))。

[0529] 技术人员可以使用本领域已知的各种基于scFv的多肽相互作用,诸如例如基于scFv的二聚体、三聚体、四聚体复合物等来工程化本发明的多聚体免疫缀合物。例如,scFv中接头的长度可以影响基于非共价的、多聚体、多价结构的自发组装。一般而言,十二个氨基酸或更少的接头,包括不存在任何接头,经由相比于链内结构域配对更有利的分子间结构域交换而促进包含scFv的多肽或蛋白多聚化成更高分子量物质(参见例如,Dolezal O等人,Protein Eng 16:47-56(2003))。然而,根本不具有接头或具有示例性长度为15个氨基酸残基的接头的scFv可以多聚化(Whitlow M等人,Protein Eng 6:989-95(1993);Desplancq D等人,Protein Eng 7:1027-33(1994);Whitlow M等人,Protein Eng 7,1017-26(1994);Alfthan K等人,Protein Eng 8:725-31(1995))。技术人员可以鉴定使用本领域已知的和/或本文所述的技术产生和/或纯化的多聚体结构。

[0530] 在一些实施方案中,考虑了本文所述的免疫缀合物的氨基酸序列变体。例如,可能需要改进本发明的免疫缀合物的结合亲和力、稳定性和/或其他生物学性质(例如,改变半衰期或治疗窗,降低免疫原性或增加制造的容易性)。免疫缀合物的氨基酸序列变体可以通过将适当的修饰引入编码免疫缀合物的核苷酸序列中,或通过合成所需的免疫缀合物或多肽来制备。此类修饰包括例如免疫球蛋白结构域或多肽序列的融合;铰链、接头和/或螯合因子组分的取代;放射性同位素的取代。此类修饰包括例如免疫缀合物的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行融合、缺失、插入和取代的任何组合以得到最终构建体,前提是最终构建体具有所需的特征,例如某一抗原结合的结合亲和力水平、某一 K_D 水平和/或某一 K_{off} 水平。

[0531] 本文提供了抗原结合抗体片段和CDR集合。例如,当与全长天然抗体(例如,全长骆驼

驼科动物VHH IgG2或IgG3)相比时,此类片段可以在N末端或C末端被截短,或者可以缺乏内部残基。某些片段可能缺乏对于抗体的所需生物活性或减小本发明的免疫缀合物的总大小而言不是必需的氨基酸残基或结构域。

[0532] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物的变体通过掺入另外的结构而变得较大。在一些实施方案中,免疫缀合物连接至异源部分或易于检测的部分。在一些另外的实施方案中,键联包含蛋白质性融合。在一些另外的实施方案中,异源部分是细胞毒性剂。在一些实施方案中,添加羧基末端赖氨酸残基以提供位点特异性附接位点。氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基末端和/或羧基末端融合以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N末端甲硫氨酰基残基的免疫缀合物。免疫缀合物的其他插入变体包括免疫缀合物的N末端或C末端与酶(例如,针对ADEPT)或增加免疫缀合物的血清半衰期的多肽的融合。

[0533] 可以修饰编码本发明的免疫缀合物的核酸以产生嵌合或融合免疫缀合物多肽,例如通过取代人重链和轻链恒定结构域(用CH和CO取代同源鼠科动物序列(美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc Natl Acad Sci USA 81:6851(1984)))或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的编码序列的全部或部分融合。非免疫球蛋白多肽序列可以取代免疫缀合物的恒定结构域,或者它们取代免疫缀合物的一个抗原结合位点的可变结构域以产生包含一个对一种抗原具有特异性的抗原结合位点和另一个对一种不同抗原具有特异性的抗原结合位点的嵌合二价免疫缀合物。

[0534] 可以例如使用例如美国专利号5,364,934中阐述的保守和非保守突变的任何技术和指导来产生用作本文所述的发明中的抗原结合结构域的抗体构建体的变异。变异可以是编码免疫缀合物或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,其导致与天然序列抗体或多肽相比的氨基酸序列变化。任选地,变异是通过在免疫缀合物的一个或多个结构域中将至少一个氨基酸取代为任何其他氨基酸来实现的。通过将免疫缀合物的序列与同源已知蛋白质分子的序列进行比较并且最小化在同源性高的区域中进行的氨基酸序列变化的数量,可以找到确定可以插入、取代或删除哪个氨基酸残基而不对所需活性产生不利影响的指导。氨基酸取代可以是将一个氨基酸替换为另一个具有类似结构和/或化学性质的氨基酸的结果,诸如将亮氨酸替换为丝氨酸,即,保守氨基酸替换。插入或缺失可以任选地在约1至5个氨基酸的范围内。允许的变异可以通过系统地在序列中进行氨基酸的插入、缺失或取代并且测试所得变体的全长或成熟天然序列所表现出的活性来确定。

[0535] 在具体的实施方案中,感兴趣的保守取代显示在表B和C中,包括在优选取代的标题下。如果此类取代导致生物活性的变化,则引入更具实质性的变化(在表C中命名为示例性取代,或如下文参考氨基酸类别进一步描述),并筛选产物。

[0536] 表C

[0537]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg

原始残基	示例性取代	优选取代
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

[0538] 本发明的免疫缀合物的功能或免疫学标识的实质性修饰是通过选择取代完成的, 所述取代在它们维持以下的效果方面显著不同: (a) 取代区域中多肽主链的结构, 例如, 呈片状或螺旋状构象; (b) 靶位点处分子的电荷或疏水性; 或 (c) 侧链的堆积体积。基于常见的侧链性质, 天然存在的残基被分成以下各组:

[0539] (1) 疏水性: 正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0540] (2) 中性亲水性: cys、ser、thr;

[0541] (3) 酸性: asp、glu;

[0542] (4) 碱性: asn、gln、his、lys、arg;

[0543] (5) 影响链取向的残基: gly、pro; 以及

[0544] (6) 芳香族: trp、tyr、phe。

[0545] 非保守取代将需要将这些类别之一的成员交换为另一个类别。此类取代的残基也可以引入保守取代位点, 或更优选地, 剩余的 (非保守) 位点。

[0546] 可以使用本领域已知的方法进行变异, 诸如例如寡核苷酸介导的 (定点) 诱变、丙氨酸扫描和PCR诱变。可以对克隆的DNA进行定点诱变 (Carter等人, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等人, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987))、盒诱变 (Wells等人, Gene,

34:315 (1985))、限制选择诱变(Wells等人,Philos.Trans.R.Soc.London SerA,317:415 (1986))或其他已知技术,以产生编码本发明的免疫缀合物变体的DNA分子。

[0547] 在一些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的免疫缀合物变体。取代诱变的感兴趣的位点包括免疫球蛋白可变结构域HVR和FR以及免疫球蛋白恒定结构域内的区域。可以将氨基酸取代引入感兴趣的免疫缀合物中,并且筛选产品的所需活性,例如,提高/保留的抗原结合、降低/保留的免疫原性、提高/保留的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、提高/保留的补体依赖性细胞毒性(CDC)、提高/保留的靶标抑制和/或提高/保留的抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。类似地,可以将氨基酸取代引入感兴趣的免疫缀合物中,并且筛选产物的活性降低或消除,例如ADCC、CDC、靶抑制和/或ADCP。

[0548] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般而言,选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体将在某些生物学性质(例如,增加的亲和力、降低的免疫原性)方面具有修饰(例如,提高)并且/或者将基本上保留亲本抗体的某些生物学性质。说明性取代变体是亲和力成熟的抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术诸如本文所述的那些技术方便地生成。简言之,一个或多个HVR残基是突变的,并且变体抗体在噬菌体上展示,并且筛选其特定的生物活性(例如,结合亲和力)。

[0549] 可以在HVR中进行改变(例如,取代),例如以提高免疫缀合物亲和力。此类改变可以在HVR“热点”(即在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基)(参见例如,Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或SDR(a-CDR)中进行,测试所得变体VH或VL的结合亲和力。例如,Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编著,Human Press,Totowa,NJ,(2001))中描述了通过构建二级文库和从二级文库中重新选择来实现亲和力成熟。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后产生二级文库。然后筛选文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,在所述方法中若干HVR残基(例如,一次4-6个残基)被随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定参与抗原结合的HVR残基。CDR-H3和CDR-L3尤其经常被靶向。

[0550] 在一些实施方案中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低免疫缀合物结合抗原的能力即可。例如,可以在HVR中进行不显著降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文所提供的保守取代)。此类改变可以在HVR“热点”或SDR之外。在上文提供的变体VH和VL序列的一些实施方案中,每个HVR是未改变的,或者包含不多于一个、两个或三个氨基酸取代。

[0551] 可用于鉴定可以被诱变靶向的抗体的残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所述。在此方法中,鉴定一个残基或一组靶残基(例如,带电荷的残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu),并且将它们替换为中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸),以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在氨基酸位置处引入另外的取代,证明对初始取代的官能敏感性。

[0552] 可替代地或另外地,抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和相邻残基可以作为取代候选者被靶向或消除。可以筛选变体以确定它

们是否含有所需性质。

[0553] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗体构建体(在本文中用作抗原结合区),所述抗体构建体包含人源化免疫球蛋白结构域。

[0554] 非人(例如,骆驼科动物、鼠科动物或兔)抗体的人源化形式是含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如,Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合子序列)。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),在其中来自受体互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(诸如,骆驼科动物、小鼠、大鼠或兔)(供体抗体)的具有期望的特异性、亲和力和能力的CDR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基被对应的非人残基替换。人源化抗体还可以包含既不在受体抗体中也不在导入的CDR或框架序列中发现的残基。一般而言,人源化抗体将包含至少一个并且通常两个可变结构域中的基本上全部,其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或基本上全部FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分(Jones等人,Nature,321:522-5(1986);Riechmann等人,Nature,332:323-9(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-6(1992))。

[0555] 用于人源化非人抗体的方法是本领域熟知。一般而言,人源化抗体具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。人源化可以基本上遵循Winter和同事的方法(Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536(1988)),通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的对应序列来进行。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),在其中基本上少于完整的人可变结构域被来自非人物种的对应序列取代。在实施过程中,人源化抗体通常是人抗体,在其中一些CDR残基和可能一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0556] 根据另一种方法,可以在抗体的人源化期间通过选择修复的高变区来恢复抗原结合(参见例如,2005年2月18日提交的美国申请序列号11/061,841)。所述方法包括将非人高变区掺入受体框架上,并且进一步在一个或多个高变区中引入一个或多个氨基酸取代而无需修饰受体框架序列。可替代地,一个或多个氨基酸取代的引入可以伴随着受体框架序列中的修饰。

[0557] 一般来讲还可以用丝氨酸取代不涉及维持本发明的免疫缀合物的正确构象的任何半胱氨酸残基,以提高分子的氧化稳定性并且防止异常交联。相反地,可以将半胱氨酸键添加到本发明的免疫缀合物中以提高其稳定性(特别是在抗体是抗体片段,诸如Fv片段或VHH片段的情况下)。

[0558] 在一些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化的免疫缀合物,其中免疫缀合物的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在一些实施方案中,取代的残基出现在免疫缀合物的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位在免疫缀合物的可及位点处,并且可以用于将免疫缀合物缀合至其他部分,诸如药物部分或接头-药物部分。在一些实施方案中,以下残基中的任何一个或多个可以被半胱氨酸取代:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程化的抗体

可以如例如US 7,521,541中所述生成。

[0559] 技术人员将理解,氨基酸变化可以改变免疫缀合物的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数量或位置或改变膜锚定特征。

[0560] 在一些实施方案中,本文所提供的免疫缀合物被改变以增加或降低免疫缀合物被糖基化的程度和/或改变糖基化模式。“改变天然糖基化模式”出于本文的目的旨在意指缺失本发明的亲本免疫缀合物中发现的一个或多个碳水化合物部分(通过除去潜在的糖基化位点或通过化学和/或酶促手段缺失糖基化),和/或添加本发明的天然序列免疫缀合物中不存在的一个或多个糖基化位点。此外,所述短语包括天然蛋白的糖基化的定性变化,涉及存在的各种碳水化合物部分的特性和比例的变化。

[0561] 抗体和其他多肽的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链的附接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X为除脯氨酸外的任何氨基酸)是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链的酶促附接的识别序列。因此,在多肽中存在这些三肽序列的任一个产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸的附接,羟基氨基酸最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但是也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0562] 向免疫缀合物添加或缺失糖基化位点可以通过改变氨基酸序列以使得产生或删除一个或多个糖基化位点来方便地完成。向本发明的免疫缀合物添加糖基化位点可以通过改变氨基酸序列以使得其含有一个或多个上述三肽序列来便利地实现(对于N-连接的糖基化位点)。改变还可以通过向本发明的原始免疫缀合物的序列添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或被其取代来进行(对于O-连接的糖基化位点)。本发明的免疫缀合物的氨基酸序列可以任选地通过在DNA水平上的变化而改变,特别是通过在预选的碱基处使编码本发明的免疫缀合物的DNA突变,使得生成将翻译成所需氨基酸的密码子。

[0563] 在免疫缀合物包含Fc区的情况下,与其附接的碳水化合物可以被改变。哺乳动物细胞所产生的天然抗体通常包含通过N-键联附接至Fc区CH2结构域的Asn297的分支双触角(biantennary)寡糖(参见例如,Wright等人,TIBTECH 15:26-32(1997))。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接至双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对本发明的免疫缀合物中的寡糖进行修饰,以产生某些性质改善的免疫缀合物变体。

[0564] 增加本发明的免疫缀合物上碳水化合物部分的数量的一种手段是通过糖苷与多肽的化学或酶促偶联。此类方法在本领域中有所描述,例如在1987年9月11日公布的WO 87/05330中以及Aplin和Wriston,CRC Crit.Rev.Biochem.,pp.259-306(1981)。

[0565] 本发明的免疫缀合物上存在的碳水化合物部分的去除可以通过化学或酶促的方式或通过编码充当糖基化靶标的氨基酸残基的密码子的突变取代来完成。化学去糖基化技术是本领域已知的并且例如被Hakimuddin等人,Arch.Biochem.Biophys.,259:52(1987)以及Edge等人,Anal.Biochem.,118:131(1981)描述。多肽上的碳水化合物部分的酶促裂解可以通过使用如Thotakura等人,Meth.Enzymol.,138:350(1987)所述的多种内切和外切糖苷酶来实现。

[0566] 在一些实施方案中,提供了具有缺乏(直接或间接)附接至Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构的免疫缀合物变体。例如,此类免疫缀合物中岩藻糖的量可以为1%至80%、1%至

65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量通过相对于附接至Asn297的所有糖结构(例如,复合物、混合及高甘露糖结构)的总和,计算糖链内Asn297处岩藻糖的平均量来确定,如通过MALDI-TOF质谱法所测量,如例如WO 2008/077546所述。Asn297是指位于Fc区中约位置297(Fc区残基的Eu编号)处的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的序列变异较小,所以Asn297也可能位于位置297上游或下游约 ± 3 个氨基酸处,即位置294与300之间。此类岩藻糖基化变体可能具有提高的ADCC功能(参见例如,US2003/0157108;US2004/0093621)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷”抗体变体相关的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US2003/01 15614;US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/01 10282;US2004/0109865;WO 2003/0851 19;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031 140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US2003/0157108;WO 2004/056312,Adams等人,尤其在实施例11)以及敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见例如,Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);WO2003/085107)。

[0567] 免疫缀合物变体还具有平分型(bisected)寡糖,例如,在其中附接至抗体Fc区的双触角寡糖被GlcNAc平分。此类免疫缀合物变体可能具有减少的岩藻糖基化和/或提高的ADCC功能。此类抗体变体的例子描述于例如WO 2003/011878、US 6,602,684、US2005/0123546中。还提供了在附接至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的免疫缀合物变体。此类免疫缀合物变体可能具有提高的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/030087、WO 1998/058964和WO 1999/022764中。

[0568] 免疫缀合物衍生物及其他修饰

[0569] 本发明的免疫缀合物的共价修饰包括在本发明的范围内。一种类型的共价修饰包括使本发明的免疫缀合物的靶向氨基酸残基与能够与免疫缀合物的选定侧链或N末端或C末端残基反应的有机衍生剂反应。使用双功能剂的衍生化可用于例如将本发明的免疫缀合物交联至水不溶性支持基质或表面,以便在用于纯化本发明的免疫缀合物的方法中使用,反之亦然。常用的交联剂包括例如1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙烷;戊二醛;N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如与4-叠氮基水杨酸的酯;同型双功能亚氨酯,包括二琥珀酰亚胺酯,诸如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯);双官马来酰亚胺,诸如双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷;以及诸如甲基-3-[(对叠氮基苯基)二硫代]丙亚胺酸酯的剂。

[0570] 其他修饰包括:谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺基为对应的谷氨酰胺基和天冬氨酰胺基残基;脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化;赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties,W.H.Freeman&Co.,San Francisco,pp.79-86(1983));N末端胺的乙酰化;和任何C末端羧基的酰胺化。

[0571] 在一些实施方案中,本文所提供的免疫缀合物可以被进一步修饰成含有本领域已知并且易得的另外的非蛋白质性部分。适用于免疫缀合物的衍生化的部分包括但不限于水

溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于：聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛可能由于其在水中的稳定性而在制造中具有优势。聚合物可以是任何分子量,并且可以是分支的或非分支的。附接至免疫缀合物的聚合物的数量可能不同,并且如果连接了多于一个聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可以基于以下考量来确定,包括但不限于待提高的免疫缀合物的具体性质或功能、免疫缀合物衍生物是否将在定义的条件用于下用于疗法等。

[0572] 本发明的PEG衍生的免疫缀合物可以包含有包含一个或多个-CH₂CH₂O-的接头,并且可以用于改变免疫缀合物的生物分布和药代动力学。PEG可以呈聚合物形式或呈离散的低聚物形式被制备。这些聚合物的双功能化型式可以将免疫缀合物与螯合剂连接和/或为总体分子提供另外的大小和/或溶解度。在一些实施方案中,PEG衍生化的免疫缀合物与其未衍生化的亲本分子相比表现出降低的免疫原性。产生本发明的免疫缀合物的方法

[0573] 本发明提供一种组合物,其包含如上述实施方案中任一项或本文所述的免疫缀合物中的一种或多种。在另一方面,本发明提供一种分离的核酸,其编码如本文所述的放射性同位素递送平台。本文还提供编码本发明的免疫缀合物的蛋白质组分的核酸、包含前述核酸的表达载体以及包含前述表达载体的宿主细胞。

[0574] 在另一方面,本发明提供一种宿主细胞,其包含如本文所提供的核酸和/或载体。在一些实施方案中,本发明的宿主细胞是分离或纯化的。在一些实施方案中,本发明的宿主细胞在细胞培养基中。本发明的核酸、表达载体和宿主细胞可以用于产生包含本发明的免疫缀合物中的一种或多种的组合物。在一些实施方案中,宿主细胞是真核细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是原核的。在一些实施方案中,宿主细胞是大肠杆菌。

[0575] 下面描述了用于产生根据本发明的方法供使用的本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物的说明性技术。在一些实施方案中,本发明提供一种用于制备本发明的免疫缀合物的方法,所述方法包括在适合于编码放射性同位素递送平台的表达载体的条件下培养如本文所提供的宿主细胞以及回收或纯化放射性同位素递送平台。在一些实施方案中,所述方法还包括用适当的同位素(诸如例如, α 或 β 粒子发射体)放射性标记放射性同位素递送平台。

[0576] 抗原结合结构域、免疫缀合物和核酸的生成和鉴定

[0577] 可以在抗体中鉴定可在本文中用作抗原结合区的抗原结合结构域,所述抗体是单克隆抗体和/或多克隆抗体。使用常规程序容易地将编码单克隆抗体的DNA分离并测序。一旦分离,便可以将DNA放入表达载体中,然后将其转染至宿主细胞(诸如,大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不以另外的方式产生抗体蛋白的骨髓瘤细胞)中,以获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成(参见例如,Skerra等人,Curr.Opinion in Immunol.,5:256-262(1993)以及Plückthun,Immunol Revs.130:151-188(1992))。

[0578] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物的抗原结合结构域或其片段通过筛选噬

菌体文库来分离,所述噬菌体文库含有展示融合至噬菌体外壳蛋白的各种抗体可变区片段(Fv、scFv或VHH)的噬菌体。针对与所需靶抗原或表位的结合对此类噬菌体文库进行筛选。表达能够结合所需抗原的Fv片段、scFv或VHH的克隆被吸附至抗原,并且因此与文库中的非结合克隆分开。然后从抗原洗脱结合克隆,并且其可以通过另外的抗原吸附/洗脱循环被进一步富集。

[0579] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段分离自使用McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990)中描述的技术生成的抗体噬菌体文库。Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)和Marks等人,J Mol Biol.,222:581-597(1991)描述分别使用噬菌体文库分离鼠科动物和人抗体。随后的出版物描述通过链改组产生高亲和力(nM范围)人抗体(Marks等人,Bio/Technology,10:779-783(1992)),以及作为构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组(Waterhouse等人,Nuc Acids Res.21:2265-2266(1993))。可变结构域可以在噬菌体上功能性地展示,呈单链Fv(scFv)片段(在其中VH和VL通过短的柔性肽共价连接)或呈Fab片段(在其中它们各自与恒定结构域融合并且以非共价方式相互作用),如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)所述。

[0580] VH和VL基因库可以通过聚合酶链反应(PCR)单独地克隆,并且在噬菌体文库中随机重组,然后可以如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)所述搜索它们的抗原结合克隆。用于筛选的初始文库可以从非免疫来源构建,以提供针对抗原的高亲和力抗体(参见例如,Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993))。另一例子是通过克隆来自干细胞的未重排V基因片段并且使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区域并在体外完成重排来以合成方式构建的初始文库,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述。

[0581] 文库的筛选可以通过本领域已知的各种技术来完成。例如,靶抗原可以用于包被吸附板的孔,在附接至吸附板的宿主细胞上表达或用于细胞分选,或与生物素缀合以用链霉亲和素包被的珠子捕获,或用于任何其他淘选展示文库的方法。可以通过使用长时间洗涤和单价噬菌体展示(如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)以及WO 1992/09690中所述)以及低抗原包被密度(如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述)来促进解离动力学缓慢(并且结合亲和力强)的抗体的选择。

[0582] 用于筛选cDNA文库的技术是本领域熟知的。可以用被设计来鉴定感兴趣的基因或由其编码的蛋白质的探针(诸如至少约20-80个碱基的寡核苷酸)来筛选文库。可以使用标准程序(诸如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述)用所选探针筛选cDNA或基因组文库。分离编码本发明的免疫缀合物的基因的替代手段是使用PCR方法(Sambrook等人(如上述);Dieffenbach等人,PCR Primer:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1995))。

[0583] 编码本发明的免疫缀合物的DNA可以从cDNA文库获得,所述文库由据信具有本发明的免疫缀合物mRNA并以可检测的水平表达它的组织制备。因此,本发明的人免疫缀合物DNA可以方便地从由人组织制备的cDNA文库获得。编码本发明的免疫缀合物的基因还可以从基因组文库获得或者通过已知的合成程序(例如,自动化核酸合成)获得。对于一些实施方案,可以从产生抗体的细胞诸如杂交瘤细胞分离编码抗体的所需多核苷酸序列并进行测

序。

[0584] 在此类文库筛选方法中鉴定的序列可以与公共数据库诸如GenBank或其他私人序列数据库中寄存且可用的其他已知序列进行比较和比对。分子的限定区域内或跨全长序列的序列同一性(在氨基酸或核苷酸水平上)可以使用本领域已知的和如本文所述的方法来确定。本发明的抗体CDR或重链可变片段中的任一个可以通过设计适于选择感兴趣的噬菌体克隆的抗原筛选程序,然后使用来自感兴趣的噬菌体克隆的可变结构域和/或CDR序列以及Kabat等人,1991(如上述)中所述的合适的恒定区(Fc)序列构建抗体克隆来获得。

[0585] 免疫缀合物产生;本发明的宿主细胞和表达载体

[0586] 下文描述主要涉及通过培养用含有编码本发明的免疫缀合物的核酸的载体转化或转染的细胞来产生本发明的抗体构建体。当然,设想可以采用本领域熟知的替代方法来制备本发明的抗体构建体。例如,适当的氨基酸序列或其一部分可以通过使用固相技术的直接肽合成来产生(例如,Stewart等人,Solid-Phase Peptide Synthesis,W.H.Freeman Co.,San Francisco,CA(1969);Merrifield,J,Am.Chem.Soc.,85:2149-54(1963))。体外蛋白质合成可以使用手动技术或通过自动化进行。例如,可以使用Applied Biosystems肽合成仪(Foster City,CA),使用制造商的说明来完成自动化合成。本发明的免疫缀合物的各个部分可以单独化学合成并且使用化学或酶促方法进行组合以产生本发明的所需免疫缀合物。

[0587] 抗体构建体可以使用重组方法和组合物产生,例如,如US 4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供编码本文所述的抗体的分离核酸。此类核酸可以编码包含抗体VH和/或包含VL氨基酸序列(例如,抗体轻链和/或重链)的氨基酸序列。在另一个实施方案中,提供一种或多种包含此类核酸的载体(例如,表达载体)。在另一个实施方案中,提供一种包含此类核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包含(例如,已用以下转化):(1)包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸的载体。在一些其他实施方案中,宿主细胞包含:(1)包含编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供一种制备本发明的免疫缀合物的方法,其中所述方法包括在适于抗体表达的条件下培养包含编码如上所提供的抗体的核酸的宿主细胞,以及任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0588] 对于本发明的免疫缀合物的重组产生,将编码例如上文所述的抗体构建体的核酸分离并且插入至一个或多个载体中,以便在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以容易地分离并且使用常规程序(例如,通过使用能够特异地结合编码抗体重链和/或轻链的基因的寡核苷酸探针)来测序。编码本发明的免疫缀合物的氨基酸序列(包括序列变体)的核酸分子可以通过技术人员已知的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过对抗体构建体的早期制备的变体或非变体型式的寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒诱变的制备。

[0589] 操纵宿主细胞以用于免疫缀合物产生

[0590] 宿主细胞用本文所述的表达或克隆载体转染或转化以实现本发明的缀合物产生,并且在适当修改的常规营养培养基中培养,以便诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需

序列的基因。培养条件,诸如培养基、温度、pH等,可以由技术人员选择,而无需过度的实验。一般来说,用于最大化细胞培养物的生产能力的原理、规程和实际技术可以在Mammalian Cell Biotechnology:a Practical Approach,M.Butler编著.(IRL Press,1991)和 Sambrook等人(如上述)中找到。

[0591] 适于编码免疫缀合物的核酸和载体的克隆或表达的宿主细胞包括本文所述的原核细胞或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,尤其是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中的抗体片段和多肽表达,参见例如,US 5,648,237;US 5,789,199;US 5,840,523;以及Charlton,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,编著, Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.245-254,其描述在大肠杆菌中抗体片段的表达。在表达之后,可以将免疫缀合物以可溶性级分的形式从细菌细胞糊分离,并且可以进行进一步纯化。

[0592] 除原核生物之外,真核微生物(诸如,丝状真菌或酵母)也是编码免疫缀合物的载体的合适的克隆或表达宿主,包括糖基化途径已经被“人源化”,导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株(参见例如,Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004);Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006))。

[0593] 适于糖基化免疫缀合物的表达的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(例如,无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已鉴定了许多杆状病毒毒株,它们适于与昆虫细胞结合使用,特别是用于草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的转染。植物细胞培养物也用作宿主(参见例如,US 5,959,177;US 6,040,498;US 6,420,548;US 7,125,978;和US 6,417,429)。

[0594] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适合在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是:由SV40(COS-7)转化的猴肾CV 1系;人胚胎肾系,293或293细胞,如例如Graham等人,J Gen Viral.36:59(1977)中所述;幼年仓鼠肾细胞(BHK);小鼠Sertoli细胞,TM4细胞,如例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述;猴肾细胞(CV 1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬科动物肾细胞(MOCK);水牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep 02);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFK CHO细胞(Urlaub等人,Proc Natl Acad Sci USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系,例如Y0、NS0和Sp2/0。对于适于免疫缀合物产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,编著, Humana Press,Totowa,NJ),pp.255-268(2003)。

[0595] 真核细胞转染和原核细胞转化的方法是技术人员已知的,其意指呈染色体外的形式或通过染色体整合体将DNA引入到宿主中,使得DNA是可复制的,例如CaCl₂、CaPO₄、脂质体介导的、聚乙二醇/DMSO和电穿孔。根据所使用的宿主细胞,使用适合此类细胞的标准技术进行转化。如Sambrook等人(如上述)所述采用氯化钙的钙处理或电穿孔通常用于原核生物。根癌农杆菌感染(*Agrobacterium tumefaciens*)用于转化某些植物细胞,如Shaw等人, Gene,23:315(1983)和1989年6月29日公布的W0 89/05859所述。对于没有此类细胞壁的哺乳动物细胞,可以采用Graham和van der Eb,Virology,52:456-457(1978)的磷酸钙沉淀

法。哺乳动物细胞宿主系统转染的一般方面已在美国专利号4,399,216中描述。转化至酵母中通常根据Van Solingen等人, *J. Bact.*, 130:946 (1977) 和Hsiao等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3829 (1979) 的方法进行。然而, 还可以使用其他将DNA引入到细胞中的方法, 诸如通过核显微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞的融合或聚阳离子, 例如聚凝胺、聚鸟氨酸。对于转化哺乳动物细胞的各种技术, 参见Keown等人, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) 和Mansour等人, *Nature*, 336:348-352 (1988)。

[0596] 原核宿主细胞

[0597] 合适的原核生物包括但不限于古细菌 (archaebacteria) 和真细菌 (eubacteria), 诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体, 例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 诸如大肠杆菌。各种大肠杆菌的菌株是可公开获得的, 诸如K12菌株MM294 (ATCC 31,446); X1776 (ATCC 31,537); W3110 (ATCC 27,325) 和K5 772 (ATCC 53,635)。其他合适的原核宿主细胞包括肠杆菌科, 诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) (例如, 大肠杆菌)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) (例如, 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属 (*Serratia*) (例如, 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)) 和志贺氏菌属 (*Shigella*), 以及杆菌属 (诸如, 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)) (例如, 1989年4月12日公布的DD 266,710中公布的地衣芽孢杆菌41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (诸如, 铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*))、根瘤菌属 (*Rhizobia*)、透明颤菌属 (*Vitreoscilla*)、副球菌属 (*Paracoccus*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。这些例子是说明性的而不是限制性的。大肠杆菌菌株W3110是一种有利的宿主或亲本宿主, 因为它是用于重组DNA产物发酵的常见宿主菌株。优选地, 宿主细胞分泌最少量的蛋白水解酶。例如, 菌株W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol.2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp.1190-1219; ATCC保藏号27,325) 可以被修饰以实现编码宿主内源的蛋白质的基因的基因突变, 此类宿主的例子包括: 大肠杆菌W3110菌株1A2, 其具有完整的基因型tonA; 大肠杆菌W3110菌株9E4, 其具有完整的基因型tonA ptr3; 大肠杆菌W3110菌株27C7 (ATCC 55,244), 其具有完整的基因型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169degP ompT kanr; 大肠杆菌W3110菌株37D6, 其具有完整的基因型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169degP ompT rbs7 ilvG kanr; 大肠杆菌W3110菌株40B4, 其是具有非卡那霉素抗性degP缺失突变的菌株37D6; 大肠杆菌W3110菌株33D3, 其具有基因型W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (美国专利号5,639,635); 和具有1990年8月7日颁布的美国专利号4,946,783中所公开的具有突变体周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。其他菌株及其衍生物, 诸如大肠杆菌294 (ATCC 31,446)、大肠杆菌B、大肠杆菌 λ 1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌RV308 (ATCC 31,608) 也是合适的。这些例子是说明性的而不是限制性的。用于构建上述具有确定的基因型的细菌中任一种的衍生物的方法是本领域已知的, 并且描述于例如Bass等人, *Proteins*, 8:309-314 (1990) 中。通常需要考虑复制子在细菌细胞中的复制性来选择适当的细菌。例如, 当使用熟知的质粒例如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410来提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌属或沙门氏菌属物种可以适合用作宿主。通常, 宿主细胞应当分泌最少量的蛋白水解酶, 并且可以合意地将另外的蛋白酶抑制剂掺入细胞培养物中。可替代地, 体外克隆方法, 例如PCR或其他核酸聚合酶反应, 是合适

的。

[0598] 全长抗体、抗体片段和抗体融合蛋白可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。全长抗体在循环中具有更长的半衰期。在大肠杆菌中的产生更快并且更具成本效益。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如,U.S.5,648,237、U.S.5,789,199和U.S.5,840,523,它们描述用于优化表达和分泌的翻译起始区(TIR)和信号序列。在表达之后,可以将免疫缀合物以可溶性级分从大肠杆菌细胞糊中分离,并且可以根据同种型,通过例如蛋白A或G柱进行纯化。最终纯化可以与用于纯化例如在CHO细胞中表达的抗体的过程类似地进行。

[0599] 真核宿主细胞

[0600] 除原核生物之外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是编码本发明的免疫缀合物的载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种常用的低等真核宿主微生物。其他包括:粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach和Nurse, *Nature*, 290:140 (1981); 1985年5月2日公布的EP 139,383);克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*) 宿主(美国专利号4,943,529;Fleer等人, *Bio/Technology*, 9:968-75 (1991)), 诸如例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等人, *J.Bacteriol.*, 154(2):737-742 (1983))、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母(*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母(*K.waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Berg等人, *Bio/Technology*, 8:135 (1990))、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*); 耶氏酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226); 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna等人, *J.Basic Microbiol.*, 28:265-278 (1988)); 假丝酵母属(*Candida*); 里氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) (Case等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5259-5263 (1979)); 许旺酵母属(*Schwanniomyces*), 诸如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日公布的EP 394,538); 以及丝状真菌, 诸如例如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈属(*Tolypocladium*) (1991年1月10日公布的WO 91/00357) 和曲霉属(*Aspergillus*) 宿主, 诸如构巢曲霉(*A.nidulans*) (Ballance等人, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 112:284-289 (1983); Tilburn等人, *Gene*, 26:205-221 (1983); Yelton等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1470-1474 (1984)) 和黑曲霉(*A.niger*) (Kelly和Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 (1985))。甲基营养型酵母(*Methylotrophic yeast*) 适用于本文, 并且包括但不限于能够在甲醇上生长的酵母, 其选自汉逊酵母属(*Hansenula*)、假丝酵母属(*Candida*)、克勒克酵母属(*Kloeckera*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属(*Saccharomyces*)、球拟酵母属(*Torulopsis*) 和红酵母属(*Rhodotorula*)。作为这类酵母的示例的特定物种的列表可以在C.Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982) 中找到。

[0601] 用于表达本发明的糖基化免疫缀合物的合适宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括:昆虫细胞, 诸如果蝇属(*Drosophila*) S2和斜纹夜蛾属(*Spodoptera*) Sf9; 以及植物细胞, 诸如棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的细胞培养物。已鉴定了许多杆状病毒毒株和变体以及来自宿主诸如草地贪夜蛾(*Spodoptera*

frugiperda) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇 (fruit fly)) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的对应许可昆虫宿主细胞。用于转染的多种病毒毒株是可公开获得的, 例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 毒株, 并且此类病毒可以用作根据本发明的本文中的病毒, 特别是用于草地贪夜蛾细胞的转染。

[0602] 然而, 人们对脊椎动物细胞方面最感兴趣, 并且在培养物 (组织培养) 中增殖脊椎动物细胞已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是: 由 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚胎肾系 (被亚克隆以用于在悬浮培养中生长的 293 或 293 细胞, Graham 等人, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); 幼年仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216 (1980)); 小鼠 sertoli 细胞 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬科动物肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 水牛鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 细胞 (Mather 等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 和人肝细胞瘤系 (Hep G2)。

[0603] 宿主细胞用上文所述的表达或克隆载体转化以实现本发明的缀合物产生, 并且在适当修改的常规营养培养基中培养, 以便诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0604] 可复制载体的选择和使用

[0605] 为了重组产生本发明的放射性同位素递送平台, 分离出编码它的核酸 (例如, cDNA 或基因组 DNA) 并将其插入可复制载体中以用于进一步克隆 (DNA 的扩增) 或用于表达。编码免疫缀合物的 DNA 可以容易地分离并且使用常规程序 (例如, 通过使用能够特异地结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针) 来测序。有许多载体可用。载体的选择部分取决于待使用的宿主细胞。一般而言, 合适的宿主细胞是原核或真核 (通常是哺乳动物) 来源的。

[0606] 载体可以是例如质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多个程序将适当的核酸序列插入载体中。一般而言, 使用本领域已知的技术将 DNA 插入适当的限制性内切核酸酶位点。载体组分通常包括但不限于信号序列、复制起点、一个或多个标志物基因、增强子元件、启动子和转录终止序列中的一种或多种。含有这些组分中的一种或多种的合适载体的构建采用技术人员已知的标准连接技术。

[0607] 本发明的免疫缀合物不仅可以直接重组产生, 而且可以呈与异源多肽的融合多肽而产生, 所述异源多肽可以是信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N 末端处具有特定裂解位点的其他多肽。一般而言, 信号序列可以是载体的组分, 或者它可以是插入载体中的编码本发明的免疫缀合物的 DNA 的一部分。信号序列可以是选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定的肠毒素 II 前导序列的原核信号序列。对于酵母分泌, 信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列 (包括酵母属和克鲁维酵母菌属 α - 因子前导序列, 后者描述于美国专利号 5,010,182 中) 或酸性磷酸酶前导序列、白假丝酵母菌 (*C. albicans*) 葡糖淀粉酶前导序列 (1990 年 4 月 4 日公布的 EP 362,179) 或 1990 年 11 月 15 日公布的 WO 90/13646 中描述的信号。在哺乳动物细胞表达中, 哺乳动物信号序列可以用于指导蛋白质的分泌, 诸如来自

相同或相关物种的分泌多肽的信号序列以及病毒分泌前导序列。

[0608] 培养产生放射性同位素递送平台的宿主细胞

[0609] 用于产生本发明的免疫缀合物的宿主细胞可以在多种培养基和培养条件中培养。

[0610] 原核宿主细胞培养物

[0611] 用于产生本发明的多肽的原核细胞在本领域已知且适于培养所选宿主细胞的培养基中生长。合适的培养基的例子包括Luria肉汤 (LB) 加必要的营养补充剂。在一些实施方案中,培养基还含有基于表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞生长。例如,将氨苄青霉素添加到培养基中以用于表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的生长。

[0612] 除碳、氮和无机磷酸盐来源之外,还可以以适当的浓度包含任何必要的补充剂,其单独引入或呈与另一补充剂或培养基 (诸如复合氮源) 的混合物引入。任选地,培养基可以含有一种或多种选自以下组成的组的还原剂: 谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、硫代乙醇酸盐、二硫代赤藓糖醇和二硫代苏糖醇。

[0613] 原核宿主细胞在合适的温度下培养。例如,对于大肠杆菌生长,优选的温度的范围为约20°C至约39°C,更优选地为约25°C至约37°C,甚至更优选地为约30°C。培养基的pH可以是范围为约5至约9的任何pH,主要取决于宿主生物体。对于大肠杆菌,pH优选为约6.8至约7.4,更优选地为约7.0。

[0614] 如果在本发明的表达载体中使用诱导型启动子,则在适于启动子的激活的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面中,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,将转化的宿主细胞在磷酸盐限制培养基中培养以进行诱导。在一些实施方案中,磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基 (参见例如,Simmons等人,J. Immunol. Methods (2002), 263:133-47)。根据采用的载体构建体,可以使用多种其他诱导剂,如本领域已知的。

[0615] 在一个实施方案中,本发明的表达的多肽被分泌到宿主细胞的周质中,并且从周质回收它们。蛋白质回收通常涉及破坏微生物,通常通过诸如渗透休克、超声处理或裂解的手段。一旦细胞被破坏,可以通过离心或过滤去除细胞碎片或整个细胞。可以例如通过亲和树脂色谱法进一步纯化蛋白质。可替代地,可以将蛋白质转运至培养基中并在其中分离。可以从培养物中去除细胞,并且将培养上清液过滤和浓缩,以便进一步纯化产生的蛋白质。可以使用通常已知的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和蛋白质印迹测定来进一步分离和鉴定表达的多肽。

[0616] 在本发明的一个方面中,通过发酵方法大量进行免疫缀合物生产。不同的大规模分批补料发酵程序可用于重组蛋白的生产。大规模发酵具有至少1000升的容量,优选地约1,000至100,000升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧气和营养物,尤其是葡萄糖 (一种优选的碳源/能源)。小规模发酵通常是指在容积容量不超过大约100升,并且范围可以为约1升至约100升的发酵罐中的发酵。

[0617] 在发酵工艺中,通常在细胞已经在合适的条件下生长至所期望密度 (例如,约180-220的OD₅₅₀) (在所述阶段细胞处于早期的稳定期) 之后启动对蛋白质表达的诱导。根据采用的载体构建体,可以使用多种诱导剂,如本领域已知的以及上文所述的。在诱导前可以使细胞生长较短的时段。通常诱导细胞约12-50个小时,但是可以使用更长或更短的诱导时间。

[0618] 为了提高本发明的多肽的产量和质量,可以修改各种发酵条件。例如,为了改善所分泌的免疫缀合物多肽的正确组装和折叠,可以使用另外的过表达伴侣蛋白(诸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和/或DsbG)或FkpA(具有伴侣蛋白活性的肽基脯氨酰顺,反异构酶))的载体来共转化宿主原核细胞。已经证明,伴侣蛋白有利于在细菌宿主细胞中产生的异源蛋白质的正确折叠和溶解性。Chen等人,(1999) J Bio Chem 274:19601-5;美国专利号6,083,715;美国专利号6,027,888;Bothmann和Pluckthun(2000) J. Biol. Chem. 275:17100-5;Ramm和Pluckthun(2000) J. Biol. Chem. 275:17106-13;Arie等人,(2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

[0619] 为了使表达的异源蛋白质(特别是对蛋白水解敏感的那些)的蛋白水解最小化,某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株可以用于本发明。例如,可以对宿主细胞菌株进行修饰以在编码已知细菌蛋白酶诸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其组合的基因中实现一个或多个基因突变。一些大肠杆菌蛋白酶缺陷菌株可供使用并且描述于例如Joly等人,(1998),同前;美国专利号5,264,365;美国专利号5,508,192;Hara等人, Microbial Drug Resistance, 2:63-72(1996)。

[0620] 在一个实施方案中,缺乏蛋白水解酶并且用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株被用作本发明的表达系统中的宿主细胞。

[0621] 真核宿主细胞培养物

[0622] 可商购获得的培养基,诸如Ham's F10(Sigma)、最小必需培养基(MEM,Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM,Sigma)适于培养宿主细胞。此外,可以使用Ham等人,Meth. Enz. 58:44(1979);Barnes等人,Anal. Biochem. 102:255(1980);美国专利号4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655或5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利号30,985中所述的任一培养基作为宿主细胞的培养基。这些培养基中的任一种都可以根据需要补充有激素和/或其他生长因子(诸如,胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如,氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(诸如,HEPES)、核苷酸(诸如,腺苷和胸苷)、抗生素(诸如,GENTAMYCINTM药物)、痕量元素(定义为通常以在微摩尔范围内的最终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等效的能量源。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其他必要的补充剂。培养条件,诸如温度、pH等,是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些,并且对于普通技术人员来说是显而易见的。

[0623] 本发明的免疫球蛋白衍生结构的纯化

[0624] 本发明的免疫缀合物的形式可以从培养基或从宿主细胞裂解液中回收。如果是膜结合的,则可以使用合适的洗涤剂溶液(例如,Triton-X 100)或通过酶裂解将其从膜上脱离。用于表达本发明的免疫缀合物的细胞可以通过各种物理或化学手段来破坏,例如冻-融循环、超声处理、机械破坏或细胞裂解剂。

[0625] 可能需要从重组细胞蛋白或多肽中纯化本发明的免疫缀合物。以下程序是合适的纯化程序的示例:通过在离子交换柱上分级;乙醇沉淀;反相HPLC;在二氧化硅或阳离子交换树脂诸如DEAE上进行的色谱法;色谱聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如Sephadex G-75进行凝胶过滤;蛋白A琼脂糖凝胶柱,以去除诸如IgG的污染物;和金属螯合柱,以结合表位标记形式的本发明的免疫缀合物。可以采用各种蛋白质纯化方法,并且此类方法是本领域

域已知的并且描述于例如Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982) 中。所选择的纯化步骤将取决于例如所使用的生产方法的性质和所生产的本发明的特定免疫缀合物。

[0626] 当使用重组技术时,免疫缀合物可以在细胞内、在周质空间中产生,或直接分泌到培养基中。如果免疫缀合物在细胞内产生,则作为第一步,例如通过离心或超滤去除颗粒碎片,宿主细胞或裂解的片段。Carter等人, Bio/Technology 10:163-7 (1992) 描述了用于分离分泌至大肠杆菌的周质空间的抗体的程序。简言之,在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA和苯甲磺酰氟 (PMSF) 的存在下将细胞糊解冻,经约30min。细胞碎片可以通过离心去除。当免疫缀合物被分泌到培养基中时,通常首先使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元浓缩来自此类表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂 (诸如PMSF) 可以被包括在前述步骤中的任一个中以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0627] 由细胞制备的免疫缀合物组合物可以使用例如羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、渗析和亲和色谱法来纯化,其中亲和色谱法是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适用性取决于免疫缀合物中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可以用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体 (Lindmark等人, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。建议将蛋白G用于所有小鼠同种型和人 γ 3 (Guss等人, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。亲和配体所附接的基质通常是琼脂糖,但也可以使用其他基质。与使用琼脂糖所实现的情况相比,机械稳定的基质 (诸如可控孔玻璃或聚 (苯乙烯二乙烯基) 苯) 可以实现更快的流速和更短的处理时间。当免疫缀合物包含CH3结构域时, Bakerbond ABX™树脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) 可用于纯化。还可以根据待回收的免疫缀合物使用其他蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱分级、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅色谱法、肝素SEPHAROSE™色谱法、阴离子或阳离子交换树脂 (诸如聚天冬氨酸柱) 色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0628] 在任何初步纯化步骤之后,可以使用pH在约2.5-4.5之间且通常在低盐浓度 (例如,约0-0.25M盐) 的洗脱缓冲液对包含感兴趣的免疫缀合物和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用色谱法。

[0629] 免疫缀合物 (包括抗体药物缀合物 (ADC))

[0630] 在本发明的另一方面中,根据上述实施方案中任一个或本文所述的本发明的免疫缀合物缀合至异源部分或剂,诸如例如,如下文所述并且包括如本文所述的任何另外的外源材料的那些。

[0631] 在一个实施方案中,本发明提供包含与一种或多种治疗剂或放射性同位素缀合的本发明的抗体构建体的免疫缀合物。

[0632] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文所述的抗体构建体。如本文所述,多种放射性同位素可用于生产本发明的放射性缀合物。

[0633] 免疫缀合物或抗体构建体的缀合物可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备,诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷 (iminothiolane) (IT)、酰亚胺酯的双功能

衍生物(诸如己二亚胺二甲酯H)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳14-标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合至抗体的例示性螯合剂(参见例如,WO 1994/11026)。接头可以是“可裂解的接头”,其促进细胞毒性药物在细胞中的释放。例如,可以使用酸不稳定性接头、蛋白酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫键的接头(参见例如,Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);US 5,208,020)。

[0634] 本文的免疫缀合物或ADC明确地考虑但不限于用交联剂制备的此类缀合物,包括但不限于,BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB以及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砵)苯甲酸酯),它们是可商购获得的(例如,可获自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.)。

[0635] 如本领域普通技术人员所认识到的,上文的某些方法也可用于制备放射性免疫缀合物和靶向成像复合物(但是文本仅提及免疫缀合物或抗体构建体),并且此类制备方法也涵盖在本发明内。

[0636] 使用螯合因子和/或接头的免疫缀合

[0637] 用于将放射性同位素附接至免疫缀合物或抗体构建体的方法(即,用放射性同位素“标记”抗体)是技术人员熟知的。这些方法中的某些方法描述于例如WO 2017/155937中。

[0638] 双功能螯合因子诸如例如DOTA、DTPA和相关类似物适于配位金属离子,如 α 和 β 发射放射性核素。例如,这些螯合分子可以通过在抗体构建体上的胺(例如,赖氨酸残基的官能团)与DOTA/DTPA上的羧酸酯之间形成新的酰胺键来连接至靶向分子。在肽合成的情况下,接头添加的表征和纯化可以是用于放射性同位素缀合的抗体平台或免疫缀合物的总体合成的一部分。

[0639] 对于一些实施方案,产生免疫缀合物的方法涉及Poty, S等人,Chem Commun. (Camb) 54:2599(2018)描述的点击化学(click chemistry)步骤。

[0640] 对于一些实施方案,肽可以是生物合成的,或者可以通过化学氨基酸合成,使用合适的氨基酸前体(涉及例如用氟19代替氢)来合成。在一些实施方案中,放射性标记可以掺入肽中。在一些实施方案中,放射性标记可以连接至肽。可以使用IODOGEN方法(Fraker等人,(1978) Biochem Biophys Res Commun. 80:49-57)掺入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal, CRC Press 1989)详细描述了其他方法。

[0641] 本发明的免疫缀合物的表征

[0642] 本发明的免疫缀合物可以通过本领域已知的各种测定来鉴定、筛选或表征其物理/化学性质和/或生物活性。本发明的免疫缀合物和抗体构建体可以通过本领域已知的各种测定来表征其物理/化学性质和/或生物活性。本发明的免疫缀合物可以通过一系列测定来表征,包括但不限于多肽序列确定、氨基酸分析、非变性尺寸排阻高压液相色谱法(HPLC)、质谱法、离子交换色谱法和木瓜蛋白酶消化。

[0643] 抗原结合

[0644] 可以通过本领域已知的方法例如ELISA、蛋白质印迹等来测试本发明的免疫缀合物的抗原结合活性。抗体的结合亲和力可以例如通过Munson等人, Anal Biochem. 107:220 (1980) 中描述的Scatchard分析来确定。此外, 本发明的免疫缀合物的抗原结合能力可以使用本领域已知的方法来定量, 例如, 定量ELISA、定量蛋白质印迹、表面等离振子共振测定和/或Scatchard分析。

[0645] 在一个实施方案中, 使用以免疫缀合物进行的放射性标记抗原ELISA测量免疫缀合物的 K_D 。根据另一个实施方案, K_D 通过使用表面等离振子共振测定, 使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000仪器(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.), 例如使用在25°C和10个应答单元下固定的抗原CM5芯片来测量。

[0646] 在另一方面, 可以使用结合竞争测定鉴定竞争结合相同抗原或其表位的免疫缀合物。在一些实施方案中, 此类竞争性抗体结合本发明的免疫缀合物的相同表位(例如, 线性或构象表位)(参见例如, Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY))。

[0647] 可以使用技术人员已知的方法来鉴定或标测本发明的免疫缀合物所结合的抗原内的表位和/或接触残基。用于标测抗体结合的表位的详细示例性方法提供于Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," Methods in Molecular Biology (第3版, Humana Press, Totowa, NJ) 中。

[0648] 本发明的药物组合物和制剂

[0649] 如本领域普通技术人员将认识到的, 本文下文中的某些教导适用于本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物, 但是具体文本提及一种类型的发明, 并且此类应用整体涵盖在本发明内。

[0650] 在另一方面, 本发明提供一种组合物, 其包含本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物。本发明还提供药物组合物和制剂, 其包含至少一种本发明的免疫缀合物和至少一种药学上可接受的赋形剂或载剂。在一些实施方案中, 药物制剂包含(1) 本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物和(2) 药学上可接受的载剂。

[0651] 免疫缀合物或放射性免疫缀合物被配制为用于递送至靶细胞/组织的任何合适的形式。本发明的免疫缀合物的药物制剂通过将具有所需纯度的此类免疫缀合物与一种或多种任选的药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A编著. (1980)) 混合, 以冻干制剂或水溶液的形式来制备。药学上可接受的载剂、稀释剂和赋形在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒, 并且包括但不限于: 无菌水; 缓冲液, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵; 六甲氯铵; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 苯酚、丁醇或苯甲醇; 烷基对羟基苯甲酸酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(少于约10个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇; 成盐抗衡离子, 如钠; 金属络合物(例如, 锌-蛋白质络合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如聚乙二醇(PEG)。

[0652] 待用于体内施用的药物制剂通常是无菌的。这易于通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0653] 冻干抗体制剂的例子描述于US 6,267,958中。水性抗体制剂包括US 6,171,586和WO 2006/044908中描述的那些,后者的制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0654] 本文的药理学上可接受的载体还包括间质药物分散剂,诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20 (HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。在一个方面,sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0655] 本文的制剂还可以根据需要含有多于一种针对所治疗的特定适应症的活性成分,优选地具有彼此不会不利影响的互补活性的那些。此类活性成分以有效用于既定目的量以合适的方式组合存在。

[0656] 活性成分也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微胶囊中,例如分别在胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A编著.(1980)中。

[0657] 在一些实施方案中,免疫缀合物可以被配制为免疫脂质体。“脂质体”是由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的小囊泡,其可用于将药物递送至哺乳动物。脂质体的组分通常以双层形式排列,类似于生物膜的脂质排列。含有免疫缀合物的脂质体由本领域已知的方法制备,诸如以下中所述的方法:Epstein等人,Proc Natl Acad Sci USA 82:3688(1985);Hwang等人,Proc Natl Acad Sci USA 77:4030(1980);美国专利号4,485,045和4,544,545;以及1997年10月23日公布的W01997/38731。特别合适的脂质体可通过使用包含卵磷脂、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物的反相蒸发法产生。将脂质体通过具有定义孔径的过滤器挤出以产生具有所需直径的脂质体。化疗剂任选地包含在脂质体内(参见Gabizon等人,J.National Cancer Inst.81:1484(1989))。循环时间增加的脂质体公开于美国专利号5,013,556中。

[0658] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成型制品的形式,例如膜或微胶囊。

[0659] 使用免疫缀合物和放射性免疫缀合物及其组合物的方法

[0660] 在一个方面,本发明提供一种治疗有需要的患者的疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向有需要的对象施用药学上有效量的本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物。对于一些另外的实施方案,所述方法用于抑制癌细胞或肿瘤生长和/或杀伤癌细胞或肿瘤。在另一方面,本发明提供本文所述的免疫缀合物在制备和/或制造用于治疗对象的疾病、病症或病状(诸如例如癌症)的药物中的用途。

[0661] 本发明的药物组合物可以以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的量和频率将由诸如患者的病状以及患者疾病的类型和严重性的因素确定,但是适当的剂量可以通过临床试验来确定。

[0662] 在一个实施方案中,本发明的免疫缀合物、或放射性免疫缀合物、或组合物可以在用于结合罹患与靶抗原表达和/或活性增加相关联的病症的个体的靶抗原的方法中使用,所述方法包括向个体施用免疫缀合物、或放射性免疫缀合物、或组合物,使得个体中的靶抗原被结合。在一个实施方案中,靶抗原是人靶抗原,并且个体是人类个体。本发明的免疫缀

合物或放射性免疫缀合物或组合物可以出于治疗目的施用于人。此外,本发明的免疫缀合物、或放射性免疫缀合物、或组合物可以施用于表达免疫缀合物或放射性免疫缀合物与其交叉反应的靶抗原的非人哺乳动物(例如,灵长类动物、猪、大鼠或小鼠),以实现兽医目的或作为人类疾病的动物模型。关于后者,此类动物模型可以用于评价本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物的治疗功效(例如,测试施用的剂量和时程)。

[0663] 本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物(以及任何另外的治疗剂或佐剂)可以通过任何合适的手段施用,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,以及在需要局部治疗的情况下,病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。此外,抗体适合通过脉冲输注施用,特别是在抗体剂量递减的情况下。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,其部分取决于施用是短暂的还是长期的。

[0664] 本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物将以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在本文中要考虑的因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、剂的递送部位、施用方法、施用时间安排以及执业医师已知的其他因素。本发明的免疫缀合物根据已知的方法施用于人类患者,诸如静脉内施用,例如呈推注或通过在规定时间内连续输注、通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、经口、局部或吸入途径。对于一些实施方案,静脉内或皮下施用本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物是优选的。

[0665] 为了预防或治疗疾病,施用的剂量和方式将由医师根据已知的标准来选择。本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物的适当剂量将取决于待治疗的疾病类型(如上文所定义)、疾病的严重性和病程、施用本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物是用于预防目的还是治疗目的、既往治疗、患者的临床病史和对免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物的应答以及主治医师的判断。本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物适合一次或在一系列治疗中施用于患者。优选地,免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物通过静脉内输注或通过皮下注射施用。根据疾病的类型和严重性,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重(例如,约 $0.1\text{--}15\text{mg}/\text{kg}$ /剂量)的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物可以是向患者施用的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次单独施用,还是通过连续输注。给药方案可以包括施用约 $4\text{mg}/\text{kg}$ 的本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物的初始负荷剂量,随后每周施用约 $2\text{mg}/\text{kg}$ 的本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物的维持剂量。然而,其他剂量方案可能是有用的。典型的每日剂量的范围可能为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多,其取决于上文提及的因素。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病状,持续所述治疗,直至出现所需疾病症状的抑制。这种疗法的进展可以容易地通过常规方法和测定并且基于医师或本领域其他技术人员已知的标准来监测。

[0666] 可以基于对象的疾病水平或耐受性来选择和调整剂量和施用计划表,这可以在治疗过程中进行监测。本发明的缀合物可以每天一次、每周一次、每周多次但少于每天一次、每月多次但少于每天一次、每月多次但少于每周一次、每月一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次或间歇地施用以缓解或减轻疾病的症状。可以以任何所公开的间隔继续施用,直到肿瘤或所治疗的癌症的症状缓解。在通过继续施用延长缓解或减轻的情况下,可以在实现症状的缓解或减轻之后继续施用。

[0667] 对于一些实施方案,有效量的免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物可以呈单剂量提供。

[0668] 本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物可以与常规和/或新颖的治疗或疗法组合使用或单独呈单一疗法使用。在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物可以与一种或多种放射增敏剂一起使用。此类剂包括可以增加癌细胞对放射疗法的敏感性的任何剂。在其他实施方案中,本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物可以与可以增强放射疗法的生物效应的新颖和/或常规的剂组合使用。肿瘤的照射可以引起多种生物学后果,其可以通过将本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物与靶向相关途径的剂组合来利用。在一些实施方案中,此类剂可以减少肿瘤血管生成,或抑制局部侵袭和转移,或防止再增殖,或增强免疫应答,或解除对细胞能量的调控,或减少群体,或改变肿瘤代谢,或增加肿瘤损伤,或减少DNA修复。在某些实施方案中,与本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物组合使用的剂可以包括:DDR抑制剂,例如,PARP、ATR、Chk1或DNA-PK;或存活信号传导抑制剂,例如,mTOR、PI3k、NF- κ B;或抗缺氧剂,例如,HIF-1- α 、CAP或UPR;或代谢抑制剂,例如,MCT1、MCT4抑制剂;或免疫治疗剂,例如,抗CTLA4、抗PD-1;或生长因子信号转导抑制剂,例如,EGFR或MAPK抑制剂;或抗侵袭剂,例如,激酶抑制剂、趋化因子抑制剂或整合素抑制剂;或抗血管生成剂,例如,VEGF抑制剂。

[0669] 本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物可以 (i) 抑制它们所结合的细胞的生长或增殖; (ii) 诱导它们所结合的细胞死亡; (iii) 抑制它们所结合的细胞的分层; (iv) 抑制它们所结合的细胞的转移;或 (v) 抑制包含它们所结合的细胞的肿瘤的血管形成。在此上下文中,“抑制细胞生长或增殖”意指将细胞的生长或增殖降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%,并且包括诱导细胞死亡。

[0670] 以举例的方式,抑制肿瘤细胞生长的免疫缀合物是导致肿瘤细胞(例如,癌细胞)的可测量的生长抑制的免疫缀合物。在一个实施方案中,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物能够抑制展示免疫缀合物或放射性免疫缀合物所结合的抗原的癌细胞的生长。与适当的对照相比,优选的生长抑制性免疫缀合物或放射性免疫缀合物抑制表达抗原的肿瘤细胞的生长大于20%,优选地约20%至约50%,并且甚至更优选地大于50%(例如,约50%至约100%),所述对照通常是未用所测试的免疫缀合物或放射性免疫缀合物处理的肿瘤细胞。

[0671] 对于一些实施方案,施用于对象的大部分免疫缀合物或放射性免疫缀合物或组合物通常由未标记的免疫缀合物组成,少数由标记的放射性免疫缀合物组成。标记的放射性免疫缀合物与未标记的免疫缀合物的比率可以使用已知的方法进行调整。因此,根据本发明的某些方面,可以提供免疫缀合物/放射性免疫缀合物,其总蛋白质量高达100mg,诸如小于60mg、或5mg至45mg,或其总蛋白质量介于0.1 μ g/kg至1mg/kg患者体重之间,诸如1 μ g/kg至1mg/kg患者体重、或10 μ g/kg至1mg/kg患者体重、或100 μ g/kg至1mg/kg患者体重、或0.1 μ g/kg至100 μ g/kg患者体重、或0.1 μ g/kg至50 μ g/kg患者体重、或0.1 μ g/kg至10 μ g/kg患者体重、或0.1 μ g/kg至40 μ g/kg患者体重、或1 μ g/kg至40 μ g/kg患者体重、或0.1mg/kg至1.0mg/kg患者体重,诸如0.2mg/kg患者体重至0.6mg/kg患者体重。

[0672] 在某些实施方案中,可以施用约0.5mg/kg至约30mg/kg的免疫缀合物/放射性免疫缀合物。在某些实施方案中,可以施用约0.5mg/kg至约1mg/kg、约0.5mg/kg至约2mg/kg、约

0.5mg/kg至约5mg/kg、约0.5mg/kg至约10mg/kg、约0.5mg/kg至约3mg/kg、约0.5mg/kg至约4mg/kg、约0.5mg/kg至约5mg/kg、约0.5mg/kg至约10mg/kg、约0.5mg/kg至约20mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约1mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约3mg/kg、约1mg/kg至约4mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约30mg/kg、约2mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约3mg/kg、约2mg/kg至约4mg/kg、约2mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约10mg/kg、约2mg/kg至约20mg/kg、约2mg/kg至约30mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约3mg/kg、约5mg/kg至约4mg/kg、约5mg/kg至约5mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约20mg/kg、约5mg/kg至约30mg/kg、约10mg/kg至约3mg/kg、约10mg/kg至约4mg/kg、约10mg/kg至约5mg/kg、约10mg/kg至约10mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约10mg/kg至约30mg/kg、约3mg/kg至约4mg/kg、约3mg/kg至约5mg/kg、约3mg/kg至约10mg/kg、约3mg/kg至约20mg/kg、约3mg/kg至约30mg/kg、约4mg/kg至约5mg/kg、约4mg/kg至约10mg/kg、约4mg/kg至约20mg/kg、约4mg/kg至约30mg/kg、约5mg/kg至约10mg/kg、约5mg/kg至约20mg/kg、约5mg/kg至约30mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约10mg/kg至约30mg/kg或约20mg/kg至约30mg/kg的免疫缀合物/放射性免疫缀合物。在某些实施方案中,可以施用约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约20mg/kg或约30mg/kg的免疫缀合物/放射性免疫缀合物。在某些实施方案中,可以施用至少约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg或约20mg/kg的免疫缀合物/放射性免疫缀合物。在某些实施方案中,可以施用至多约1mg/kg、约2mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约20mg/kg或约30mg/kg的免疫缀合物/放射性免疫缀合物。

[0673] 在一些实施方案中,所述方法包括施用有效量的放射性免疫缀合物,其包含0.01至0.1mCi、或0.1mCi至1.0mCi、或1.0mCi至2.0mCi、或2.0mCi至4.0mCi的²²⁵Ac。

[0674] 在一些实施方案中,所述方法包括施用有效量的放射性免疫缀合物,其包含0.1μCi/kg至2.0μCi/kg对象体重、或0.1μCi/kg至1.0μCi/kg对象体重、或1.0μCi/kg至3.0μCi/kg对象体重、或3.0μCi/kg至10.0μCi/kg对象体重、或10.0μCi/kg至20.0μCi/kg对象体重、或10.0μCi/kg至30.0μCi/kg对象体重的²²⁵Ac。

[0675] 在某些实施方案中,²²⁵Ac的有效量为约0.1微居里至约20微居里。在某些实施方案中,²²⁵Ac的有效量为约0.1微居里至约0.2微居里、约0.1微居里至约0.5微居里、约0.1微居里至约1微居里、约0.1微居里至约2微居里、约0.1微居里至约3微居里、约0.1微居里至约4微居里、约0.1微居里至约5微居里、约0.1微居里至约10微居里、约0.1微居里至约20微居里、约0.2微居里至约0.5微居里、约0.2微居里至约1微居里、约0.2微居里至约2微居里、约0.2微居里至约3微居里、约0.2微居里至约4微居里、约0.2微居里至约5微居里、约0.2微居里至约10微居里、约0.2微居里至约20微居里、约0.5微居里至约1微居里、约0.5微居里至约2微居里、约0.5微居里至约3微居里、约0.5微居里至约4微居里、约0.5微居里至约5微居里、约0.5微居里至约10微居里、约0.5微居里至约20微居里、约1微居里至约2微居里、约1微居里至约3微居里、约1微居里至约4微居里、约1微居里至约5微居里、约1微居里至约10微居里、约1微居里至约20微居里、约2微居里至约3微居里、约2微居里至约4微居里、约2微居里至约5微居里、约2微居里至约10微居里、约2微居里至约20微居里、约3微居里至约4微居里、

约3微居里至约5微居里、约3微居里至约10微居里、约3微居里至约20微居里、约4微居里至约5微居里、约4微居里至约10微居里、约4微居里至约20微居里、约5微居里至约10微居里、约5微居里至约20微居里或约10微居里至约20微居里。在某些实施方案中,²²⁵Ac的有效量为约0.1微居里、约0.2微居里、约0.5微居里、约1微居里、约2微居里、约3微居里、约4微居里、约5微居里、约10微居里或约20微居里。在某些实施方案中,²²⁵Ac的有效量为至少约0.1微居里、约0.2微居里、约0.5微居里、约1微居里、约2微居里、约3微居里、约4微居里、约5微居里或约10微居里。在某些实施方案中,²²⁵Ac的有效量为至多约0.2微居里、约0.5微居里、约1微居里、约2微居里、约3微居里、约4微居里、约5微居里、约10微居里或约20微居里。根据放射性免疫缀合物的放射性同位素是¹¹¹In的方面,有效量低于例如15.0mCi (即,施用于对象的¹¹¹In的量递送低于15.0mCi的全身放射剂量)。

[0676] 根据放射性免疫缀合物的放射性同位素为¹¹¹In的方面,有效量低于15.0mCi、低于14.0mCi、低于13.0mCi、低于12.0mCi、低于11.0mCi、低于10.0mCi、低于9.0mCi、低于8.0mCi、低于7.0mCi、低于6.0mCi、低于5.0mCi、低于4.0mCi、低于3.5mCi、低于3.0mCi、低于2.5mCi、低于2.0mCi、低于1.5mCi、低于1.0mCi、低于0.5mCi、低于0.4mCi、低于0.3mCi、低于0.2mCi或低于0.1mCi。

[0677] 根据放射性免疫缀合物的放射性同位素为¹¹¹In的方面,有效量为0.1mCi至1.0mCi、0.1mCi至2.0mCi、1.0mCi至2.0mCi、1.0mCi至3.0mCi、1.0mCi至4.0mCi、1.0mCi至5.0mCi、1.0mCi至10.0mCi、1.0mCi至15.0mCi、1.0mCi至20.0mCi、2.0mCi至3.0mCi、3.0mCi至4.0mCi、4.0mCi至5.0mCi、5.0mCi至10.0mCi、5.0mCi至15.0mCi、5.0mCi至20.0mCi、6.0mCi至14.0mCi、7.0mCi至13.0mCi、8.0mCi至12.0mCi、9.0mCi至11.0mCi或10.0mCi至15.0mCi。

[0678] 根据放射性免疫缀合物的放射性同位素为¹¹¹In的方面,有效量为15.0mCi、14.0mCi、13.0mCi、12.0mCi、11.0mCi、10.0mCi、9.0mCi、8.0mCi、7.0mCi、6.0mCi、5.0mCi、4.0mCi、3.5mCi、3.0mCi、2.5mCi、2.0mCi、1.5mCi、1.0mCi、0.5mCi、0.4mCi、0.3mCi、0.2mCi或0.1mCi。

[0679] 根据放射性免疫缀合物的放射性同位素是²²⁵Ac的方面,有效量低于例如30.0μCi/kg (即,其中施用于对象的²²⁵Ac的量递送低于30.0μCi/kg对象体重的放射剂量)。

[0680] 根据放射性免疫缀合物的放射性同位素是²²⁵Ac的方面,有效量低于30μCi/kg、25μCi/kg、20μCi/kg、17.5μCi/kg、15.0μCi/kg、12.5μCi/kg、10.0μCi/kg、9μCi/kg、8μCi/kg、7μCi/kg、6μCi/kg、5μCi/kg、4.5μCi/kg、4.0μCi/kg、3.5μCi/kg、3.0μCi/kg、2.5μCi/kg、2.0μCi/kg、1.5μCi/kg、1.0μCi/kg、0.9μCi/kg、0.8μCi/kg、0.7μCi/kg、0.6μCi/kg、0.5μCi/kg、0.4μCi/kg、0.3μCi/kg、0.2μCi/kg、0.1μCi/kg或0.05μCi/kg。

[0681] 根据放射性免疫缀合物的放射性同位素是²²⁵Ac的方面,有效量为0.05μCi/kg至0.1μCi/kg、0.1μCi/kg至0.2μCi/kg、0.2μCi/kg至0.3μCi/kg、0.3μCi/kg至0.4μCi/kg、0.4μCi/kg至0.5μCi/kg、0.5μCi/kg至0.6μCi/kg、0.6μCi/kg至0.7μCi/kg、0.7μCi/kg至0.8μCi/kg、0.8μCi/kg至0.9μCi/kg、0.9μCi/kg至1.0μCi/kg、1.0μCi/kg至1.5μCi/kg、1.5μCi/kg至2.0μCi/kg、2.0μCi/kg至2.5μCi/kg、2.5μCi/kg至3.0μCi/kg、3.0μCi/kg至3.5μCi/kg、3.5μCi/kg至4.0μCi/kg、4.0μCi/kg至4.5μCi/kg或4.5μCi/kg至5.0μCi/kg。

[0682] 根据放射性免疫缀合物的放射性同位素是²²⁵Ac的方面,有效量是0.05μCi/kg、0.1

$\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.2\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.3\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.4\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.5\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.6\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.7\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.8\mu\text{Ci/kg}$ 、 $0.9\mu\text{Ci/kg}$ 、 $1.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $1.5\mu\text{Ci/kg}$ 、 $2.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $2.5\mu\text{Ci/kg}$ 、 $3.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $3.5\mu\text{Ci/kg}$ 、 $4.0\mu\text{Ci/kg}$ 、或 $4.5\mu\text{Ci/kg}$ 、 $5.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $6.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $7.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $8.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $9.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $10.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $12.5\mu\text{Ci/kg}$ 、 $15.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $17.5\mu\text{Ci/kg}$ 、 $20.0\mu\text{Ci/kg}$ 、 $25\mu\text{Ci/kg}$ 或 $30\mu\text{Ci/kg}$ 。

[0683] 在放射性免疫缀合物的放射性同位素是 ^{177}Lu 的某些实施方案中,有效量是每平方米体表面积 $0.1\mu\text{Ci}$ 至 100mCi 。

[0684] 在放射性免疫缀合物的放射性同位素是 ^{177}Lu 的某些实施方案中,有效量是每平方米体表面积 1mCi 至 100mCi 。在某些实施方案中,有效量为约 $1/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 。在某些实施方案中,有效量为约 $1/\text{平方米}$ 至约 $5/\text{平方米}$ 、约 $1/\text{平方米}$ 至约 $10/\text{平方米}$ 、约 $1/\text{平方米}$ 至约 $15/\text{平方米}$ 、约 $1/\text{平方米}$ 至约 $20/\text{平方米}$ 、约 $1/\text{平方米}$ 至约 $25/\text{平方米}$ 、约 $1/\text{平方米}$ 至约 $75/\text{平方米}$ 、约 $1/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 至约 $10/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 至约 $15/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 至约 $20/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 至约 $25/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 至约 $75/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 至约 $15/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 至约 $20/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 至约 $25/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 至约 $75/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 、约 $15/\text{平方米}$ 至约 $20/\text{平方米}$ 、约 $15/\text{平方米}$ 至约 $25/\text{平方米}$ 、约 $15/\text{平方米}$ 至约 $75/\text{平方米}$ 、约 $15/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 、约 $20/\text{平方米}$ 至约 $25/\text{平方米}$ 、约 $20/\text{平方米}$ 至约 $75/\text{平方米}$ 、约 $20/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 、约 $25/\text{平方米}$ 至约 $75/\text{平方米}$ 、约 $25/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 或约 $75/\text{平方米}$ 至约 $100/\text{平方米}$ 。在某些实施方案中,有效量为约 $1/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 、约 $15/\text{平方米}$ 、约 $20/\text{平方米}$ 、约 $25/\text{平方米}$ 、约 $75/\text{平方米}$ 或约 $100/\text{平方米}$ 。在某些实施方案中,有效量为至少约 $1/\text{平方米}$ 、约 $5/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 、约 $15/\text{平方米}$ 、约 $20/\text{平方米}$ 、约 $25/\text{平方米}$ 或约 $75/\text{平方米}$ 。在某些实施方案中,有效量为至多约 $5/\text{平方米}$ 、约 $10/\text{平方米}$ 、约 $15/\text{平方米}$ 、约 $20/\text{平方米}$ 、约 $25/\text{平方米}$ 、约 $75/\text{平方米}$ 或约 $100/\text{平方米}$ 。

[0685] 根据本发明的某些方面,本发明的放射性免疫缀合物的制剂或其组合物(例如,药物组合物)可以包含放射性标记的级分(放射性免疫缀合物)和未标记的级分(免疫缀合物),其中标记的级分:未标记的级分的比率可以为约 $1:1000$ 至 $1:1$ 。

[0686] 此外,药物组合物可以呈针对特定患者定制的单剂量组合物提供,即呈患者特异性治疗组合物提供,其中组合物中标记和未标记的免疫缀合物(标记的免疫缀合物,为了清楚起见,与本文的放射性免疫缀合物相同)的量可以至少取决于患者体重、身高、体表面积、年龄、性别和/或疾病状态或健康状态。因此,可以在小瓶中提供总体积的患者特异性治疗组合物,所述小瓶被配置为在一次治疗中全部施用于患者,使得施用之后小瓶中几乎没有组合物剩余。

[0687] 目前,根据癌症的阶段,癌症治疗涉及以下疗法中的一种或组合:去除癌性组织的手术、放射疗法和化学疗法。使用本发明的放射性免疫缀合物(可互换地,“放射性标记的免疫缀合物”)的疗法在无法良好地耐受化学疗法的毒性和副作用的老年患者中以及在放射疗法的有效性有限的转移性疾病中可能是特别理想的。对于一些实施方案,使用本发明的放射性标记的免疫缀合物的疗法可用于在疾病的初始诊断后或在复发期间减轻表达靶抗原的癌症。

[0688] 在一些实施方案中,确定癌症是否适合通过本文所公开的方法进行治疗涉及检测对象中或来自对象的样品中靶抗原的存在。为了确定癌症中的靶抗原表达,可以使用各种

检测测定。在一个实施方案中,通过免疫组织化学(IHC)分析靶抗原过表达。对来自肿瘤活检的石蜡包埋的组织切片进行IHC测定,并使其符合靶抗原染色强度标准。可替代地或另外地,可对福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织进行FISH测定,诸如**INFORM®**(由Ventana,AZ,U.S.A.出售)或**PATHVISION®**(Vysis,IL,U.S.A.),以确定肿瘤中靶抗原过表达的程度(如果有的话)。

[0689] 靶抗原过表达或扩增可以使用体内检测测定来评价,例如通过施用与待检测的分子结合并且用可检测标记(例如,放射性同位素或荧光标记)加标签的分子(诸如,本发明的抗体构建体或免疫缀合物),以及针对标记的位置对患者进行外部扫描。

[0690] 使用本发明的免疫缀合物和放射性免疫缀合物以便杀伤细胞

[0691] 本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物可以用于例如体外、离体和体内方法。在一个方面,本发明提供用于在体内或体外抑制细胞生长或增殖的方法,所述方法包括在允许免疫缀合物或放射性免疫缀合物与靶抗原结合的条件下将细胞暴露于本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物。本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物还可以(i)抑制它们所结合的细胞的生长或增殖;(ii)诱导它们所结合的细胞死亡;(iii)抑制它们所结合的细胞的分层;(iv)抑制它们所结合的细胞的转移;或(v)抑制包含它们所结合的细胞的肿瘤的血管形成。

[0692] 在一个方面,本发明提供一种杀伤表达抗原的细胞的方法,所述方法包括使细胞与本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物(或其组合物)接触。此方法可以用于例如杀伤、耗尽或消除来自混合细胞群的表达靶抗原的细胞。此方法可以用于例如杀伤、耗尽或消除来自混合细胞群的表达靶抗原的细胞,作为纯化其他细胞中的步骤。此方法可以在体外或体内进行,包括在原代患者细胞或组织组合物上离体进行,以制备此类组合物,以用于移植。

[0693] 在一个方面,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物用于治疗或预防细胞增殖性病症。在某些实施方案中,细胞增殖性病症包括实体瘤癌症。实体瘤癌症是包括异常组织块的癌症,例如癌和肉瘤。在某些其他实施方案中,细胞增殖性病症包括液体肿瘤癌症或血液学癌症,可互换使用,此类癌症存在于体液中,例如白血病和淋巴瘤。在某些实施方案中,细胞增殖性病症与靶抗原的表达和/或活性增加相关联。例如,在某些实施方案中,细胞增殖性病症与细胞表面上靶抗原的表达增加相关联。在某些实施方案中,细胞增殖性病症是肿瘤或癌症。在某些实施方案中,细胞增殖性病症包括实体瘤癌症。实体瘤癌症是包括异常组织块的癌症,例如癌和肉瘤。在某些其他实施方案中,细胞增殖性病症包括液体肿瘤癌症或血液学癌症,可互换使用,此类癌症存在于体液中,例如白血病和淋巴瘤。

[0694] 在一个方面,本发明提供用于治疗细胞增殖性病症的方法,所述方法包括向个体施用有效量的本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物。

[0695] 除直接细胞杀伤表达本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物所特异性结合的细胞表面抗原的靶细胞之外,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物任选地可以用于将另外的货物递送至靶细胞的附近或内部。另外的外源物质的递送可以用于例如细胞毒性、细胞抑制、信息收集和/或诊断功能。本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物的非细胞毒性变体,或任选地毒性变体,可以用于将货物递送至表达靶抗原的细胞的内部和/或标记其内部。货物的非限制性例子包括细胞毒性剂、检测促进剂和小分子化学治疗剂。

[0696] 使用本发明的抗体构建体、免疫缀合物、放射性免疫缀合物和靶向成像复合物以用于抗原检测、体内成像、诊断和预后

[0697] 如本文所述,在一些实施方案中,本发明的抗体构建体、免疫缀合物、放射性免疫缀合物和靶向成像复合物具有各种非治疗性应用。在一些实施方案中,本发明的组合物可以用于鉴定预测受益于特定治疗方法或方式(诸如例如,使用本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物的治疗)的患者群体。在一些实施方案中,本发明的组合物可以用于对表达靶抗原的癌症进行分期(例如,通过放射性成像)或用作疾病进展的预后指标。在一些实施方案中,组合物还可用于在体外检测和定量靶表位,例如在ELISA或蛋白质印迹中,以及从细胞或组织样品纯化或免疫沉淀出靶抗原。

[0698] 对于一些实施方案,本发明的免疫缀合物或放射性免疫缀合物用于检测抗原的存在或水平的方法中,诸如例如,在体外于生物样品中或在体内使用成像技术。免疫缀合物和放射性免疫缀合物检测可以经由技术人员已知的和如本文所述的不同技术来实现,例如IHC和PET成像。当本发明的免疫缀合物或放射性标记的免疫缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁扫描研究的放射性原子,例如 ^{99m}Tc 或 ^{111}In 。

[0699] 本发明的标记的免疫缀合物可通过诸如以下的生物医学和分子成像的各种方法和技术用作成像生物标志物和探针:(i)MRI(磁共振成像);(ii)MicroCT(计算机化断层摄影术);(iii)SPECT(单光子发射计算机化断层摄影术);(iv)PET(正电子发射断层摄影术),Chen等人,Bioconjugate Chem.15:41-9(2004);(v)生物发光;(vi)荧光;以及(vii)超声波。免疫闪烁扫描是一种成像程序,在其中将用放射性物质标记的抗体施用于动物或人类患者,并且对体内抗体所在的部位拍摄照片(US 6528624)。成像生物标志物可以作为正常生物过程、致病过程或对治疗干预的药理学应答的指标进行客观测量和评价。

[0700] 本发明的另一方面是一种确定怀疑含有靶抗原的样品中靶抗原的存在的方法,其中所述方法包括将样品暴露于与靶抗原结合的免疫缀合物,以及确定免疫缀合物与样品中的靶抗原的结合,其中此类结合的存在指示样品中靶抗原的存在。任选地,样品可以含有怀疑表达靶抗原的细胞(其可以是癌细胞)。所述方法中采用的免疫缀合物可以任选地被可检测地标记、附接至固体支持物等。

[0701] 本发明的另一实施方案涉及一种诊断对象中肿瘤的存在的方法,其中所述方法包括(a)使包含获自哺乳动物的组织细胞的测试样品与结合靶抗原的免疫缀合物接触,以及(b)检测测试样品中免疫缀合物与靶抗原之间复合物的形成,其中复合物的形成指示哺乳动物中肿瘤的存在。任选地,免疫缀合物被可检测地标记、附接至固体支持物等,并且/或者组织细胞的测试样品获自怀疑患有癌性肿瘤的个体。

[0702] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物,包括包含前述和/或本文所提供的免疫缀合物的组合物,可用于检测例如体内或生物样品中靶抗原的存在。本发明的免疫缀合物可以用于多种不同的测定,包括但不限于ELISA、基于珠粒的免疫测定和质谱。

[0703] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物可用于定量样品中的靶抗原量。在一些实施方案中,生物样品是生物流体,诸如全血或全血组分,包括红细胞、白细胞、血小板、血清和血浆、腹水、玻璃体液、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、羊水、奶、唾液、痰、泪液、汗液、粘液、脑脊液、尿液和可能含有感兴趣的靶抗原的身体其他成分。在各种实施方案中,样品是来自任何动物的身体样品。在一些实施方案中,样品来自哺乳动物。在一些实施方案中,样

品是人类对象。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的血清。在一些实施方案中,生物样品是活检材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的活检材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的血清。在一些实施方案中,生物样品是原代细胞培养材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的原代细胞培养材料。在一些实施方案中,生物样品来自临床患者或用结合相同靶抗原的一种或多种治疗性抗体治疗的患者。

[0704] 在一些实施方案中,样品来自哺乳动物。在一些实施方案中,样品来自人类对象,例如,当测量临床样品中的抗原表达时。在一些实施方案中,生物样品来自临床患者或用疗法/治疗剂(例如,靶向相同靶抗原的抗体疗法)治疗的患者。在一些实施方案中,生物样品是血清或血浆。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的血清。在一些实施方案中,生物样品是活检材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的活检材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的血清。在一些实施方案中,生物样品是原代细胞培养材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的原代细胞培养材料。

[0705] 在一些实施方案中,提供包含‘标记的’免疫缀合物的组合物。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(诸如,荧光标记、发色标记、电子密标记、化学发光标记和放射性标记),以及例如通过酶促反应或分子相互作用间接检测的部分,诸如酶或配体。示例性标记包括但不限于荧光团(诸如,稀土螯合物或荧光素及其衍生物)、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、荧光素酶(例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶)、虫荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、J3-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如,葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(诸如,尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、与采用过氧化氢来氧化染料前体的酶(诸如,HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶)的偶联物、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记、噬菌体标记、稳定自由基等。

[0706] 可使用常规方法将这些标记物共价结合至蛋白质或多肽。例如,偶联剂诸如二醛、碳二亚胺、二马来酰亚胺、双亚氨酸酯、双重氮化联苯胺等可用于与上文所述的荧光标记、化学发光标记和酶标记来对本发明的免疫缀合物或抗体构建体加标签(参见例如,US 3,645,090(酶);US 3,940,475(荧光测定);Hunter等人,Nature,144:945(1962);David等人,Biochemistry,13:1014-1021(1974);Pain等人,J.Immunol.Methods,40:219-230(1981);Nygren,J.Histochem and Cytochem,30:407-412(1982))。

[0707] 此类标记(包括酶)与免疫缀合物或抗体构建体的缀合对于免疫测定技术的普通技术人员来说是标准操作程序(参见例如,O’Sullivan等人,“Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay,” Methods in Enzymology,J.Langone和H.Van Vunakis编著,Vol.73(Academic Press,New York,New York,1981),pp.147-166)。也可以使用合适的可商购获得的标记抗体。

[0708] 在添加最后的标记免疫缀合物之后,通过以下确定结合的免疫缀合物的量:通过洗涤来去除过量的未结合的标记免疫缀合物,然后使用适合于标记的检测方法测量附接的标记的量,并且将测量的量与生物样品中感兴趣的免疫缀合物的量相关联。例如,在酶的情况下,显色和测量的颜色的量将是存在的感兴趣的免疫缀合物的量的直接测量结果。具体地,如果HRP是标记,则可以使用底物TMD,使用450nm读取波长和620或630nm参考波长来检测颜色。

[0709] 在一个例子中,在从固定相洗涤出针对未标记的免疫缀合物的酶标记的第二抗体

之后,通过将固定的捕获试剂与酶底物一起孵育来使颜色或化学发光显色并测量。然后通过与通过平行运行的感兴趣的免疫缀合物生成的颜色或化学发光进行比较来计算感兴趣的抗体的浓度。

[0710] 在一些实施方案中,所述方法涉及基于珠粒的免疫测定、ELISA测定或质谱技术。此类质谱仪的质量分析器包括但不限于四级杆(Q)分析器、飞行时间(TOF)分析器、离子阱分析器、扇形磁场分析器或傅里叶变换离子回旋共振(FT-ICR)分析器或其组合。质谱仪的离子源应主要产生样品分子离子或准分子离子以及某些可表征的片段离子。此类离子源的例子包括大气压电离源例如电喷雾电离(ESI)和大气压化学电离(APCI)以及基质辅助激光解吸电离(MALDI)。ESI和MALDI是电离蛋白质以用于小分子的质谱分析(诸如例如,通过液相色谱质谱法(LC/MS))的两种最常采用的方法(Lee,M.,LC/MS Applications in Drug Development (2002) J.Wiley&Sons,New York)。另一例子是表面增强激光解吸电离(SELDI)。SELDI是一种基于表面的电离技术,其实现高通量质谱。通常,SELDI用于分析蛋白质和其他生物分子的复杂混合物。SELDI采用化学反应表面(诸如“蛋白质芯片”)与溶液中的分析物(例如,蛋白质)相互作用。此类表面选择性地与分析物相互作用并将它们固定在其上。因此,本发明的分析物可以在芯片上部分纯化,然后在质谱仪中快速分析。通过在基底表面上的不同位点提供多个反应性部分,可以增加通量。

[0711] 在另一方面,本发明提供一种用于检测生物样品中的抗原的方法,所述方法包括:(a)使生物样品与本文所述的免疫缀合物接触以允许形成免疫复合物;(b)检测或测量与样品结合的免疫缀合物的水平。在一些实施方案中,免疫缀合物被固定至固体支持物。在一些实施方案中,固定化免疫缀合物缀合至生物素,并且结合至链霉亲和素包被的微量滴定板。

[0712] 本发明的试剂盒和制品

[0713] 本发明的另一方面是一种制品,其含有用于治疗、预防和/或诊断特征为表达靶抗原的细胞(例如,癌细胞)的疾病和病症的材料。本发明的制品包含容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料形成,诸如玻璃或塑料。容器容纳有效治疗、预防和/或诊断癌症病状的组合物,并且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的免疫缀合物。标签或包装插页指示所述组合物用于治疗癌症。标签或包装插页将还包括向癌症患者施用免疫缀合物组合物的说明。可替代地或另外地,制品还可以包含有包含药理学上可接受的缓冲液(诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液)的第二容器。制品还可以包含从商业和使用者的角度来看所希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0714] 在另一方面,本发明提供一种试剂盒,其包括本文所述的任何免疫缀合物和另外的试剂或药物装置。在一些另外的实施方案中,试剂盒包括本文所提供的组合物(例如,药物组合物或诊断组合物)。本发明的另一方面是一种试剂盒,其可用于各种目的,例如表达靶抗原的细胞的杀伤;表达靶抗原的细胞的检测;来自细胞的靶抗原的定量、纯化或免疫沉淀。

[0715] 在一些实施方案中,发明的试剂盒是用于特异性检测生物样品中的抗原的免疫测定试剂盒,所述试剂盒包括:(a)如本文所述的免疫缀合物和/或其组合物;以及(b)检测所述免疫缀合物的说明书。本发明的靶抗原检测测定可以呈试剂盒的形式提供。在一些实施

方案中,这种试剂盒包括本发明的免疫缀合物或包含前述免疫缀合物(诸如本文所述的免疫缀合物)的组合物。试剂盒还可以包括捕获试剂的固体支持物,其可以呈单独的元件或已经固定了捕获试剂的元件提供。为了分离和纯化靶抗原,试剂盒可以含有本发明的免疫缀合物与珠粒(例如,琼脂糖珠)的偶联物。本发明提供试剂盒,其含有用于在体外,例如在ELISA或蛋白质印迹中,检测和/或定量靶抗原的抗体。在一些实施方案中,捕获试剂(例如,本发明的免疫缀合物)被包被在固体材料(例如,珠粒、微量滴定板或梳子(comb))上或附接至它们。可检测抗体可以是标记抗体,其被直接检测,或未标记抗体,其通过针对未标记抗体(诸如例如,不同物种中产生的抗体)的标记抗体进行检测。在标记是酶的情况下,试剂盒将通常包括酶所需的底物和辅因子;在标记是荧光团的情况下,试剂盒将通常包含提供可检测的发色团的染料前体;并且在标记是生物素的情况下,试剂盒将通常包含抗生物素蛋白,诸如抗生物素蛋白、链霉亲和素或链霉亲和素通过MUG与HRP或 β -半乳糖苷酶的缀合物。

[0716] 与本发明的制品一样,本发明的试剂盒包括容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。容器容纳包含至少一种本发明的免疫缀合物的组合物。可以包括另外的容器,其含有例如稀释剂和缓冲液、对照免疫缀合物或抗体。标签或包装插页可以提供对组合物的描述以及针对预期体外或检测使用的说明。试剂盒通常还含有添加剂,诸如稳定剂、洗涤和孵育缓冲液等,以用于进行测定方法。试剂盒的组分将以预定比率提供,各种试剂的相对量适当变化以提供基本上使测定的灵敏度最大的试剂在溶液中的浓度。特别地,试剂可以呈包含赋形剂的干粉提供,通常是冻干的,其在溶解时将提供具有适于与待测试样品合并的浓度的试剂溶液。

[0717] 本发明通过包含前述结构和功能的免疫缀合物的以下非限制性例子进一步说明,特别是具有VHH多肽、分子量介于60kDa与110kDa之间、血清半衰期少于96小时的平台,其在一些实施方案中,相对于其他抗体片段平台,在某些放射性标记过程所需的温度期间表现出增强的稳定性,并且其在一些实施方案中,相较于其他可能的递送平台,表现出由于放射分解导致的靶向能力的损失减少。

[0718] 某些定义

[0719] 在此描述中,阐述了某些具体细节以提供对各种实施方案的全面理解。然而,本领域技术人员将理解,所提供的实施方案可以在没有这些细节的情况下实践。除非上下文另外要求,否则在整个说明书和随后的权利要求中,词语“包含(comprise)”及其变型形式如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”应以开放、包含性的含义解释,即“包括但不限于”。除非内容另外明确规定,否则如在本说明书和所附权利要求中所用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物。还应注意,除非内容另外明确规定,否则术语“或”通常以其包括“和/或”的含义使用。此外,本文提供的标题仅是为了方便,并且不解释所要求保护的实施方案的范围或含义。

[0720] 除非另有指示,否则本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。这些技术在诸如以下的文献中得到了充分的解释:“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook等人,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M.J.Gait编著,1984);“Animal Cell Culture”(R.I.Freshney编著,1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press, Inc.);“Current Protocols in Molecular Biology”(F.M.Ausubel等人编著,1987,和定

期更新);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis等人编著,1994);“A Practical Guide to Molecular Cloning”(Perbal Bernard V.,1988);“Phage Display: A Laboratory Manual”(Barbas等人,2001)。技术人员将认识到与本文所述的方法和材料类似或等同的可用于实施本发明的许多方法和材料。实际上,本发明决不以任何方式限于所述的方法和材料。出于本发明的目的,一些术语定义如下。

[0721] 如说明书和所附权利要求中所用,除非上下文另外明确指出,否则术语“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括单数和复数个指示物。

[0722] 在本说明书通篇,术语“包括”用于意指“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可互换使用。

[0723] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员易于知道的相应值的通常误差范围。本文中对“约”值或参数的标引包括(并描述)针对所述值或参数本身的实施方案。术语“约”当在数字指示(例如数字温度、时间、量或浓度,包括范围)之前使用时,指示可以变化 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 的近似值。

[0724] 术语“氨基酸残基”或“氨基酸”包括掺入到蛋白质、多肽和/或肽中的氨基酸。术语“多肽”包括氨基酸或氨基酸残基的任何聚合物。术语“多肽序列”是指物理上构成多肽的一系列氨基酸或氨基酸残基。“蛋白质”是包含一个或多个多肽或多肽“链”的大分子。“肽”是大小为2至20个氨基酸残基的小多肽。术语“氨基酸序列”指根据长度,物理上构成肽或多肽的一系列氨基酸或氨基酸残基。除非另外指示,否则本文所公开的多肽和蛋白质序列从左到右书写,表示它们从氨基末端到羧基末端的次序。

[0725] 术语“氨基酸”、“氨基酸残基”、“氨基酸序列”或多肽序列包括天然存在的氨基酸(包括L和D异构体(isosteriomers)),并且除非另外限制,否则还包括天然氨基酸的已知类似物,所述类似物可以以与常见的天然氨基酸相似的方式起作用,诸如硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲基基蛋氨酸、 γ -羧基谷氨酸、羟脯氨酸羟丁赖氨酸(hydroxyprolinehypusine)、焦谷氨酸和硒代蛋氨酸(参见例如,Ho J等人,ACS Synth Biol 5:163-71(2016);Wang Y,Tsao M,Chembiochem17:2234-9(2016))。

[0726] 如本文所用,术语“放射性同位素”包括但不限于 α 发射同位素(alpha emitting isotope)(可互换地, α 发射同位素(α -emitting isotope))、 β 发射同位素(beta-emitting isotope)(可互换地, β 发射同位素(β -emitting isotope))和/或 γ 发射同位素(gamma-emitting isotope)(可互换地, γ 发射同位素(γ -emitting isotope)),诸如例如 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{89}Sr 、 ^{153}Sm 、 ^{225}Ac 、 ^{213}Bi 、 ^{213}Po 、 ^{212}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{224}Ra 、 ^{227}Th 、 ^{149}Tb 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Zr 、 ^{137}Cs 、 ^{212}Pb 和 ^{103}Pd 中的任一个。

[0727] 如本文所用,术语“放射性免疫缀合物”是指包含(1)根据本发明的免疫缀合物和(2)放射性同位素的分子复合物。在优选的实施方案中,放射性同位素是 α 发射放射性同位素。在另一个实施方案中,放射性同位素是 β 发射放射性同位素。在另一个实施方案中,放射性同位素是 γ 发射同位素。在另一个实施方案中,本发明提供包含 α 发射和 β 发射放射性同位素的放射性免疫缀合物。术语“放射性缀合物”在本文中术语“放射性免疫缀合物”可互换使用。在一个实施方案中,放射性同位素与放射性免疫缀合物的螯合剂缔合。在一个实施方案中,放射性同位素直接连接至免疫缀合物。

[0728] 如本文所用,术语“免疫缀合物”是指这样的分子复合物,其包含至少一个衍生自

抗体的抗原结合区(例如,可变区或互补决定区),所述抗原结合区进一步偶联至至少一个非抗体衍生的分子,诸如螯合因子或细胞毒性剂。非抗体衍生的分子可以例如缀合至抗原结合区的一个或多个赖氨酸或半胱氨酸残基缀合,或者缀合至与抗原结合区偶联(通过肽键或其他方式)的恒定区。在一些实施方案中,免疫缀合物还包含螯合剂(可互换地,“螯合因子”)。在一个实施方案中,免疫缀合物包含直接或间接连接至细胞毒性剂或放射性同位素的本发明的抗体构建体。

[0729] 本文所述的免疫缀合物和放射性免疫缀合物包含抗原结合区。这些抗原结合区可以衍生自“抗体”。本文中的术语“抗体”以最广泛的意义使用并且包括单克隆抗体,并且包括完整抗体及其功能性(抗原结合)抗体片段,包括以下片段:抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、单链抗体片段(包括单链可变片段(sFv或scFv))和单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程和/或以其他方式修饰的形式,例如胞内抗体(intrabodies)、肽抗体(peptibodies)、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和杂缀合物抗体(heteroconjugate antibodies)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、双抗体(diabodies)、三抗体(triabodies)和四抗体(tetrabodies)、串联di-scFv、串联三-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解成涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整抗体或全长抗体,包括任何类别或亚类的抗体,包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD。抗体可包含人IgG1恒定区。抗体可包含人IgG4恒定区。

[0730] 术语“互补决定区”和“CDR”(其与“高变区”或“HVR”同义)在本领域中已知是指抗体可变区内的非连续氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。通常,在每个重链可变区中有三个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且在每个轻链可变区中有三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。“框架区”和“FR”在本领域中是已知的,指代重链和轻链的可变区的非CDR部分。通常,在每个全长重链可变区中有四个FR(FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4),并且在每个全长轻链可变区中有四个FR(FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用许多熟知方案中的任一种容易地确定,所述方案包括以下文献中所述的那些:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745.”(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003Jan;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001Jun 8;309(3):657-70(“Aho”编号方案);以及Whitelegg NR和Rees AR,“WAM:an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB,”Protein Eng.2000Dec;13(12):819-24(“AbM”编号方案)。在某些实施方案中,本文所述的抗体的CDR可以通过选自Kabat、Chothia、IMGT、Aho、AbM或其组合的方法定义。

[0731] 给定CDR或FR的边界可能根据用于识别的方案而有差别。例如,Kabat方案是基于

结构比对,而Chothia方案是基于结构信息。Kabat和Chothia方案的编号均是基于最常见的抗体区域序列长度,在一些抗体中出现插入(其通过插入字母适应,例如“30a”)和缺失。两个方案将某些插入和缺失(“插入缺失”)放在不同的位置,得到不同的编号。接触(Contact)方案是基于对复杂的晶体结构的分析并且在许多方面中与Chothia编号方案相似。

[0732] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为 V_H 和 V_L)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版.,W.H.Freeman and Co.,91页(2007))。单个 V_H 或 V_L 结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合特定抗原的抗体的 V_H 或 V_L 结构域分离结合所述抗原的抗体,以分别筛选互补的 V_L 或 V_H 结构域的文库(参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991))。

[0733] 本文所述的免疫缀合物的抗原结合区可以是人源化的。关于免疫缀合物的“人源化”是指在抗原结合区内所有或基本上所有CDR氨基酸残基都衍生自非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基都衍生自人FR。人源化免疫缀合物任选地可以包括衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。

[0734] 在所提供的免疫缀合物中有人免疫缀合物。“人免疫缀合物”是具有这样的抗原结合区的免疫缀合物,其氨基酸序列对应于人或人细胞所产生的抗体的氨基酸序列,或利用人抗体库(repertoire)或其他编码人抗体的序列的非人来源(包括人抗体文库)的氨基酸序列。所述术语不包括包含非人抗原结合区的非人抗体的人源化形式,诸如其中所有或基本上所有CDR都是非人的那些。

[0735] 如本文所用,短语“抗原结合臂”是指包含“抗原结合区”、铰链区和变体恒定区的单多肽链。其他元件(例如,螯合剂;成像金属)可以直接或通过本发明组合物中的一个或多个接头附接至抗原结合臂。本发明的免疫缀合物包含共价连接在一起的两个抗原结合臂。在一个实施方案中,抗原结合臂通过铰链区连接。在一个实施方案中,抗原结合臂通过免疫球蛋白重链恒定区连接。在一个实施方案中,抗原结合臂通过变体恒定区连接。在一个实施方案中,抗原结合臂经由二硫键(例如,经由铰链区中的半胱氨酸残基)连接。

[0736] 如本文所用,短语“抗原结合区”是指免疫缀合物中负责与抗原特异性结合的区域,此类区域包含一个或多个抗原结合结构域、互补决定区、可变区和框架区,如本领域普通技术人员已知,其可以衍生自抗体或其片段,在其上建模或可以模拟它们。在一个实施方案中,抗原结合臂的“抗原结合区”含有一个或两个抗原结合结构域。在优选的实施方案中,抗原结合臂的“抗原结合区”由单个抗原结合结构域组成,所述抗原结合结构域优选是VHH多肽。在优选的实施方案中,免疫缀合物的两个抗原结合臂的抗原结合区独立地由单个抗原结合结构域组成,所述抗原结合结构域优选是VHH多肽,所述VHH多肽是相同或不同的。

[0737] 如本文所用,术语“VHH多肽”涵盖天然和合成组合物,并且是指构成本领域已知的VHH片段的多肽,即,构成单结构域仅重链可变结构域片段的多肽,或在结构和功能上类似于VHH片段的多肽,此类结构如下文进一步描述,并且具有特异性结合下文所述的抗原的能力,并且两者都是本领域熟知。在优选的实施方案中,VHH多肽包含有包含三个重链CDR的重链可变区;在一个实施方案中,VHH多肽衍生自骆驼科动物;在另一个实施方案中,VHH多肽

衍生自文库;VHH多肽以特异性和高亲和力结合抗原。在优选的实施方案中,VHH多肽是包含以下排列的单重链可变结构域:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。VHH多肽可以例如作为体内(例如,在骆驼科动物中)生成的仅重链抗体的抗原结合片段而获得。VHH多肽还可以从合成文库获得,例如噬菌体展示文库。例如参见McMahon等人,Nature Structural & Molecular Biology|VOL 25|2018年3月|289-296Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies;Moutel等人,eLife 2016;5:e16228 NaLi-H1:A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies;De Genst E,Saerens D,Muyldermans S,Conrath K.Antibody repertoire development in camelids.Dev Comp Immunol.2006;30(1-2):187-98.doi:10.1016/j.dci.2005.06.010.PMID:16051357;Vincke C,Gutiérrez C,Wernery U,Devoogdt N,Hassanzadeh-Ghassabeh G,Muyldermans S.Generation of singledomain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs.Methods Mol Biol.2012;907:145-76.doi:10.1007/978-1-61779-974-7_8.PMID:22907350;Arbabi Ghahroudi M,Desmyter A,Wyns L,Hamers R,Muyldermans S.Selection and identification of singledomain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies.FEBS Lett.1997Sep 15;414(3):521-6.doi:10.1016/s0014-5793(97)01062-4.PMID:9323027。

[0738] 对于VHH人源化,参见例如,Vincke C,Loris R,Saerens D,Martinez-Rodriguez S,Muyldermans S,Conrath K.General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold.J Biol Chem.2009Jan 30;284(5):3273-84.doi:10.1074/jbc.M806889200.Epub 2008Nov 14.PMID:19010777。

[0739] 对于VHH稳定性,参见例如,Kunz P,Flock T,Soler N,Zaiss M,Vincke C,Sterckx Y,Kastelic D,Muyldermans S,Hoheisel JD.Exploiting sequence and stability information for directing nanobody stability engineering.Biochim Biophys Acta Gen Subj.2017Sep;1861(9):2196-2205.doi:10.1016/j.bbagen.2017.06.014.Epub 2017Jun 20.PMID:28642127;PMCID:PMC5548252;Kunz P,Zinner K,Mücke N,Bartoschik T,Muyldermans S,Hoheisel JD.The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance.Sci Rep.2018年5月21日;8(1):7934.doi:10.1038/s41598-018-26338-z.PMID:29784954;PMCID:PMC5962586。

[0740] 本文中的“接头”也称为“接头序列”、“间隔序列(spacer)”、“拴系序列(tethering sequence)”或其语法等同形式。如本文所提及的“接头”连接两个不同分子,它们本身具有靶结合、催化活性,或者天然表达并组装为单独的多肽,或者包含相同多肽的单独结构域。例如,两个不同的结合部分或重链/轻链对或抗原结合区和免疫球蛋白重链恒定区。可以使用多种策略将分子共价连接在一起。本文所述的接头可以用于接合scFv分子中的轻链可变区和重链可变区;或者可以用于将scFv或其他抗原结合片段拴系在抗体重链的N末端或C末端。这些包括但不限于蛋白质或蛋白质结构域的N末端与C末端之间的多肽键联、经由二硫键的键联以及经由化学交联试剂的键联。在此实施方案的一个方面中,接头是通过重组技术或肽合成所生成的肽键。

[0741] “结合”感兴趣的抗原或表位的抗体是以与非特异性相互作用明显不同的足够的亲和力结合抗原或表位的抗体。例如,可以通过与对照分子结合相比确定分子结合来测量特异性结合,对照分子通常是不具有结合活性的相似结构的分子。

[0742] “特异性结合”是指这样的抗体或免疫缀合物,其能够以足够的亲和力结合抗原,使得抗体可用作靶向所述抗原的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中,如通过例如放射免疫测定所测量,抗体与无关蛋白质的结合程度小于抗体与其抗原的结合的约10%。如本文所用,“抗原特异性”抗体或免疫缀合物是这样的抗体或免疫缀合物,其以足够的特异性和亲和力特异性结合抗原,以可用于靶向治疗、靶向诊断或检测来自对象的生物样品中的抗原的方法。在一些实施方案中,与靶抗原结合的免疫缀合物或抗体构建体或靶标成像复合物或放射性免疫缀合物的解离常数(K_D) $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<0.01\text{nM}$ 或 $<0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物、或抗体构建体、或靶标成像复合物、或放射性免疫缀合物结合多种抗原,诸如例如来自不同物种的同源物中保守的表位,诸如其中表位的氨基酸同一性在不同物种中不相同。

[0743] 如本文所用,术语“变体恒定区”是指包含已从天然免疫球蛋白氨基酸序列修饰(优选地在一个至若干氨基酸位置处)的免疫球蛋白重链恒定区的一部分的多肽。除非本文另外指明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中所述。出于各种目的对Fc区的修饰是本领域熟知的。例如参见,Kevin O.Saunders,Frontiers in Immunology,2019年6月|10卷|文章1296,标题“Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life”。

[0744] 关于参考多肽序列的序列同一性百分比(%)是在用以实现最大序列同一性百分比而比对序列和引入缺口(如果需要)并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以使用可用的计算机软件以多种方式实现出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对。能够确定用于比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成氨基酸序列同一性百分比值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc.编写,并且源代码已经以用户文档提交在Washington D.C.,20559的美国版权局(U.S.Copyright Office)中,其中它在美国版权登记号TXU510087下进行了登记。ALIGN-2程序可从South San Francisco, Calif.的Genentech, Inc.公开获得,或者可以从源代码编译。应编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,并且不改变。

[0745] 在ALIGN-2用于氨基酸序列比较的情形下,给定氨基酸序列A对于、与或相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其可以可替代地措词为给定氨基酸序列A具有或包含对于、与或相对于给定氨基酸序列B的某一氨基酸序列同一性%)如下计算: $100 \times \text{分数} X/Y$,其中X为通过序列比对程序ALIGN-2在所述程序的A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y为B中的氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序

列同一性%。除非另外明确说明,否则本文所用的全部氨基酸序列同一性%值如紧接上一段中所述那样使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0746] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于:放射性同位素;化学治疗剂或药物(例如,甲氨蝶呤(methotrexate)、阿德里霉素(adriamycin)、长春花生物碱(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素(mitomycin)C、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酸酶;抗生素;毒素,诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶促活性毒素,包括其片段和/或变体;以及本文所述的各种细胞毒性剂。

[0747] 术语“亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原或表位)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原或表位)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的常见方法(包括本文所述的那些)测量。本文描述了用于测量结合亲和力的具体说明性实施方案。

[0748] 术语“拮抗剂”以最广泛的含义使用,并且包括部分或完全阻断、抑制或中和抗原的生物活性的任何分子。合适的拮抗剂分子明确包括拮抗剂抗体或抗体片段或其衍生物。

[0749] “封闭”抗体或“拮抗”抗体是抑制或降低它所结合的抗原或包含所述抗原的蛋白质复合物的生物活性的抗体。优选的封闭抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原或包含抗原的蛋白质复合物的生物活性。

[0750] 如本文所用,术语“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌性细胞和组织。

[0751] 如本文所用,术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中的通常特征在于细胞生长不受调控的生理病状。“肿瘤”包含一个或多个癌性细胞。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴系恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌(squamous cell cancer)(例如,上皮鳞状细胞癌(epithelial squamous cell cancer))、皮肤癌(skin cancer)、黑色素瘤(melanoma)、肺癌(lung cancer)(包括小细胞肺癌(small-cell lung cancer)、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer)(“NSCLC”)、肺腺癌(adenocarcinoma of the lung)和肺鳞状细胞癌(squamous carcinoma of the lung))、腹膜癌(cancer of the peritoneum)、肝细胞癌(hepatocellular cancer)、胃癌(gastric or stomach cancer)(包括胃肠道癌(gastrointestinal cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)(例如,胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma))、胶质母细胞瘤(glioblastoma)、宫颈癌(cervical cancer)、卵巢癌(ovarian cancer)(例如,高级别浆液性卵巢癌(high grade serous ovarian carcinoma))、肝癌(liver cancer)(例如,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)(HCC))、膀胱癌(bladder cancer)(例如,尿路上皮膀胱癌(urothelial bladder cancer))、睾丸(生殖细胞肿瘤)癌(testicular(germ cell tumor)cancer)、肝细胞瘤(hepatoma)、乳腺癌(breast cancer)、脑癌(brain cancer)(例如,星形细胞瘤(astrocytoma))、结肠癌(colon cancer)、直肠癌(rectal

cancer)、结直肠癌(colorectal cancer)、子宫内膜癌或子宫癌(endometrial or uterine carcinoma)、唾液腺癌(salivary gland carcinoma)、肾癌(kidney or renal cancer)(例如,肾细胞癌(renal cell carcinoma)、肾母细胞瘤(nephroblastoma)或维尔姆斯氏瘤(Wilms'tumor))、前列腺癌(prostate cancer)、外阴癌(vulval cancer)、甲状腺癌(thyroid cancer)、肝癌(hepatic carcinoma)、肛门癌(anal carcinoma)、阴茎癌(penile carcinoma)以及头颈癌(head and neck cancer)。癌症的另外例子包括但不限于视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)、卵泡膜细胞瘤(thecomas)、卵巢男性细胞瘤(arrhenoblastomas)、肝细胞瘤(hepatoma)、血液学恶性肿瘤(hematologic malignancies)(包括非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma)(NHL)、多发性骨髓瘤(multiple myeloma)和急性血液学恶性肿瘤(acute hematologic malignancies))、子宫内膜癌或子宫癌(endometrial or uterine carcinoma)、子宫内膜异位(endometriosis)、纤维肉瘤(fibrosarcomas)、绒毛膜癌(choriocarcinoma)、唾液腺癌(salivary gland carcinoma)、外阴癌(vulval cancer)、甲状腺癌(thyroid cancer)、食道癌(esophageal carcinomas)、肝癌(hepatic carcinoma)、肛门癌(anal carcinoma)、阴茎癌(penile carcinoma)、鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma)、喉癌(laryngeal carcinomas)、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、黑色素瘤(melanoma)、皮肤癌(skin carcinomas)、许旺氏细胞瘤(Schwannoma)、少突胶质细胞瘤(oligodendroglioma)、神经母细胞瘤(neuroblastomas)、横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)、成骨肉瘤(osteogenic sarcoma)、平滑肌肉瘤(leiomyosarcomas)、尿路癌(urinary tract carcinomas)、间变性星形细胞瘤(anaplastic astrocytoma)、基底细胞癌(basal cell carcinoma)(基底细胞上皮瘤(basal cell epithelioma))、胆管癌(bile duct cancer)、小细胞膀胱癌(small cell bladder cancer)、转移性乳腺癌(metastatic breast cancer)、转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer)、上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer)、输卵管癌(fallopian tube cancer)、胃腺癌(gastric adenocarcinoma)、多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme)(GBM)、复发性多形性胶质母细胞瘤(recurrent glioblastoma multiforme)(GBM)、神经胶质瘤(gliomas)、神经胶质肉瘤(gliosarcoma)、头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma)(HNSCC)、复发性头颈癌鳞状细胞癌(recurrent head and neck cancer squamous cell carcinoma)、恶性胸膜间皮瘤头颈癌(malignant pleural mesothelioma head and neck cancer)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、转移性肾细胞癌(metastatic renal cell carcinoma)、转移性肾透明细胞癌(metastatic renal clear cell carcinoma)、鳞状非小细胞肺癌(squamous non-small cell lung cancer)、肺鳞状癌(squamous carcinoma of the lung)、复发性或难治性小细胞肺癌(relapsed or refractory small-cell lung cancer)、治疗抗性黑色素瘤(treatment-resistant melanoma)、转移性黑色素瘤(metastatic melanoma)、默克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、神经内分泌癌(neuroendocrine cancer)、大细胞神经内分泌癌(large cell neuroendocrine cancer)、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumors)(NETS)、卵巢癌(ovarian carcinoma)、乳头状癌(papillary carcinoma)、腹膜癌(peritoneal cancer)、神经内分泌前列腺癌(neuroendocrine prostate cancer)、激素难治性前列腺癌(hormone-refractory prostate cancer)、去势抗性前列腺癌(castration-

resistant prostate cancer)、软组织肉瘤(soft tissue sarcoma)和鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)。

[0752] 术语“转移性癌症”意指这样的癌症状态,在其中起源组织的癌细胞通过血管或淋巴管从原始部位转移到身体中别处的一个或多个部位,以形成在除起源组织外的一个或多个器官中的一种或多种继发性肿瘤。一个突出的例子是转移性乳腺癌。

[0753] 术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”是指与一定程度的异常细胞增殖相关联的病症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症是癌症。

[0754] 关于要求保护的发明的术语“缔合(associated)”、“缔合(associating)”、“连接(linked)”或“连接(linking)”是指分子的两个或更多个组分接合、附接、连接(connected)或以其他方式偶联以形成单分子(或单分子复合物)的状态,或者通过在两个分子之间产生缔合、键联、附接和/或任何其他连接而使两个分子彼此缔合以形成单分子(或单分子复合物)的行为。例如,术语“连接”可以指两个或更多个组分通过一种或多种原子相互作用缔合,使得形成单分子,并且其中各个原子相互作用可以是共价或非共价的。两个组分之间的共价缔合的非限制性例子包括肽键和半胱氨酸-半胱氨酸二硫键。两个分子组分之间的非共价缔合的非限制性例子包括离子键。

[0755] 出于本发明的目的,术语“融合”是指两个或更多个蛋白质性组分通过至少一个共价键缔合,所述共价键为肽键,无论肽键是涉及羧酸基团的碳原子的参与还是涉及另一个碳原子,诸如例如, α -碳、 β -碳、 γ -碳、 σ -碳等。融合在一起的两个蛋白质性组分的非限制性例子包括例如经由肽键与多肽融合的氨基酸、肽或多肽,使得所得分子是单个连续的多肽。出于本发明的目的,术语“融合”是指产生如上所述的融合分子的行为,诸如例如,由遗传区的重组融合生成的融合蛋白,其在翻译时产生单个蛋白质性分子。

[0756] “双特异性”抗体是指对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体,无论多个表位是否在同一分子中和/或部分重叠。在一些实施方案中,本发明的双特异性免疫缀合物结合本文所述的单个抗原的两个不同表位。

[0757] 如本文所用,术语“表达(expressed)”、“表达(expressing)”或“表达(expresses)”及其语法变型是指将多核苷酸或核酸翻译成蛋白质。表达的蛋白质可以保留在细胞内,成为细胞表面膜的组分或被分泌到细胞外空间中。

[0758] 出于本发明的目的,当提及多肽或多肽区域时,短语“衍生自”意指多肽或多肽区域包含高度相似的氨基酸序列,所述氨基酸序列最初在“亲本”蛋白中发现并且现在可能相对于原始多肽或多肽区域包含某些氨基酸残基添加、缺失、截短、重排或其他改变,只要“亲本”分子的某些功能(例如,抗原结合亲和力)或结构是基本上保守的即可。技术人员将能够使用本领域已知的技术(例如,蛋白质序列比对软件)鉴定衍生出多肽或多肽区域(例如,VHH多肽、CDR、HVR、 V_H 和/或 V_L)的亲本分子(例如,抗体序列)。

[0759] 如本文所用,在至少一个细胞表面上表达细胞外靶生物分子或抗原的细胞是“靶标阳性细胞”或“靶标+细胞”并且是物理偶联至指定细胞外靶生物分子的细胞。下面提供了另外的靶生物分子描述。“靶生物分子”、“靶抗原分子”、“靶抗原”、“感兴趣的抗原”以及语法变型和等同形式在本文中可互换使用,如本领域普通技术人员考虑使用情境所认识到的那样,并且包括抗体结合的分子决定因素。此类抗原可以通过免疫缀合物的抗原结合区或抗原结合臂被本文所述的免疫缀合物结合。

[0760] 关于分子的细胞毒性活性的术语“选择性细胞毒性”是指生物分子靶标阳性细胞群(例如,靶向的细胞类型)和非靶向的旁观者细胞群(例如,生物分子靶标阴性细胞类型)之间的细胞毒性的相对水平,其可以表示为靶向的细胞类型的半最大细胞毒性浓度(CD_{50})相对于非靶向的细胞类型的 CD_{50} 的比率,以提供细胞毒性选择性的度量,或者指示相对于非靶向的细胞,优先杀伤靶向的细胞。

[0761] 术语“药物制剂”或“药物组合物”是指这样的制剂,其形式使其中所含的活性成分的生物活性有效,并且其不含有对于施用制剂的对象具有不可接受的毒性的另外组分。

[0762] “药学上可接受的载剂”是指药物制剂中除活性成分之外的对于对象无毒的成分。药学上可接受的载剂包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0763] “分离的”抗体或免疫缀合物或放射性免疫缀合物是从其天然环境或人工生产的组分中分离出来的。在一些实施方案中,抗体被纯化至大于95%或99%的纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)所确定。用于评估组合物中抗体纯度的常规方法是技术人员已知的,参见例如Flatman等人, J.Chromatogr.B 848:79-87 (2007)。具体地,待纯化掉的不需要的组分(污染物)是会干扰抗体的所需用途(诸如例如,治疗用途)的组分,并且可以包括尤其是细菌因子、酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性溶质。

[0764] “分离的”核酸是指已从其天然环境的组分分离出来的核酸分子。分离的核酸包括细胞中所含的核酸分子,所述细胞普遍含有所述核酸分子,但是所述核酸分子存在于染色体外位置或与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0765] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和自其衍生的子代,不考虑传代次数。子代的核酸含量可能与亲本细胞不完全相同,而是可能含有突变。本文包括功能或生物活性与在最初转化的细胞中筛选或选择相同的突变体后代。

[0766] 如本文所用,关于免疫缀合物或其组合物(例如,放射性免疫缀合物、药物组合物或诊断组合物),术语“施用”意指经由任何已知的适于递送免疫缀合物或其组合物的方法向对象身体递送免疫缀合物或其组合物。具体的施用模式包括但不限于静脉内、透皮、皮下、腹膜内和鞘内施用。

[0767] 剂(例如,药物制剂)的“有效量”是指在必要的剂量和时间段下有效实现所需治疗或预防结果的量。

[0768] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变型,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变被治疗个体的自然病程的临床干预,并且可以针对预防或在临床病理过程中进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或缓和疾病状态以及缓解或改善的预后。在一些实施方案中,本发明的放射性免疫缀合物用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0769] “治疗有效量”是实现特定病症的可测量的改善或预防所需的至少最小浓度。本文的治疗有效量可以根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及本发明的组合物在个体中引发所需应答的能力的因素而变化。治疗有效量也是本发明组合物的任何毒性或有害

效应被治疗有益效应抵消的量。

[0770] 如本文所用,术语“预测”和“预后”是可互换的。在一种意义上,预测或预后的方法是允许实践本发明的预测/预后方法的人选择被认为(通常在治疗之前,但不一定)更有可能对用本发明的免疫缀合物或前述的组合物(例如,药物组合物)的治疗有应答的患者。

[0771] 术语“检测”以最广泛的意义使用,以包括靶抗原分子的定性和定量测量。在一个方面,如本文所述的检测方法用于鉴定生物样品中感兴趣的抗原的存在。在另一方面,所述方法用于测试样品中感兴趣的抗原是否以可检测的水平存在。在另一方面,所述方法可以用于定量样品中感兴趣的抗原的量并且进一步比较不同样品的抗原水平。在另一方面,所述方法可以用于在体内确定靶细胞的位置,例如使用本发明的靶向成像复合物。

[0772] 术语“生物样品”是指可能含有感兴趣的抗原的任何生物物质。样品可以是生物流体,诸如全血或全血组分,包括红细胞、白细胞、血小板、血清和血浆、腹水、玻璃体液、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、羊水、奶、唾液、痰、泪液、汗液、粘液、脑脊液和可能含有感兴趣的抗原的身体其他成分。在各种实施方案中,样品是来自任何动物的生物样品。在一些实施方案中,样品来自哺乳动物。在一些实施方案中,样品是人类对象。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的血清。在一些实施方案中,生物样品是活检材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的活检材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的血清。在一些实施方案中,生物样品是原代细胞培养材料。在一些实施方案中,生物样品是来自临床患者的原代细胞培养材料。在一些实施方案中,生物样品来自临床患者或者用本发明的组合物(例如,放射性免疫缀合物)治疗或用不同的治疗剂(诸如,靶向感兴趣的抗原的抗体-药物缀合物、或 β -辐射、或小分子治疗剂)治疗的患者。

[0773] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗性产品的商业包装中的说明书,其含有关于此类治疗产品的使用的适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0774] 如本文所用,术语“载体”是指这样的核酸分子,其能够使与其连接的另一核酸增殖。所述术语包括呈自我复制核酸结构的载体以及掺入其所引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0775] 如本文所用, C_1-C_x 包括 C_1-C_2 、 $C_1-C_3\cdots C_1-C_x$ 。仅作为示例,指定为“ C_1-C_6 ”的基团表示在该部分中有一至六个碳原子,即含有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子或4个碳原子的基团。因此,仅作为示例,“ C_1-C_4 烷基”表示在烷基中有一至四个碳原子,即,烷基选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

[0776] “烷基”指脂肪族烃基。烷基是支链或直链。在一些实施方案中,“烷基”具有1至10个碳原子,即 C_1-C_{10} 烷基。无论何时在本文中出现,诸如“1至10”的数值范围是指给定范围内的每个整数;例如,“1-10个碳原子”意指烷基由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等,直至并包括10个碳原子组成,尽管本定义也涵盖其中没有指定数值范围的术语“烷基”的出现。在一些实施方案中,烷基是 C_1-C_6 烷基。在一个方面,烷基是甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。典型的烷基包括但决不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、新戊基或己基。

[0777] “亚烷基”是指二价烷基。上述单价烷基中的任一个可以通过从所述烷基中提取第二氢原子而成为亚烷基。在一些实施方案中,亚烷基是 C_1-C_6 亚烷基。在其他实施方案中,亚

烷基是 C_1 - C_4 亚烷基。典型的亚烷基包括但不限于 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 等。在一些实施方案中,亚烷基是 $-CH_2-$ 。

[0778] “烷氧基”是指(烷基)O-基团,其中烷基如本文所定义。

[0779] 术语“烷基胺”是指-N(烷基) $_x$ H $_y$ 基团,其中x是0并且y是2,或其中x是1并且y是1,或其中x是2并且y是0。

[0780] “羟烷基”是指其中一个氢原子被羟基替代的烷基。在一些实施方案中,羟烷基是 C_1 - C_4 羟烷基。典型的羟烷基包括但不限于 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 等。

[0781] “氨基烷基”是指其中一个氢原子被氨基替代的烷基。在一些实施方案中,氨基烷基是 C_1 - C_4 氨基烷基。典型的氨基烷基包括但不限于 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 等。

[0782] 术语“烯基”是指其中存在至少一个碳-碳双键的烷基类型。在一个实施方案中,烯基具有式 $-C(R)=CR_2$,其中R是指烯基的剩余部分,其可以相同或不同。在一些实施方案中,R是H或烷基。在一些实施方案中,烯基选自乙烯基(ethenyl)(即,乙烯基(vinyl))、丙烯基(即,烯丙基)、丁烯基、戊烯基、戊二烯基等。烯基的非限制性例子包括 $-CH=CH_2$ 、 $-C(CH_3)=CH_2$ 、 $-CH=CHCH_3$ 、 $-C(CH_3)=CHCH_3$ 和 $-CH_2CH=CH_2$ 。

[0783] 术语“炔基”是指其中存在至少一个碳-碳三键的烷基类型。在一个实施方案中,炔基具有式 $-C\equiv C-R$,其中R是指炔基的剩余部分。在一些实施方案中,R是H或烷基。在一些实施方案中,炔基选自乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基等。炔基的非限制性例子包括 $-C\equiv CH$ 、 $-C\equiv CCH_3$ 、 $-C\equiv CCH_2CH_3$ 、 $-CH_2C\equiv CH$ 。

[0784] 术语“杂烷基”是指如下烷基,其中烷基的一个或多个骨架原子选自碳以外的原子,例如,氧、氮(例如 $-NH-$ 、 $-N$ (烷基)-)、硫或其组合。杂烷基在杂烷基的碳原子处附接至分子的其余部分。在一个方面,杂烷基是 C_1 - C_6 杂烷基。

[0785] 术语“芳香族”是指具有含有 $4n+2\pi$ 个电子的离域 π 电子系统的平面环,其中n是整数。术语“芳香族”包括碳环芳基(“芳基”,例如,苯基)和杂环芳基(或“杂芳基”或“杂芳香族”)基团(例如,吡啶)。所述术语包括单环或稠环多环(即,共享相邻碳原子对的环)基团。

[0786] 术语“碳环的”或“碳环”是指形成环骨架的原子均为碳原子的环或环体系。因此,所述术语将碳环与其中环骨架含有至少一个不同于碳的原子的“杂环”环或“杂环”区分开来。在一些实施方案中,双环碳环的两个环中的至少一个是芳香族的。在一些实施方案中,双环碳环的两个环都是芳香族的。碳环包括芳基和环烷基。

[0787] 如本文所用,术语“芳基”是指芳香环,其中形成环的原子中的每一个都是碳原子。在一个方面,芳基是苯基或萘基。在一些实施方案中,芳基是苯基。在一些实施方案中,芳基是苯基、萘基、茛满基、茛基或四氢萘基。在一些实施方案中,芳基是 C_6 - C_{10} 芳基。根据结构,芳基是单价基团或二价基团(即,亚芳基)。

[0788] 术语“环烷基”是指单环或多环脂肪族非芳香族基团,其中形成环的原子(即,骨架原子)中的每一个都是碳原子。在一些实施方案中,环烷基是螺环或桥接化合物。在一些实施方案中,环烷基任选地与芳香环稠合,并且附接点位于不是芳香环碳原子的碳上。环烷基包括具有3至10个环原子的基团。在一些实施方案中,环烷基选自环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基、环辛基、螺[2.2]戊基、降冰片基和二环[1.1.1]戊基。

在一些实施方案中,环烷基是C₃-C₆环烷基。

[0789] 术语“卤代基”或可替代地“卤素”或“卤化物”意指氟、氯、溴或碘。在一些实施方案中,卤代基是氟、氯或溴。

[0790] 术语“氟烷基”是指其中一个或多个氢原子被氟原子替代的烷基。在一个方面,氟烷基是C₁-C₆氟烷基。

[0791] 术语“杂环”或“杂环的”是指在一个或多个环中含有一至四个杂原子的杂芳香环(也称为杂芳基)和杂环烷基环,其中一个或多个环中的每个杂原子选自O、S和N,其中每个杂环基团在其环体系中具有3至10个原子,并且条件是任何环不含有两个相邻的O或S原子。非芳香族杂环基团(也称为杂环烷基)包括在其环体系中具有3至10个原子的环,并且芳香族杂环基团包括在其环体系中具有5至10个原子的环。杂环基团包括苯并稠环体系。非芳香族杂环基团的例子是吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、噁唑烷酮基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基(tetrahydrothiopyranyl)、哌啶基、吗啉基、硫代吗啉基、噻噁烷基、哌嗪基、氮丙啶基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、高哌啶基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧氮杂卓基(oxazepinyl)、二氮杂卓基(diazepinyl)、硫氮杂卓基(thiazepinyl)、1,2,3,6-四氢吡啶基、吡咯啉-2-基、吡咯啉-3-基、吲哚啉基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧戊环基(1,3-dioxolanyl)、吡唑啉基、二噻烷基、二硫戊环基(dithiolanyl)、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂双环[3.1.0]己烷基、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷基、3H-吲哚基、吲哚啉-2-酮基、异吲哚啉-1-酮基、异吲哚啉-1,3-二酮基、3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮基、3,4-二氢喹啉-2(1H)-酮基、异吲哚啉-1,3-二亚硫酰基、苯并[d]噁唑-2(3H)-酮基、1H-苯并[d]咪唑-2(3H)-酮基、苯并[d]噻唑-2(3H)-酮基和喹啉基。芳香族杂环基团的例子是吡啶基、咪唑基、嘧啶基、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲嗪基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、呋咱基、苯并呋咱基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、萘啶基和呋喃并吡啶基。以上基团是C附接的(或C连接的)或N附接的(在可能的情况下)。例如,衍生自吡咯的基团包括吡咯-1-基(N附接的)或吡咯-3-基(C附接的)。此外,衍生自咪唑的基团包括咪唑-1-基或咪唑-3-基(均是N附接的)或咪唑-2-基、咪唑-4-基或咪唑-5-基(都是C附接的)。杂环基团包括苯并稠环体系。非芳香族杂环任选地被一个或两个氧代(=O)部分诸如吡咯烷-2-酮取代。在一些实施方案中,双环杂环的两个环中的至少一个是芳香族的。在一些实施方案中,双环杂环的两个环都是芳香族的。

[0792] 术语“杂芳基”或可替代地“杂芳香族的”是指包括一个或多个选自氮、氧和硫的环杂原子的芳基。杂芳基的说明性例子包括单环杂芳基和双环杂芳基。单环杂芳基包括吡啶基、咪唑基、嘧啶基、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、哒嗪基、三嗪基、噁二唑基、噻二唑基和呋咱基。单环杂芳基包括吲哚、吲嗪、苯并呋喃、苯并噻吩、吲唑、苯并咪唑、嘌呤、喹啉、噌啉、酞嗪、喹唑啉、喹喔啉、1,8-萘啶和蝶啶。在一些实施方案中,杂芳基在环中含有0-4个N原子。在一些实施方案中,杂芳基在环中含有1-4个N原子。在一些实施方案中,杂芳基在环中含有0-4个N原子、0-1个O原子和0-1个S原子。在一些实施方案中,杂芳基在环中含有1-4个N原子、0-1个O

原子和0-1个S原子。在一些实施方案中,杂芳基是C₁-C₉杂芳基。在一些实施方案中,单环杂芳基是C₁-C₅杂芳基。在一些实施方案中,单环杂芳基是5元或6元杂芳基。在一些实施方案中,二环杂芳基是C₆-C₉杂芳基。

[0793] “杂环烷基”是指包括至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的环烷基。在一些实施方案中,杂环烷基与芳基或杂芳基稠合。在一些实施方案中,杂环烷基是噁唑烷酮基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶基、吗啉基、硫代吗啉基、哌嗪基、哌啶-2-酮基、吡咯烷-2,5-二亚硫酰基、吡咯烷-2,5-二酮基、吡咯烷酮基、咪唑烷基、咪唑烷-2-酮基或噻唑烷-2-酮基。术语杂环烷基还包括碳水化合物的所有环形式,包括但不限于单糖、二糖和寡糖。在一个方面,杂环烷基是C₂-C₁₀杂环烷基。在另一个方面,杂环烷基是C₄-C₁₀杂环烷基。在一些实施方案中,杂环烷基在环中含有0-2个N原子。在一些实施方案中,杂环烷基在环中含有0-2个N原子、0-2个O原子和0-1个S原子。

[0794] 术语“键”或“单键”是指当通过键连接的原子被认为是较大子结构的一部分时,两个原子或两个部分之间的化学键。在一个方面,当本文所述的基团是键时,不存在所引用的基团,从而允许在剩余的确定基团之间形成键。

[0795] 术语“部分”是指分子的特定片段或官能团。化学部分通常是嵌入或附加于分子的公认的化学实体。

[0796] 术语“任选地取代的”或“取代的”意指所引用的基团任选地被一个或多个单独且独立地选自以下的另外基团取代:卤素、-CN、-NH₂、-NH(烷基)、-N(烷基)₂、-OH、-CO₂H、-CO₂烷基、-C(=O)NH₂、-C(=O)NH(烷基)、-C(=O)N(烷基)₂、-S(=O)₂NH₂、-S(=O)₂NH(烷基)、-S(=O)₂N(烷基)₂、烷基、环烷基、氟烷基、杂烷基、烷氧基、氟烷氧基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、烷基亚砷、芳基亚砷、烷基砷和芳基砷。在一些其他实施方案中,任选的取代基独立地选自卤素、-CN、-NH₂、-NH(CH₃)、-N(CH₃)₂、-OH、-CO₂H、-CO₂(C₁-C₄烷基)、-C(=O)NH₂、-C(=O)NH(C₁-C₄烷基)、-C(=O)N(C₁-C₄烷基)₂、-S(=O)₂NH₂、-S(=O)₂NH(C₁-C₄烷基)、-S(=O)₂N(C₁-C₄烷基)₂、C₁-C₄烷基、C₃-C₆环烷基、C₁-C₄氟烷基、C₁-C₄杂烷基、C₁-C₄烷氧基、C₁-C₄氟烷氧基、-SC₁-C₄烷基、-S(=O)C₁-C₄烷基和-S(=O)₂C₁-C₄烷基。在一些实施方案中,任选的取代基独立地选自卤素、-CN、-NH₂、-OH、-NH(CH₃)、-N(CH₃)₂、-CH₃、-CH₂CH₃、-CF₃、-OCH₃和-OCF₃。在一些实施方案中,取代的基团被前述基团中的一个或两个取代。在一些实施方案中,脂肪族碳原子(无环或环状)上的任选取代基包括氧代(=O)。

[0797] 实施例

[0798] 这些程序中使用的试剂可从Macrocylics、Millipore Sigma、CombiBlocks、Chem-Impex、LabNetwork、ArkPharm和Broadpharm获得。在一些章节中,根据文献制备了本领域已知的高级中间体。除非另有说明,否则所有溶剂均获得自VWR、Thermo Fisher或LabNetwork,并按原样使用。在氮气气氛下进行的反应使用干溶剂。使用具有C18反相柱和乙腈/水(+0.1%甲酸)梯度的Agilent 1260Infinity HPLC-MS或Waters HPLC-MS获取质谱。使用具有适当尺寸的正相硅胶柱的Biotage IsoleraOne仪进行快速色谱法,其中在254nm处收集级分。使用乙腈/水(+0.1% TFA或0.1% FA)梯度通过Agilent制备型HPLC(Agilent, Hanover, CT)纯化最终化合物。使用Bruker 400或600MHz NMR仪获取NMR谱,并用MestReNova v.14进行处理。在可用的情况下,用在手动模式中使用多重峰分析功能编辑详细的NMR数据。

[0799] 此实验中使用的缩略词包括但不限于:

[0800] DCM-二氯甲烷(methylene chloride)/二氯甲烷(dichloromethane) TFA-三氟乙酸

[0801] HATU-1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐

[0802] HBTU-3-[双(二甲基氨基)甲基鎓]-3H-苯并三唑-1-氧化物六氟磷酸盐

[0803] HOAt-3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-醇

[0804] EDC/EDCI-3-{[(乙基亚氨基)亚甲基]氨基}-N,N-二甲基丙烷-1-胺DCC-N,N'-二环己基甲烷二亚胺

[0805] ACN/MeCN-乙腈

[0806] EtOAc-乙酸乙酯

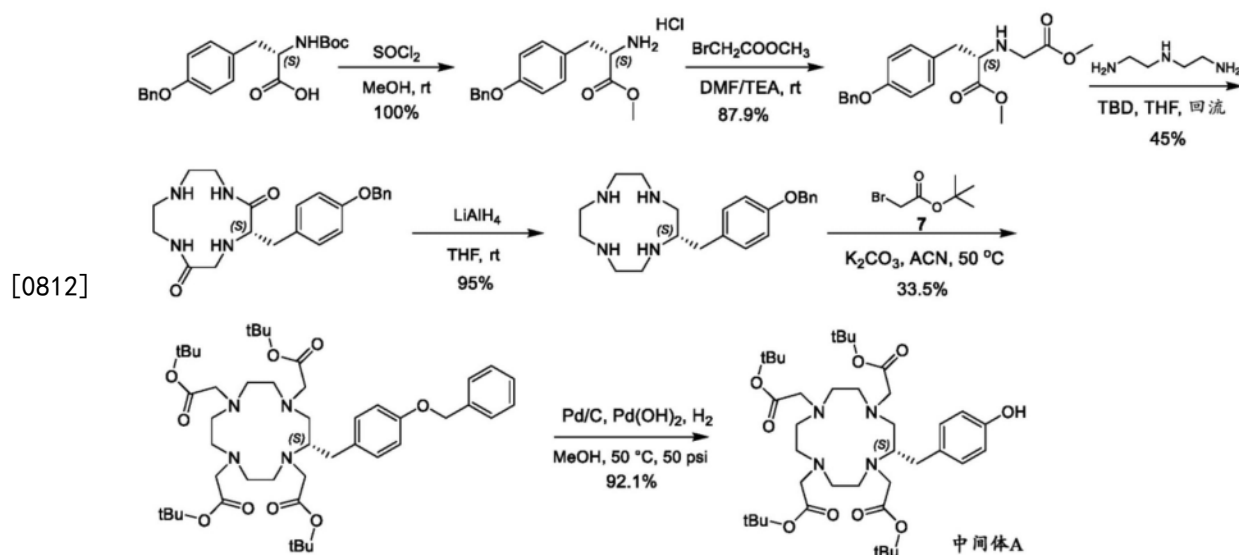
[0807] Et₂O-(二乙基)醚

[0808] DMF-N,N-二甲基甲酰胺

[0809] DIPEA-N,N-二异丙基乙胺

[0810] MeOH-甲醇

[0811] 实施例1. 中间体A的合成



[0813] (S)-2-氨基-3-(4-(苄氧基)苯基)丙酸甲酯盐酸盐的制备

[0814] 在0℃向((S)-3-(4-(苄氧基)苯基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸(50.0g, 136mmol)在甲醇(200mL)中的溶液中添加亚硫酰氯(19.2g, 162mmol)。将反应升温至25℃, 并且搅拌16h并在真空中浓缩至干,以得到呈白色固体的粗品(S)-2-氨基-3-(4-(苄氧基)苯基)丙酸甲酯盐酸盐(43.0g, 100%产率)。将该粗产物不经纯化直接用于下一步骤。 m/z 实测值=286.3(M+H)。

[0815] (S)-3-(4-(苄氧基)苯基)-2-((2-甲氧基-2-氧代乙基)氨基)丙酸甲酯的制备

[0816] 向(S)-2-氨基-3-(4-(苄氧基)苯基)丙酸甲酯盐酸盐(43.0g, 134mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(200mL)中的溶液中添加2-溴乙酸甲酯(45.0g, 294mmol)和三乙胺(40.6g, 401mmol)。将反应在25℃搅拌16h并在真空中浓缩。将残余物在乙酸乙酯(200mL)与水(200mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将

残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,0-40%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈黄色油状物的(S)-3-(4-(苄氧基)苄基)-2-((2-甲氧基-2-氧代乙基)氨基)丙酸甲酯(42.0g,87.9%产率)。 m/z 实测值=358.2(M+H)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ =7.45-7.37(m, 5H), 7.13-7.11(m, 2H), 6.93-6.91(m, 2H), 5.05(s, 2H), 3.69(s, 3H), 3.67(s, 3H), 3.57-3.55(m, 1H), 3.46-3.33(m, 2H), 2.98-2.93(m, 2H)。

[0817] (S)-3-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮的制备

[0818] 将(S)-3-(4-(苄氧基)苄基)-2-((2-甲氧基-2-氧代乙基)氨基)丙酸甲酯(5.00g, 14.0mmol)、N'-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺(1.44g, 14.0mmol)和2,3,4,6,7,8-六氢-1H-嘧啶并[1,2-a]嘧啶(487mg, 3.50mmol)在四氢呋喃(140mL)中的溶液在75℃在氮气气氛下搅拌16h。冷却至室温后,将反应混合物过滤。将收集的固体干燥,以得到呈白色固体的(S)-3-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮(2.50g, 45%产率)。 m/z 实测值=397.0(M+H)。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =7.79(s, 1H), 7.45-7.32(m, 5H), 7.12-7.10(m, 2H), 7.92-6.90(m, 2H), 5.05(s, 2H), 3.37-2.74(m, 13H), 2.52-2.49(m, 3H)。

[0819] (S)-2-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷的制备

[0820] 在0℃向氢化铝锂(5.74g, 151mmol)在四氢呋喃(180mL)中的悬浮液中添加(S)-3-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮(10.00g, 25.2mmol)。将反应混合物升温至25℃并在氮气气氛下搅拌16h。在氮气气氛下,通过添加氢氧化钠(15%水溶液, 6mL)和水(18mL)淬灭反应。将所得混合物搅拌30min并通过短硅藻土垫过滤。将全部挥发物在减压下去除,并将残余物用甲醇和二氯甲烷(甲醇/二氯甲烷=1:10, 400mL)稀释并过滤。将滤液浓缩,以获得呈黄色固体的粗品(S)-2-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(8.6g, 95%产率)。 m/z 实测值=397.0(M+H)。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =7.45-7.32(m, 5H), 7.11-7.09(m, 2H), 6.91-6.89(m, 2H), 5.05(s, 2H), 3.38-2.59(m, 7H), 2.36-1.99(m, 14H)。

[0821] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

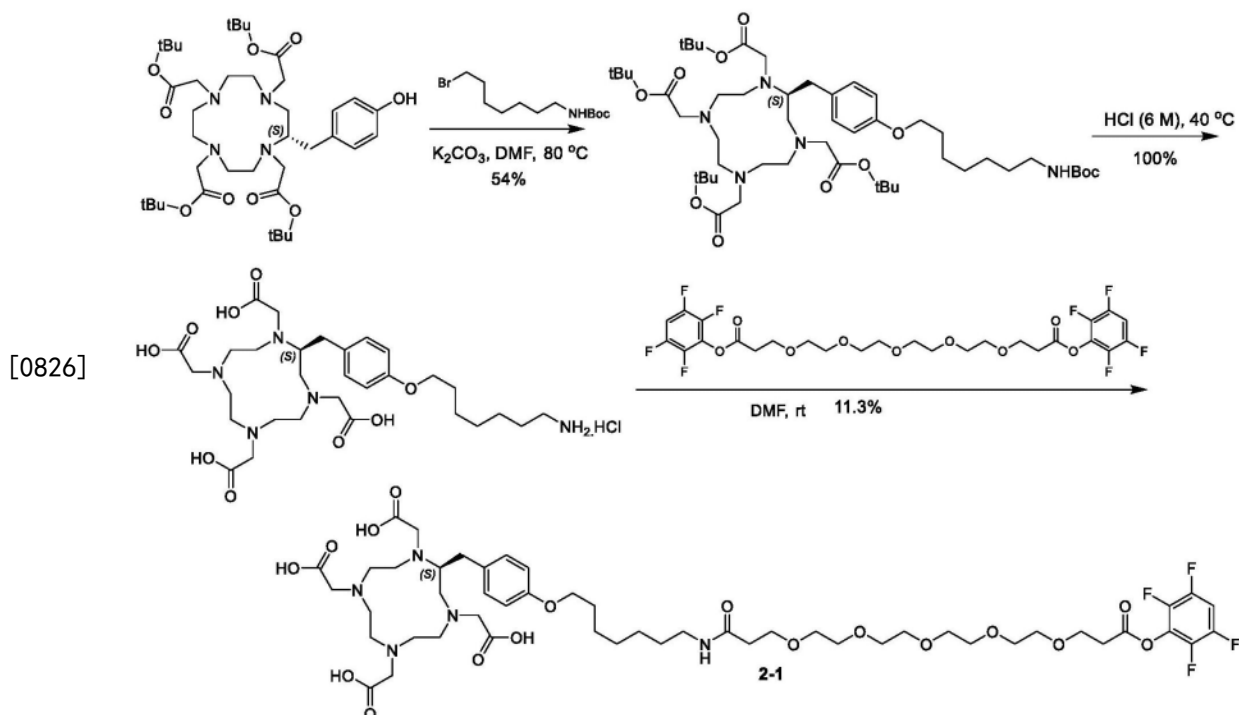
[0822] 向(S)-2-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(4.0g, 10.9mmol)在乙腈(120mL)中的混合物中添加碳酸钾(14.3g, 103mmol)和2-溴乙酸叔丁酯(10.6g, 54.27mmol)。将反应混合物在50℃搅拌16h。冷却至室温后,将反应混合物通过短硅藻土垫过滤。将滤液在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(Al_2O_3 , 0至3%在二氯甲烷中的甲醇)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(4.0g, 33.5%产率)。 m/z 实测值=825.5(M+H)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ =7.43-7.36(m, 5H), 7.23-7.02(m, 2H), 6.92-6.89(m, 2H), 5.04-5.02(m, 2H), 3.45-2.53(m, 22H), 1.48-1.42(m, 36H)。

[0823] 化合物(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-羟基苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0824] 将(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(苄氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(10.0g, 12.12mmol)、20%氢氧化钡/碳(8.5g, 12.12mmol)和10%钡/碳(12.9g, 12.12mmol)在甲醇(300mL)中的混合物在50℃在氢气气氛(50psi)下搅拌24h。将反应混合物通过短硅藻土垫过滤。将滤液在真空中浓缩至干,以得到呈白色固体的(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-羟基苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸

四叔丁酯 (8.2g, 92.1% 产率)。m/z 实测值 = 735.5 (M+H)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 7.14-6.90 (m, 2H), 6.86-6.79 (m, 2H), 5.04-5.03 (m, 1H), 3.67-2.67 (m, 23H), 1.53-1.42 (m, 36H)。

[0825] 实施例2. 化合物2-1



[0827] 4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酸双(2,3,5,6-四氟苯基)酯的制备

[0828] 向4,7,10,13,16-五氧杂十九烷二酸 (3.70g, 10.9mmol) 在二氯甲烷 (40mL) 中的溶液中添加 N¹-((乙基亚氨基)亚甲基)-N³, N³-二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐 (4.19g, 21.9mmol) 和 2,3,5,6-四氟苯酚 (3.81g, 22.96mmol)。将混合物在 25℃ 搅拌 2h 并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法 (硅胶, 100-200 目, 5%-50% 在石油醚中的乙酸乙酯) 纯化, 以得到呈黄色油状物的 4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酸双(2,3,5,6-四氟苯基)酯 (1.4g, 20.2% 产率)。

[0829] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-((叔丁氧基羰基)氨基)庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0830] 向 (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-羟基苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯 (500mg, 680μmol) 在 N,N-二甲基甲酰胺 (10mL) 中的混合物中添加碳酸钾 (940mg, 6.80mmol) 和 (7-溴庚基)氨基甲酸叔丁酯 (2g, 6.80mmol)。将反应混合物在 80℃ 搅拌 16h。冷却后, 将反应混合物用乙酸乙酯 (50mL) 稀释并过滤。将滤液用水 (2x 20mL)、盐水 (20mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法 (硅胶, 100-200 目, 0-7% 在二氯甲烷中的甲醇) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (350mg, 54.0% 产率)。m/z 实测值 = 948.6 (M+H)。

[0831] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氨基庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸盐酸盐的制备

[0832] 将 (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-((叔丁氧基羰基)氨基)庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯 (320mg, 337μmol) 在盐酸 (6M 在水中, 1.12mL, 6.72mmol) 中的溶液在 40℃ 搅拌 1h 并在减压下浓缩, 以得到呈黄色固体的粗品

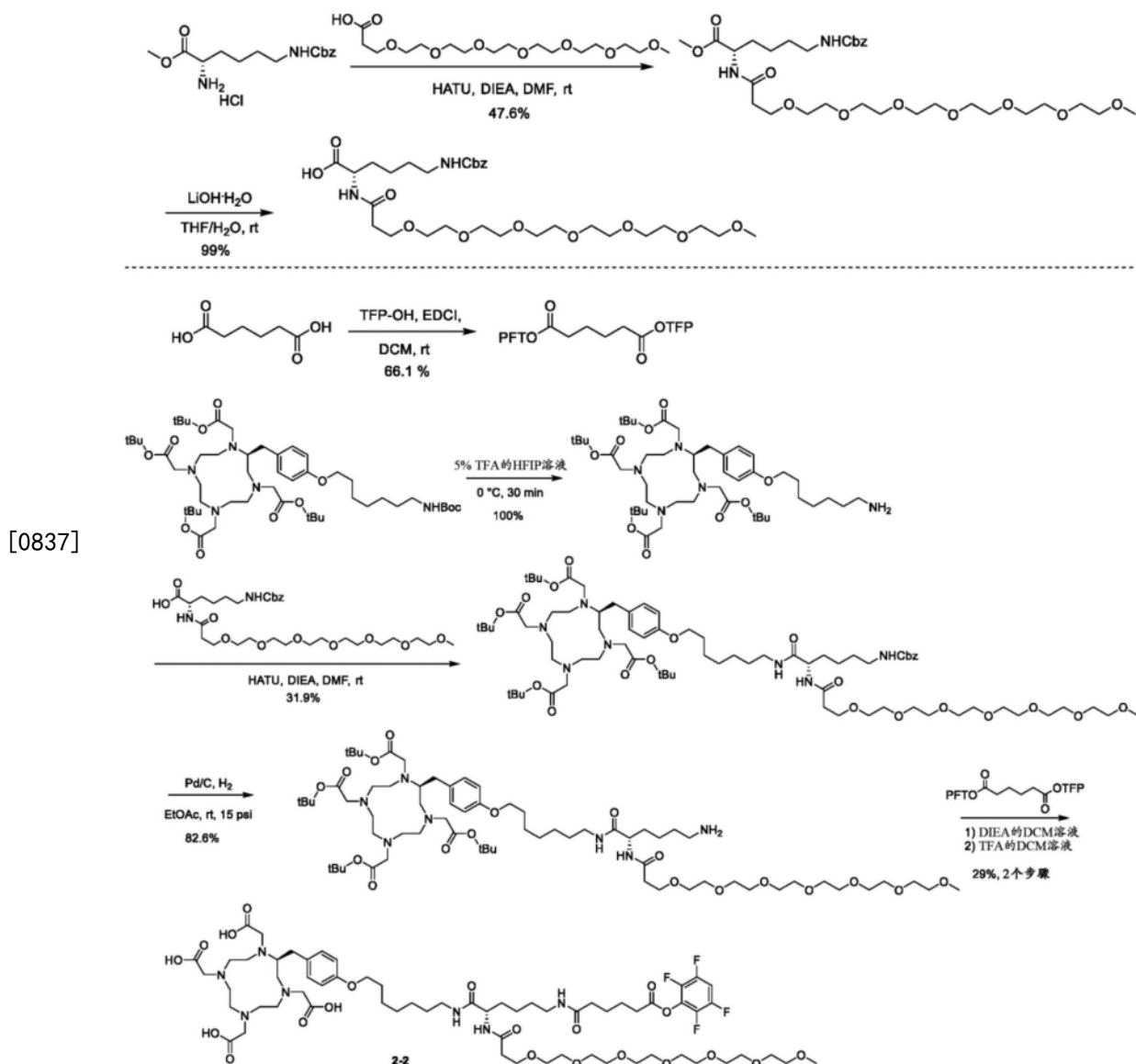
脱保护的胺产物 (220mg, 100% 产率)。将粗产物不经纯化直接用于下一步骤。 m/z 实测值 = 624.3 (M+H)。

[0833] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((1,19-二氧代-1-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-4,7,10,13,16-五氧杂-20-氮杂二十七烷-27-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0834] 向 (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氨基庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸 (220mg, 353 μ mol) 和 4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酸双(2,3,5,6-四氟苯基)酯 (224mg, 353 μ mol) 在二氯甲烷 (2.0mL) 中的搅拌混合物中添加 N,N-二异丙基乙胺 (228mg, 1.76mmol)。将反应混合物在 25℃ 搅拌 0.5h 并浓缩至干。将残余物通过制备型 HPLC (30%-60% MeCN/水+0.1% FA) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物 2-1) (51.0mg, 11.3% 产率)。 m/z 实测值 = 547.0 (M+2H/2)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.00-7.93 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.14-7.12 (m, 2H), 6.85-6.83 (m, 2H), 3.91

[0835] -3.77 (m, 1H), 3.58-3.49 (m, 25H), 3.04-2.93 (m, 17H), 2.30-2.27 (m, 4H), 1.68 (s, 2H), 1.40-1.29 (m, 10H)。

[0836] 实施例 3. 化合物 2-2



[0838] (S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23-氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24-氮杂二十六烷-26-酸甲酯的制备

[0839] 向(S)-2-氨基-6-(((苄氧基)羰基)氨基)己酸甲酯盐酸盐(1.19g,3.58mmol)、2,5,8,11,14,17,20-七氧杂二十三烷-23-酸(1.20g,3.26mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(8.0mL)中的混合物中添加HATU(1.49g,3.91mmol)和N,N-二异丙基乙胺(1.26g,9.77mmol)。将反应混合物在25℃搅拌1h并在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC(水(FA)-ACN 30%-60%)纯化,以得到呈无色油状物的(S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23-氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24-氮杂二十六烷-26-酸甲酯(1.0g,47.6%产率)。LCMS(方法5-95AB,ESI): $R_T=0.738\text{min}$, $[M+H]^+/m/z$ 实测值=645.3。

[0840] (S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23-氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24-氮杂二十六烷-26-酸化合物的制备

[0841] 向(S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23-氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24-氮杂二十六烷-26-酸甲酯(1.0g,1.55mmol)在水(3mL)和四氢呋喃(6mL)中的溶液中添加一水氢氧化锂(78.1mg,1.86mmol)。将反应混合物在25℃搅拌1h,并然后用盐酸水溶液

(1M) 调节至pH=6。将混合物在真空中浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(100mL) 与水(100mL) 之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL) 洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈无色油状物的粗品(S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23-氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24-氮杂二十六烷-26-酸(970mg,99%产率)。LCMS(方法5-95AB,ESI): $R_T=0.699\text{min}$, $[M+H]^+m/z$ 实测值=631.3。

[0842] 双(2,3,5,6-四氟苯基)己二酸酯的制备

[0843] 在0℃向己二酸(100mg,684 μmol)和 N^1 -((乙基亚氨基)亚甲基)- N^3 , N^3 -二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐(321mg,1.68mmol)在二氯甲烷(3.0mL)中的溶液中添加2,3,5,6-四氟苯酚(250mg,1.51mmol)。将混合物在25℃搅拌2h并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,10%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈白色固体的双(2,3,5,6-四氟苯基)己二酸酯(200mg,66.1%产率)。

[0844] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氨基庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0845] 在0℃向(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-((叔丁氧基羰基)氨基)庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(750mg,791 μmol) 在六氟异丙醇(8mL)中的溶液中添加三氟乙酸(902mg,7.91mmol)。将反应混合物搅拌30min并在真空中浓缩至干,以得到呈黄色固体的粗品(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氨基庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(760mg,100%产率)。将粗产物不经进一步纯化而直接用于下一步骤。LCMS(方法5-95AB,ESI): $R_T=0.740\text{min}$, $[M+H]^+m/z$ 实测值=848.6。2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-(((S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23,26-二氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24,27-二氮杂三十四烷-34-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0846] 向(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氨基庚基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(760mg,790 μmol)、(S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23-氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24-氮杂二十六烷-26-酸(548mg,869 μmol) 在N,N-二甲基甲酰胺(2mL)中的溶液中添加HATU(360mg,948 μmol)和N,N-二异丙基乙胺(510mg,3.95mmol)。将反应混合物在25℃搅拌1h并在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC(33%-63% MeCN/水+0.1% FA)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(400mg,31.9%产率)。 m/z 实测值=731.4($M+2H/2$)。

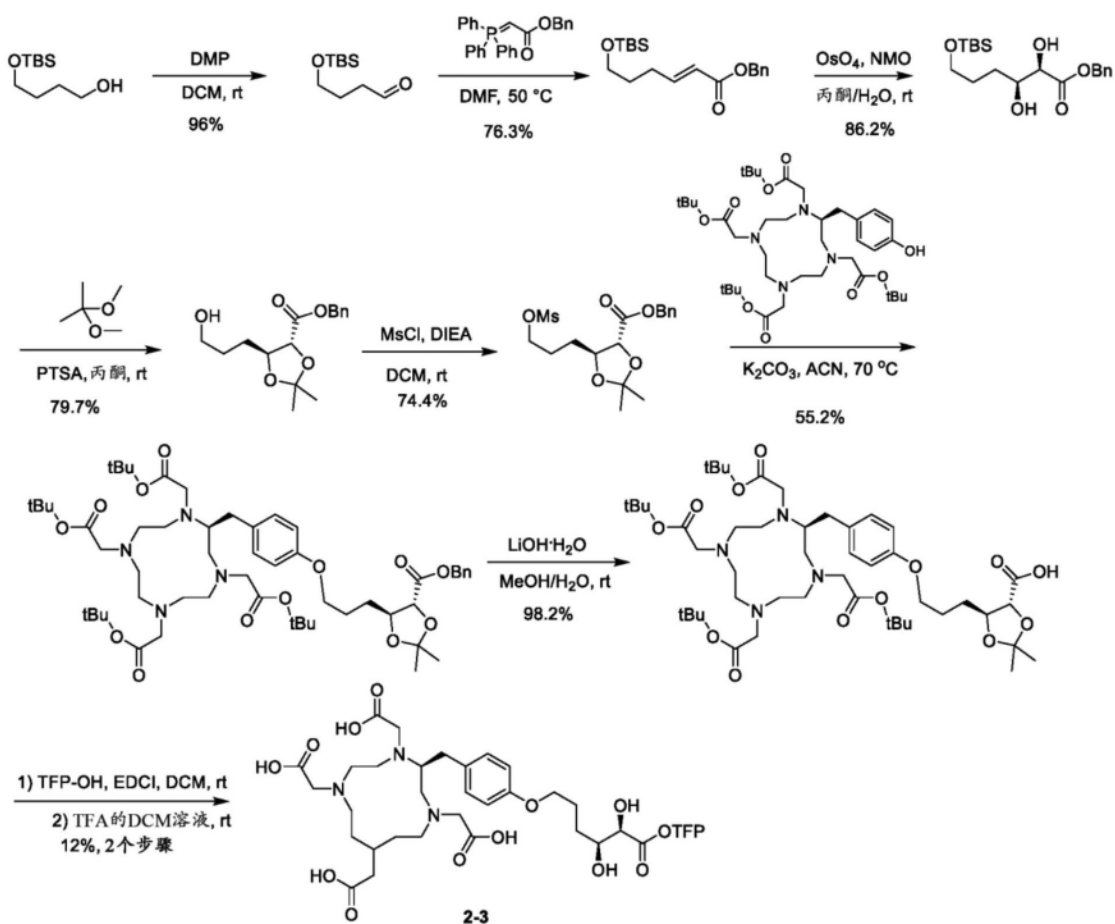
[0847] 2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-(((S)-25-(4-氨基丁基)-23,26-二氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24,27-二氮杂三十四烷-34-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0848] 将2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-(((S)-25-(4-(((苄氧基)羰基)氨基)丁基)-23,26-二氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24,27-二氮杂三十四烷-34-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(400mg,0.27mmol)、20%氢氧化钡/碳(192mg,0.27mmol)和10%钡/碳(291mg,0.27mmol)在乙酸乙酯(10mL)中的混合物在25℃在氢气气氛(15psi)下搅拌16h。将反应混合物通过短硅藻土垫过滤。将滤液在真空中浓缩,以得到呈黄色油状物的粗游离胺中间体(300mg,82.6%)。将粗产物不经纯化直接用于下一步骤。 m/z 实测值=664.4($M+2H/2$)。

[0849] 2,2',2'',2'''-(S)-2-(4-(((S)-23,26-二氧代-25-(4-(6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己酰胺基)丁基)-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24,27-二氮杂三十四烷-34-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0850] 向2,2',2'',2'''-(S)-2-(4-(((S)-25-(4-氨基丁基)-23,26-二氧代-2,5,8,11,14,17,20-七氧杂-24,27-二氮杂三十四烷-34-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(300mg,226 μ mol)在N,N-二甲基甲酰胺(6.0mL)中的溶液中添加双(2,3,5,6-四氟苯基)己烷二酸酯(200mg,452 μ mol)和N,N-二异丙基乙胺(102mg,791 μ mol)。将反应混合物在25℃搅拌1h。冷却至0℃后,将反应混合物用乙酸乙酯(100mL)稀释并过滤。将滤液用水(2x 20mL)、盐水(20mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色油状物的粗中间体。 m/z 实测值=802.5(M+2H/2)。向以上粗中间体在二氯甲烷(2mL)中的溶液中添加三氟乙酸(4mL)。将反应混合物在30℃搅拌16h并在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC(20%-50% MeCN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-2)(90.0mg,29.1%产率)。 m/z 实测值=690.1(M+2H)。¹H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ =7.98-7.91(m,2H),7.83-7.78(m,2H),7.17-7.16(m,2H),6.86-6.84(m,2H),4.18-4.16(m,1H),3.91-3.90(m,5H),3.57-3.40(m,3H),3.23(s,4H),3.07-2.98(m,11H),2.77-2.76(m,5H),2.41-2.32(m,4H),2.11-2.07(m,2H),1.69-1.58(m,8H),1.38-1.27(m,14H)。

[0851] 实施例4.化合物2-3



[0853] 4-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)丁醛的制备

[0854] 向4-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)丁烷-1-醇(2.0g, 9.79mmol)在二氯甲烷(20mL)中的溶液中添加戴斯-马丁高碘烷(5.0g, 11.7mmol)。将混合物在25℃搅拌2h,并然后在二氯甲烷(200mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,5%-10%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(1.9g, 96.0%产率)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ=9.74(s, 1H), 3.62-3.59(m, 2H), 2.47-2.46(m, 2H), 1.83-1.80(m, 2H), 0.84(s, 9H), 0.0(s, 6H)。

[0855] (E)-6-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)己-2-烯酸苄酯的制备

[0856] 向4-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)丁醛(300mg, 1.48mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液中添加2-(三苯基正亚膦基(phosphoranylidene))乙酸苄酯(791mg, 1.93mmol)。将混合物在50℃搅拌24h,并然后在乙酸乙酯(100mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-10%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(380mg, 76.3%产率)。

[0857] (rac-2R,3S)-6-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-2,3-二羟基己酸苄酯的制备

[0858] 向(E)-6-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)己-2-烯酸苄酯(6.0g, 17.9mmol)在水(50mL)和丙酮(50mL)中的溶液中添加钨酸钾(341mg, 1.79mmol)。将反应在25℃搅拌16h,并然后在乙酸乙酯(300mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-20%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(5.7g, 86.2%产率)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ=7.34-7.26(m, 5H), 5.24-5.15(m, 2H), 4.07-3.91(m, 1H), 3.90-3.88(m, 1H), 3.65-3.53(m, 2H), 3.03-2.96(s, 2H), 1.69-1.61(m, 4H), 0.83(s, 9H), 0.0(s, 6H)。

[0859] (rac-4R,5S)-5-(3-羟丙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲酸苄酯的制备

[0860] 将(rac-2R,3S)-6-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-2,3-二羟基己酸苄酯(5.5g, 14.92mmol)、2,2-二甲氧基丙烷(4.66g, 44.77mmol)和4-甲苯磺酸(514mg, 2.98mmol)在丙酮(50mL)中的混合物在20℃搅拌16h。将混合物用饱和碳酸氢钠(30mL)淬灭并用乙酸乙酯(3x 100mL)萃取。将合并的有机层经无水硫酸钠干燥并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(硅胶,0-50%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈淡色油状物的标题化合物(3.50g, 79.7%产率)。

[0861] (rac-4R,5S)-2,2-二甲基-5-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)-1,3-二氧戊环-4-甲酸苄酯的制备

[0862] 在0℃向(rac-4R,5S)-5-(3-羟丙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲酸苄酯(3.40g, 11.6mmol)和N,N-二异丙基乙胺(2.99g, 23.1mmol)在二氯甲烷(30mL)中的溶液中添加甲磺酰氯(2.06g, 18.0mmol)。将混合物在20℃搅拌1h,并然后在二氯甲烷(200mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-30%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈淡黄色油状物的标题化合物(3.2g, 74.4%产率)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ=7.43-7.30(m, 5H), 5.23-5.20(m, 2H), 4.30-4.22(m, 2H), 4.20-4.10(m, 2H), 2.98(s, 3H), 1.98-1.72(m, 4H), 1.46(s, 3H), 1.42(s, 3H)。

[0863] 2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-(3-((rac-4S,5R)-5-((苄氧基)羰基)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0864] 将中间体A (500mg, 680.31 μ mol)、(rac-4R,5S)-2,2-二甲基-5-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)-1,3-二氧戊环-4-甲酸苄酯 (633mg, 1.70mmol) 和碳酸钾 (282mg, 2.04mmol) 在乙腈 (8mL) 中的混合物在70℃搅拌16h。冷却后,将反应混合物在乙酸乙酯 (100mL) 与水 (100mL) 之间分配。将分离的有机层用盐水 (50mL) 洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法 (0-5% 甲醇/二氯甲烷) 纯化,以得到呈白色固体的标题化合物 (380mg, 55.2% 产率)。m/z 实测值=1011.6 (M+H)。

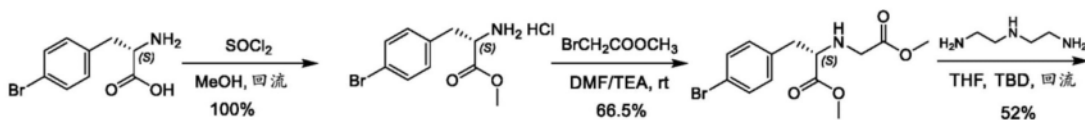
[0865] (rac-4R,5S)-2,2-二甲基-5-(3-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)-1,3-二氧戊环-4-甲酸的制备

[0866] 向2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-(3-((rac-4S,5R)-5-((苄氧基)羰基)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯 (380mg, 376 μ mol) 在甲醇 (10mL) 和水 (2mL) 中的溶液中添加一水氢氧化锂 (55.2mg, 1.32mmol)。将混合物在20℃搅拌3h并浓缩。将残余物用水 (10mL) 稀释并用盐酸水溶液 (1M) 调节至pH=5。将所得溶液用乙酸乙酯 (3x 50mL) 萃取。将合并的有机层经无水硫酸钠干燥并在真空中浓缩,以得到呈白色固体的标题化合物 (340mg, 98.2% 产率) 并不经纯化直接用于下一步骤。m/z 实测值=921.6 (M+H)。

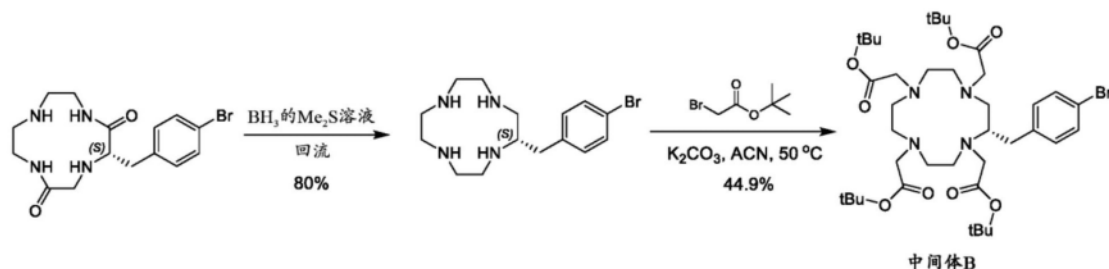
[0867] 2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-(((rac-4S,5R)-4,5-二羟基-6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0868] 将(rac-4R,5S)-2,2-二甲基-5-(3-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)-1,3-二氧戊环-4-甲酸 (230mg, 250 μ mol)、2,3,5,6-四氟苯酚 (53.9mg, 325 μ mol) 和N¹-((乙基亚氨基)亚甲基)-N³, N³-二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐 (62.2mg, 325 μ mol) 在二氯甲烷 (4.0mL) 中的混合物在20℃搅拌1h。将混合物用二氯甲烷 (150mL) 稀释,用水 (50mL) 洗涤,经无水硫酸钠干燥并在真空中浓缩,以得到呈淡黄色油状物的粗TFP中间体。m/z 实测值=1069.6 (M+H)。将粗中间体在二氯甲烷 (2mL) 和三氟乙酸 (4mL) 中的溶液在30℃搅拌7h并浓缩至干。将残余物通过制备型 HPLC (16%-36% MeCN/水+0.1% TFA) 纯化,以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物2-3) (25.5mg, 12.0% 产率)。m/z 实测值=805.2 (M+H)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ =8.02-7.87 (m, 1H), 7.16 (d, J=7.2Hz, 2H), 6.86 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.96 (brs, 1H), 5.03 (brs, 1H), 4.50 (brs, 1H), 4.05-3.89 (m, 4H), 3.24-2.68 (m, 23H), 2.43-2.34 (m, 1H), 1.90-1.57 (m, 4H)。

[0869] 实施例5. 中间体B



[0870]



[0871] (S)-2-氨基-3-(4-溴苄基)丙酸甲酯盐酸盐的制备

[0872] 向(S)-2-氨基-3-(4-溴苄基)丙酸(30.0g,122.91mmol)在甲醇(500mL)中的溶液中添加亚硫酰氯(29.2g,246mmol)。将反应混合物在80℃在氮气气氛下搅拌2h并浓缩,以获得呈黄色固体的粗品(S)-2-氨基-3-(4-溴苄基)丙酸甲酯盐酸盐(36.2g,100%产率)。m/z实测值=260.0(M+H)。¹H NMR(400MHz,MeOH-d₄) δ=7.53(d,J=8.0Hz,2H),7.20(d,J=8.0Hz,1H),4.35-4.31(m,1H),3.81(s,3H),3.23-3.14(m,2H)。

[0873] (S)-2-氨基-3-(4-溴苄基)丙酸甲酯盐酸盐的制备

[0874] 向(S)-2-氨基-3-(4-溴苄基)丙酸甲酯盐酸盐(005-2)(20.0g,77.5mmol)和三乙胺(23.5g,232mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(250mL)中的溶液中添加2-溴乙酸甲酯(29.6g,194mmol)。将反应混合物在25℃在氮气气氛下搅拌16h。冷却后,将反应混合物用乙酸乙酯(500mL)稀释并过滤。将滤液用水(2x 200mL)、盐水(200mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(10%-20%乙酸乙酯/石油醚),以得到呈淡色油状物的标题化合物(17g,66.5%产率)。m/z实测值=331.7(M+H)。¹H NMR(400MHz,MeOH-d₄) δ=7.43(d,J=8.8Hz,2H),7.13(d,J=8.8Hz,2H),3.70(s,3H),3.65-3.61(m,4H),3.44-3.37(m,2H),2.96(d,J=7.2Hz,2H)。

[0875] (S)-3-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮的制备

[0876] 向(S)-2-氨基-3-(4-溴苄基)丙酸甲酯盐酸盐(1.70g,5.15mmol)和N'-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺(637.0mg,6.18mmol)在四氢呋喃(30mL)中的溶液中添加3,4,6,7,8,9-六氢-2H-嘧啶并[1,2-a]嘧啶(215.0mg,1.54mmol)。将混合物在75℃在氮气气氛下搅拌12h。冷却后,将混合物用乙酸乙酯(30mL)稀释并过滤。将收集的固体用甲醇(10mL)洗涤并干燥,以得到呈白色固体的粗品(S)-3-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮(1.02g,52%产率)。m/z实测值=370.9(M+H)。¹H NMR(400MHz,MeOH-d₄) δ=7.45(d,J=8.4Hz,2H),7.17(d,J=8.4Hz,2H),3.54(d,J=16.4Hz,1H),3.50-3.37(m,2H),3.27-3.17(m,2H),3.02-2.94(m,3H),2.83-2.74(m,3H),2.66-2.57(m,2H)。

[0877] (S)-2-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷的制备

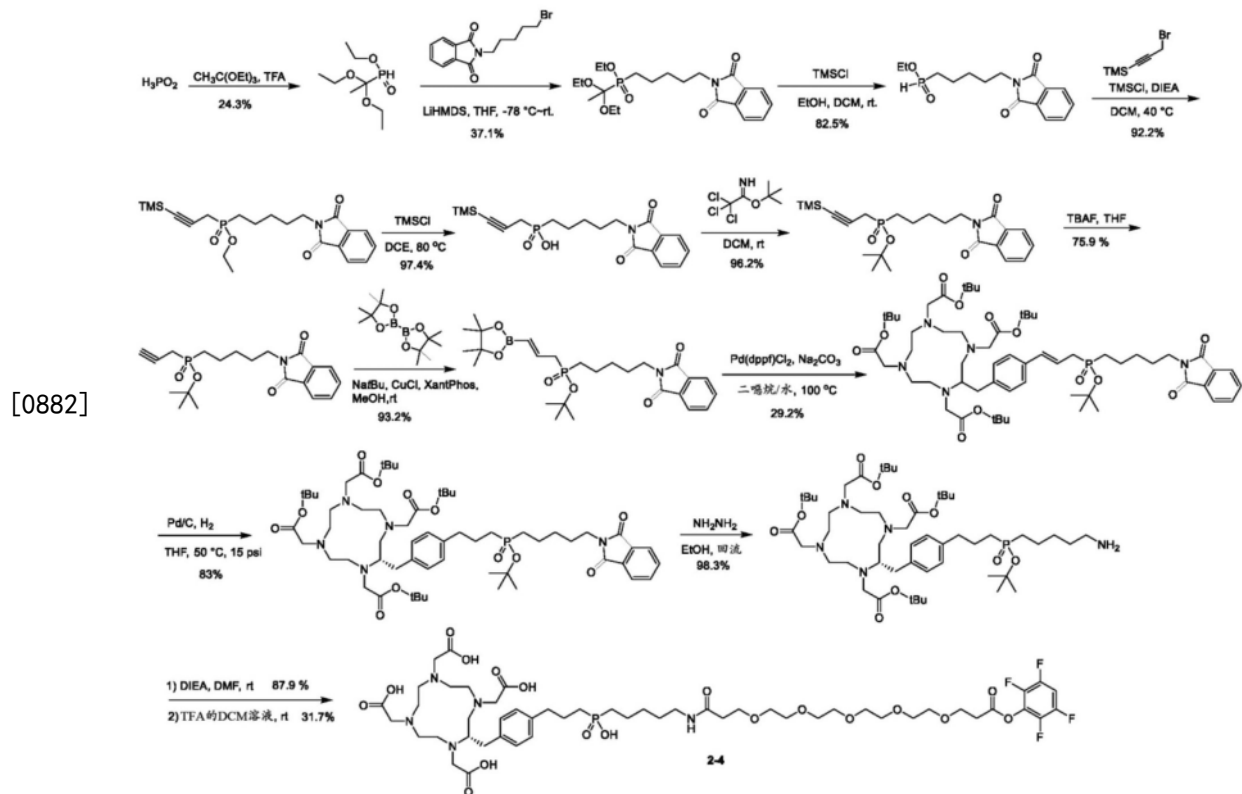
[0878] 向化合物(S)-3-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮(1.0g,2.71mmol)在四氢呋喃(200mL)中的溶液中缓慢添加BH₃-Me₂S(10M,8.1mL 81.3mmol)。将混合物在80℃在氮气气氛下搅拌16h。冷却后,将反应通过甲醇(15mL)淬灭并浓缩。将残余物用水(30mL)和浓盐酸(30mL)稀释。将混合物在100℃搅拌14h,并然后通过添加饱和碳酸钠

水溶液调节至pH=7。将全部挥发物在减压下去除。将残余物用甲醇和二氯甲烷(甲醇/二氯甲烷=1:10,100mL)稀释并过滤。将滤液浓缩,以获得呈白色固体的粗化合物(S)-2-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(0.86g,80%产率)。将粗产物不经纯化而用于下一步骤。 m/z 实测值=342.8(M+H)。

[0879] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0880] 向(S)-2-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(2.0g,5.86mmol)和2-溴乙酸叔丁酯(6.86g,35.2mmol)在乙腈(50mL)中的溶液中添加碳酸钾(9.72g,70.3mmol)。将反应混合物在50℃在氮气气氛下搅拌16h。冷却后,将反应混合物在乙酸乙酯(200mL)与水(200mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物进一步通过制备型HPLC(30%-60%MeCN/水+0.2%甲酸)纯化,以得到呈黄色固体的标题化合物(2.1g,44.9%产率)。 m/z 实测值=799.4(M+H)。 ^1H NMR(400MHz,MeOH- d_4) δ =7.46(d,J=7.6Hz,2H),7.21(d,J=8.0Hz,2H),4.19-3.44(m,11H),3.13-2.53(m,13H),1.53-1.40(m,36H)。

[0881] 实施例6.化合物2-4



[0883] (1,1-二乙氧基乙基)次膦酸乙酯的制备

[0884] 在0℃在氮气下,将三氟乙酸(8.91g,78.2mmol)、随后1,1,1-三乙氧基乙烷(145.79g,898.7mmol)添加到氧卑膦酸(25.00g,391.0mmol)中。将反应混合物在20℃搅拌2h并浓缩。将残余物用二氯甲烷(200mL)稀释,用饱和碳酸氢钠(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物在80℃在4mm Hg下蒸馏,以得到呈淡色油状物的(1,1-二乙氧基乙基)次膦酸乙酯(20.0g,24.3%产率)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ =7.61(s,0.5H),6.25(s,0.5H),4.28-4.13(m,2H),3.81-3.59(m,4H),1.48(d,J=12.4Hz,3H),1.37(t,J=7.2Hz,

3H), 1.26-1.15 (m, 6H)。

[0885] (1,1-二乙氧基乙基) (5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) 次膦酸乙酯的制备

[0886] 在-78℃向(1,1-二乙氧基乙基)次膦酸乙酯(20.0g, 95.14mmol)在四氢呋喃(200mL)中的溶液中逐滴添加LiHMDS(1.0M在四氢呋喃中, 114.2mL, 114.2mmol)。将混合物在-78℃搅拌20min, 然后逐滴添加2- (5-溴戊基) 异吲哚啉-1,3-二酮(28.2g, 95.1mmol)在四氢呋喃(200mL)中的溶液。添加后, 将混合物在20℃搅拌16h并通过添加饱和氯化铵水溶液(200mL)而淬灭。将混合物用乙酸乙酯(3x 200mL)萃取。将合并的有机层经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶, 100-200目, 0-100%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化, 以得到呈淡色油状物的(1,1-二乙氧基乙基) (5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) 次膦酸乙酯(15.0g, 37.1%产率)。m/z实测值=425.0 (M+H)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ=7.87-7.82 (m, 2H), 7.74-7.69 (m, 2H), 4.28-4.10 (m, 2H), 3.79-3.59 (m, 6H), 1.78-1.62 (m, 7H), 1.51-1.45 (m, 4H), 1.30 (t, J=6.8Hz, 3H), 1.20 (dt, J=1.6, 7.2Hz, 6H)。

[0887] (5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) 次膦酸乙酯的制备

[0888] 在氮气下, 向(1,1-二乙氧基乙基) (5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) 次膦酸乙酯(15.0g, 35.26mmol)在二氯甲烷(150mL)和乙醇(20mL)中的溶液中添加三甲基氯硅烷(8.4g, 9.84mL)。将混合物在20℃搅拌16h, 并然后用饱和氯化铵水溶液(100mL)淬灭。将所得混合物浓缩, 并将残余物用乙酸乙酯(3x 100mL)萃取。将合并的有机层经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶, 100-200目, 0-5%在二氯甲烷中的甲醇)纯化, 以得到呈无色油状物的(5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) 次膦酸乙酯(9.0g, 82.5%产率)。m/z实测值=309.9 (M+H)。

[0889] (5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) (3- (三甲基甲硅烷基) 丙-2-炔-1-基) 次膦酸乙酯的制备

[0890] 向(5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) 次膦酸乙酯(8.8g, 28.5mmol)和N,N-二异丙基乙胺(11.0g, 85.4mmol)在二氯甲烷(100mL)中的溶液中逐滴添加三甲基氯硅烷(9.3g, 85.4mmol)。将反应混合物在20℃搅拌1.5h, 然后添加(3-溴丙-1-炔-1-基)三甲基硅烷(8.2g, 42.7mmol)。将混合物在40℃搅拌16h, 并然后在二氯甲烷(100mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶, 100-200目, 5%-30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化, 以得到呈红色油状物的标题化合物(11.0g, 92.2%产率)。m/z实测值=420.0 (M+H)。

[0891] (5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) (3- (三甲基甲硅烷基) 丙-2-炔-1-基) 次膦酸的制备

[0892] 在氮气下, 向(5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) (3- (三甲基甲硅烷基) 丙-2-炔-1-基) 次膦酸乙酯(11.0g, 26.2mmol)在二氯甲烷(110mL)中的溶液中添加三甲基氯硅烷(10.0g, 91.8mmol)。将混合物在80℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(300mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(100mL)洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶, 100-200目, 30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化, 以得到呈红色油状物的(5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) (3- (三甲基甲硅烷基) 丙-2-炔-1-基) 次膦酸(10.0g, 97.4%产率)。m/z实测值=392.0 (M+H)。

[0893] (5- (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) (3- (三甲基甲硅烷基) 丙-2-炔-1-基) 次膦

酸叔丁酯的制备

[0894] 将(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)(3-(三甲基甲硅烷基)丙-2-炔-1-基)次膦酸(10.0g, 25.5mmol)和2,2,2-三氯乙酰亚胺叔丁酯(22.3g, 102mmol)在二氯甲烷(100mL)中的混合物在20℃搅拌16h并过滤。将滤液浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(300mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈红色油状物的标题化合物(11.0g, 96.2%产率)。m/z实测值=470.1 (M+Na)。

[0895] (5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)(丙-2-炔-1-基)次膦酸叔丁酯的制备

[0896] 向(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)(3-(三甲基甲硅烷基)丙-2-炔-1-基)次膦酸叔丁酯(11.0g, 24.6mmol)在四氢呋喃(110mL)中的溶液中添加四丁基氟化铵(1.0M在四氢呋喃中, 61.5mL, 61.5mmol)。将混合物在20℃搅拌3h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(0-60%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(7.0g, 75.9%产率)。m/z实测值=398.0 (M+Na)。

[0897] (E)-(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)烯丙基)次膦酸叔丁酯的制备

[0898] 将叔丁醇钠(153.6mg, 1.60mmol)、氯化亚铜(52.7mg, 0.53mmol)、(9,9-二甲基-9H-咕吨-4,5-二基)双(二苯基膦)(308.0mg, 0.53mmol)在四氢呋喃(15mL)中的混合物在20℃在氮气下搅拌30min,然后添加双(频哪醇合)二硼(1.76g, 6.93mmol)、随后添加(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)(丙-2-炔-1-基)次膦酸叔丁酯(2.00g, 5.33mmol)和甲醇(1.37g, 42.62mmol)。将混合物在20℃搅拌16h并过滤。将滤液浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(100mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,10%-50%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(2.5g, 93.2%产率)。m/z实测值=504.3 (M+Na)。

[0899] 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-((E)-3-(叔丁氧基(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)磷酰基)丙-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0900] 将(E)-(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)烯丙基)次膦酸叔丁酯(1.80g, 2.26mmol)、(E)-(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)(3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)烯丙基)次膦酸叔丁酯(2.27g, 4.51mmol)、Pd(dppf)Cl₂(330.15mg, 0.45mmol)和碳酸钠(0.72g, 6.77mmol)在二噁烷(15mL)和水(1.5mL)中的混合物在80℃搅拌4h并浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(50mL)与水(50mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(20mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(2-10%甲醇/二氯甲烷)纯化,以得到呈浅黄色油状物的标题化合物(0.72g, 29.2%产率)。m/z实测值=1095.0 (M+H)。

[0901] 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(叔丁氧基(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)磷酰基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0902] 将2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-((E)-3-(叔丁氧基(5-(1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)戊基)磷酰基)丙-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(720mg, 0.66mmol)、10%钨/碳(700mg, 0.66mmol)和20%氢氧化钨/碳(462mg,

0.66mmol) 在四氢呋喃 (20mL) 中的混合物在 50℃ 在氢气气氛 (15psi) 下搅拌 5h。将反应混合物过滤并将滤液浓缩至干, 以得到呈白色固体的粗化合物 (600mg, 83.2% 产率)。m/z 实测值 = 1096.7 (M+H)。

[0903] 2,2',2'',2''' - ((2S) - 2 - (4 - (3 - ((5-氨基戊基) (叔丁氧基) 磷酰基) 丙基) 苄基) - 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸四叔丁酯的制备

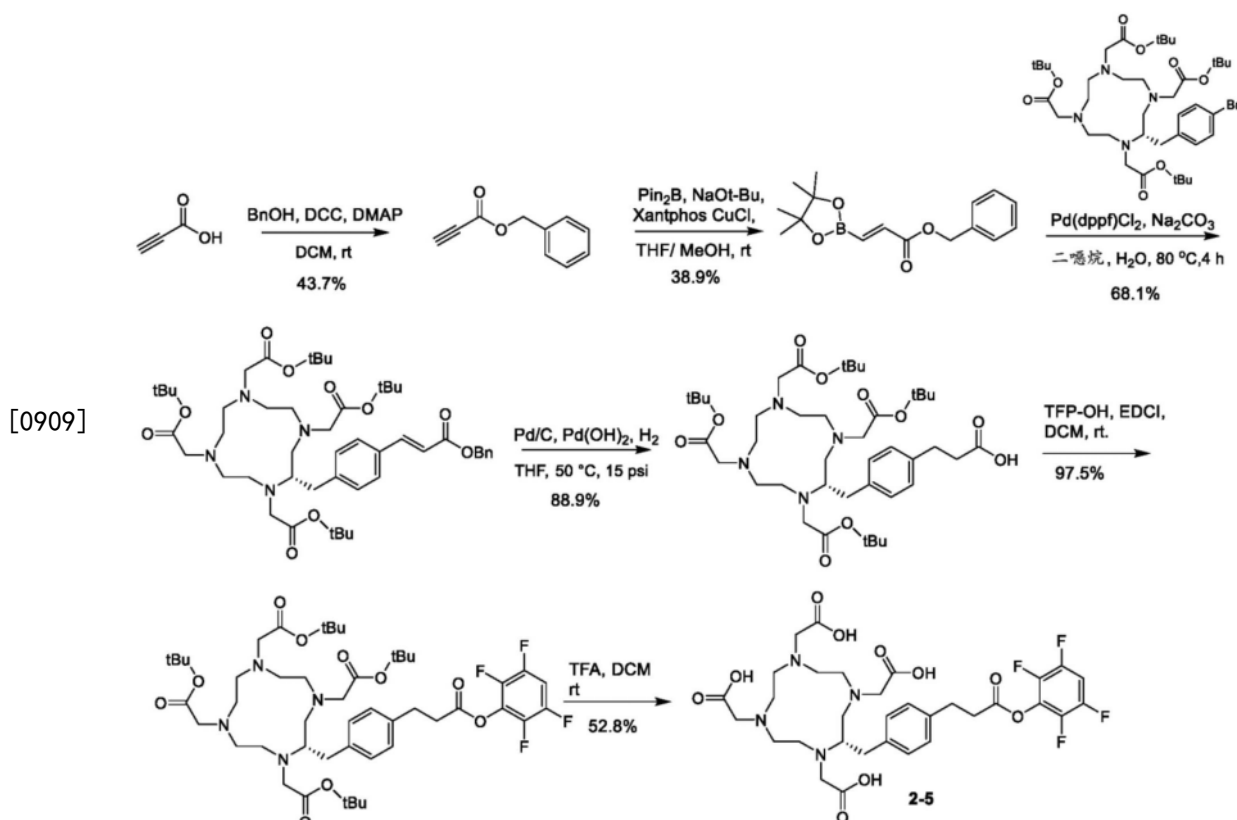
[0904] 将 2,2',2'',2''' - ((2S) - 2 - (4 - (3 - (叔丁氧基 (5 - (1,3-二氧代异吲哚啉-2-基) 戊基) 磷酰基) 丙基) 苄基) - 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸四叔丁酯 (300mg, 0.27mmol)、肼 (160mg, 4.24mmol) 在乙醇 (15mL) 中的混合物在 60℃ 搅拌 16h 并浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯 (50mL) 与水 (50mL) 之间分配。将分离的有机层用盐水 (20mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干, 以得到呈淡黄色固体的粗标题化合物 (260.0mg, 98.3% 产率)。m/z 实测值 = 966.7 (M+H)。

[0905] 2,2',2'',2''' - ((2S) - 2 - (4 - (3 - ((1,19-二氧代-1-(2,3,5,6-四氟苯氧基) - 4,7,10,13,16-五氧杂-20-氮杂二十五烷-25-基) (羟基) 磷酰基) 丙基) 苄基) - 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸的制备

[0906] 向 2,2',2'',2''' - ((2S) - 2 - (4 - (3 - ((5-氨基戊基) (叔丁氧基) 磷酰基) 丙基) 苄基) - 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸四叔丁酯 (230.0mg, 0.24mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (92.3mg, 0.71mmol) 在二氯甲烷 (6mL) 中的溶液中添加 4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酸双 (2,3,5,6-四氟苯基) 酯 (302.0mg, 0.48mmol)。将混合物在 20℃ 搅拌 1h 并用二氯甲烷 (100mL) 稀释。将混合物用水 (50mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩, 以得到呈淡黄色油状物的粗中间体。m/z 实测值 = 1435.0 (M+H)。

[0907] 将脱保护的中间体 (300.0mg, 0.21mmol) 在二氯甲烷 (2mL) 和三氟乙酸 (4mL) 中的溶液在 30℃ 搅拌 16h 并浓缩至干。将残余物通过制备型 HPLC 水 (13% - 43% ACN/水 + 0.1% TFA) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物 2-4) (76.5mg, 31.7% 产率)。m/z 实测值 = 578.0 (M+2H/2)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 7.98-7.92 (m, 1H), 7.82-7.79 (m, 1H), 7.21 (s, 4H), 3.97-3.57 (m, 9H), 3.56-3.54 (m, 9H), 3.53-3.47 (m, 16H), 3.04-3.01 (m, 16H), 2.30-2.26 (m, 2H), 1.87-1.84 (m, 2H), 1.36-1.22 (m, 11H)。

[0908] 实施例 7. 化合物 2-5



[0910] 丙炔酸苄酯的制备

[0911] 经1h,在0℃将4-二甲基氨基吡啶(3.5g,28.55mmol)和二环己基碳二亚胺(58.9g,0.29mmol)在二氯甲烷(200mL)中的溶液缓慢添加到丙-2-炔酸(20.0g,0.29mmol)和苄醇(31.5g,0.29mmol)在二氯甲烷(200mL)中的溶液中。将悬浮液在20℃搅拌12h并浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(500mL)与水(200mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(200mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-30%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈无色油状物的丙-2-炔酸苄酯(20.0g,43.7%产率)。

[0912] (E)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)丙烯酸苄酯的制备

[0913] 向氯化亚铜(278mg,2.81mmol)和叔丁醇盐(540mg,5.62mmol)、(9,9-二甲基-9H-咕吨-4,5-二基)双(二苯基膦)(1.63g,2.81mmol)和叔丁醇钠(540mg,5.62mmol)在四氢呋喃(100mL)中的混合物中添加双(频哪醇合)二硼(23.8g,93.70mmol),随后添加丙-2-炔酸苄酯(15.0g,93.70mmol)和甲醇(50mL)。将反应混合物在20℃搅拌12h并浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(100mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-30%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈无色油状物的标题化合物(10.5g,38.9%产率)。

[0914] (E)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(苄氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0915] 将中间体B(200.0mg,0.25mmol)、(E)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)丙烯酸苄酯(108.0mg,0.38mmol)、Pd(dppf)Cl₂(18.3mg,0.03mmol)和碳酸钠(79.7mg,0.75mmol)在二噁烷(3mL)和水(0.5mL)中的混合物在80℃在氮气气氛下搅拌4h并浓缩。将残余物通过柱色谱法(1%-8%甲醇/二氯甲烷)纯化,以得到呈棕色油状物的标题

化合物 (150.0mg, 68.1% 产率)。 m/z 实测值 = 879.4 (M+H)。

[0916] 3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)丙酸的制备

[0917] 将化合物(E)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(苄氧基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(150.0mg, 0.17mmol)、10% 钨/碳(6.0mg, 0.05mmol)和10% 氢氧化钨/碳(6.2mg, 0.05mmol)在四氢呋喃(10mL)中的混合物在20℃在氢气气氛(15Psi)下搅拌16h并过滤。将滤液浓缩,以获得呈棕色固体的粗化合物006-5(120.0mg, 88.9% 产率)。 m/z 实测值 = 791.5 (M+H)。

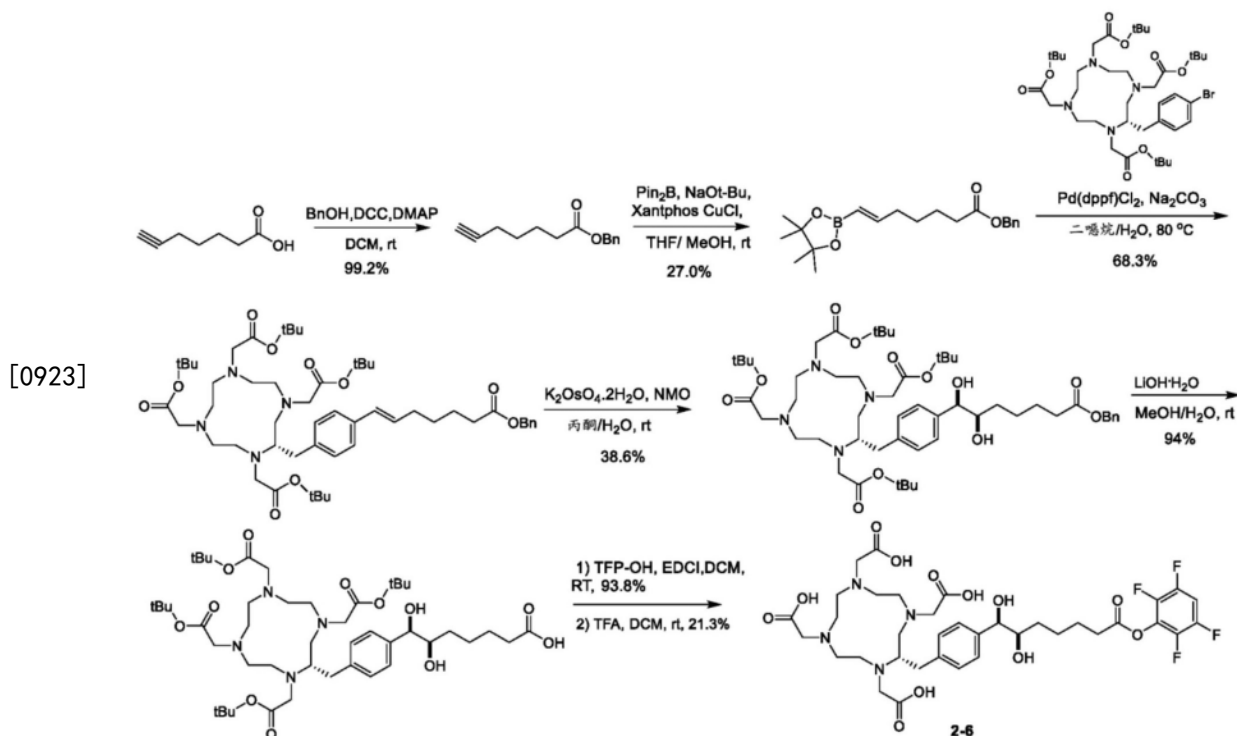
[0918] 2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0919] 将3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)丙酸(190.0mg, 0.24mmol)、2,3,5,6-四氟苯酚(47.9mg, 0.29mmol)和EDC(55.3mg, 0.29mmol)在二氯甲烷(10mL)中的混合物在20℃搅拌3h。将混合物用二氯甲烷(150mL)稀释,用盐水(150mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈淡黄色油状物的粗标题化合物(220.0mg, 97.5% 产率)。 m/z 实测值 = 939.6 (M+H)。

[0920] 2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0921] 将2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(200.0mg, 0.21mmol)在二氯甲烷(2mL)和三氟乙酸(4mL)中的溶液在30℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物通过制备型HPLC(30%-43% ACN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-5)(93.1mg, 52.8% 产率)。 m/z 实测值 = 715.3 (M+2H/2)。 ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.02-7.89(m, 1H), 7.33-7.17(m, 4H), 4.09-3.91(m, 3H), 3.87-3.63(m, 4H), 3.59-3.46(m, 5H), 3.19-2.90(m, 13H), 2.88-2.63(m, 4H)。

[0922] 实施例8. 化合物2-6



[0924] 庚-6-炔酸苄酯的制备

[0925] 经1h,在0℃将二环己基碳二亚胺(16.4g,79.3mmol)和4-二甲基氨基吡啶(1.0g,7.9mmol)在二氯甲烷(100mL)中的溶液缓慢添加到庚-6-炔酸(10.0g,79.3mmol)和苄醇(8.7g,80.9mmol)在二氯甲烷(100mL)中的溶液中。将悬浮液在20℃搅拌12h并在真空中浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(500mL)与水(200mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,5%-10%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈无色油状物的庚-6-炔酸苄酯(17.0g,99.2%产率)。

[0926] (E)-7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)庚-6-烯酸苄酯的制备

[0927] 向氯化亚铜(137.3mg,1.39mmol)和(9,9-二甲基-9H-咕吨-4,5-二基)双(二苯基膦)(803.0mg,1.39mmol)以及叔丁醇钠(267.0mg,2.77mmol)在四氢呋喃(100mL)中的混合物中添加双(频哪醇合)二硼(11.7g,46.20mmol),随后添加庚-6-炔酸苄酯(10.0g,46.24mmol)和甲醇(100mL)。将反应在20℃在N₂气氛下搅拌12h并在真空中浓缩至干。将残余物在乙酸乙酯(200mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-10%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈无色油状物的标题化合物(4.3g,27.0%产率)。

[0928] (S,E)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(7-(苄氧基)-7-氧代庚-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0929] 将中间体B(1.0g,1.25mmol)、(E)-7-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)庚-6-烯酸苄酯(647.0mg,1.88mmol)、Pd(dppf)Cl₂(91.7mg,125μmol)和碳酸钠(398.0mg,3.76mmol)在二噁烷(10mL)和水(2mL)中的混合物在80℃搅拌4h并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(1%-5%甲醇/二氯甲烷)纯化,以得到呈黄色固体的标题化合物(800mg,68.3%产率)。m/z实测值=935.7(M+H)。

[0930] 2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-((rac-1R,2R)-7-(苄氧基)-1,2-二羟基-7-氧代庚基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0931] 向(S,E)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(7-(苄氧基)-7-氧代庚-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(400mg,0.43mmol)和钨酸钾(15.8mg,0.04mmol)在水(5mL)和丙酮(5mL)中的溶液中添加4-甲基吗啉4-氧化物(200.0mg,1.71mmol)。将反应在25℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物通过制备型HPLC(水(FA)-ACN 35%-65%)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(160.0mg,38.6%产率)。 m/z 实测值=969.6(M+H)。

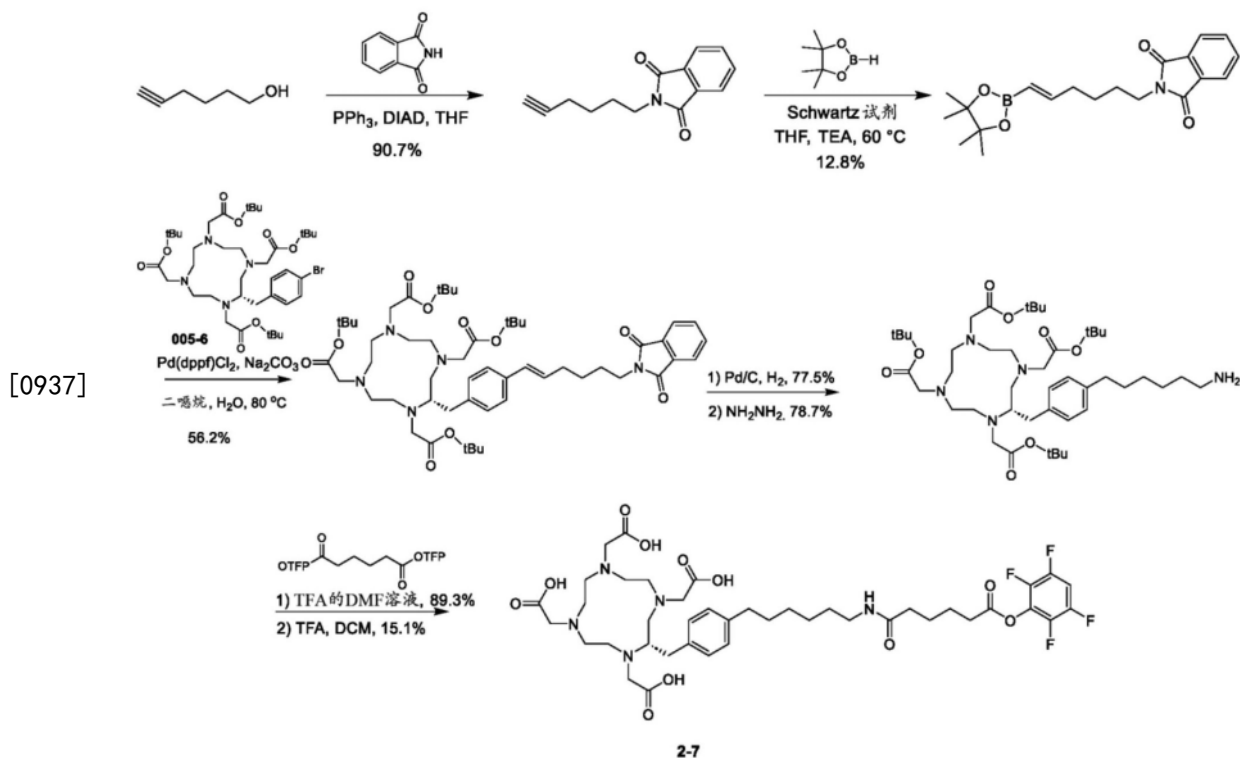
[0932] (rac-6R,7R)-6,7-二羟基-7-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)庚酸的制备

[0933] 向2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-((rac-1R,2R)-7-(苄氧基)-1,2-二羟基-7-氧代庚基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(130.0mg,0.13mmol)在甲醇(2mL)和水(1mL)中的溶液中添加一水氢氧化锂(33.8mg,0.81mmol)。将反应在25℃搅拌16h,并然后用盐酸水溶液(1N)调节至pH=6。将残余物在乙酸乙酯(100mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈白色固体的粗标题化合物(110.0mg,94%产率)。 m/z 实测值=879.7(M+H)。

[0934] 2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-((rac-1R,2R)-1,2-二羟基-7-氧代-7-(2,3,5,6-四氟苯氧基)庚基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0935] 向(rac-6R,7R)-6,7-二羟基-7-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)庚酸(110.0mg,0.13mmol)和 N^1 -((乙基亚氨基)亚甲基)- N^3,N^3 -二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐(28.8mg,0.15mmol)在二氯甲烷(3mL)中的溶液中添加2,3,5,6-四氟苯酚(24.9mg,0.15mmol)。将反应在25℃搅拌16h并在乙酸乙酯(50mL)与水(20mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(20mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈黄色油状物的粗品脱保护的中间体(120.0mg,93.8%)。 m/z 实测值=1027.6(M+H)。将以上中间体(120.0mg,0.12mmol)在二氯甲烷(2mL)和三氟乙酸(4mL)中的溶液在30℃搅拌16h并在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC(29%-49% ACN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-6)(20.0mg,21.3%产率)。 m/z 实测值=803.4(M+H)。 ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ =7.99-7.93(m,1H),7.23-7.19(m,4H),5.16(s,1H),4.60(s,1H),4.32(s,1H),3.95(s,3H),3.44-3.34(m,19H),3.00(s,2H),2.71-2.67(m,4H),1.56-1.53(m,3H),1.28-1.12(m,3H)。

[0936] 实施例9.化合物2-7



[0938] 2-(己-5-炔-1-基)异吲哚啉-1,3-二酮的制备

[0939] 在0℃向己-5-炔-1-醇(2.0g, 20.4mmol)、异吲哚啉-1,3-二酮(3.3g, 22.4mmol)和三苯基膦(5.6g, 21.4mmol)在四氢呋喃(50mL)中的混合物中缓慢添加偶氮二甲酸二异丙酯(4.5g, 22.4mmol)。将反应混合物在25℃在氮气气氛下搅拌16h。将反应混合物用乙酸乙酯(200mL)稀释,用水(100mL)、盐水(2x 50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈白色固体的2-(己-5-炔-1-基)异吲哚啉-1,3-二酮(4.2g, 90.7%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ=7.85-7.83 (m, 2H), 7.73-7.70 (m, 2H), 3.73-3.70 (m, 2H), 2.25-2.23 (m, 2H), 1.95-1.94 (m, 1H), 1.84-1.80 (m, 2H), 1.60-1.56 (m, 2H)。m/z实测值=227.8 (M+H)。

[0940] (E)-2-(6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)己-5-烯-1-基)-异吲哚啉-1,3-二酮的制备

[0941] 向2-(己-5-炔-1-基)异吲哚啉-1,3-二酮(1.0g, 4.40mmol)和双(环戊二烯基)氯化锆(58.7mg, 0.22mmol)在二氯甲烷(15mL)中的混合物中添加4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(0.6g, 4.84mmol)。将反应混合物在60℃在氮气气氛下搅拌24h并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(硅胶, 100-200目, 30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈无色油状物的标题化合物(200.0mg, 12.8%产率)。m/z实测值=227.8 (M+H)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ=7.85-7.83 (m, 2H), 7.72-7.70 (m, 2H), 6.63-6.55 (m, 1H), 5.45-5.41 (m, 2H), 3.71-3.65 (m, 2H), 2.25-2.20 (m, 2H), 1.72-1.68 (m, 2H), 1.26 (s, 12H)。

[0942] (S,E)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(6-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)己-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0943] 将(E)-2-(6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)己-5-烯-1-基)异吲哚啉-1,3-二酮(400.0mg, 1.13mmol)、化合物中间体B(600.0mg, 0.75mmol)、Pd(dppf)Cl₂(55.0mg, 0.08mmol)和碳酸钠(239.0mg, 2.26mmol)在1,4-二噁烷(6mL)和水(0.5mL)中

的混合物在80℃搅拌16h并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(0-5%甲醇/二氯甲烷)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(400.0mg,56.2%产率)。m/z实测值=946.6(M+H)。

[0944] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(6-氨基己基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0945] 将(S,E)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(6-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)己-1-烯-1-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(400mg,0.42mmol)、10%钇/碳(450.0mg,0.42mmol)和20%氢氧化钇/碳(297.0mg,0.42mmol)在乙酸乙酯(5mL)中的混合物在25℃在氢气气氛(15psi)下搅拌16h并过滤。将滤液浓缩至干,以得到呈黄色油状物的粗游离胺中间体(310.0mg,77.5%)。m/z实测值=948.7(M+H)。

[0946] 向以上中间体(310.0mg,0.33mmol)在乙醇(5mL)中的溶液中添加水合肼(92.7mg,1.63mmol)。将反应混合物在60℃搅拌2h并冷却至室温。然后将混合物过滤并将滤液浓缩至干,以得到呈黄色油状物的粗标题化合物(210.0mg,78.7%)。m/z实测值=818.6(M+H)。

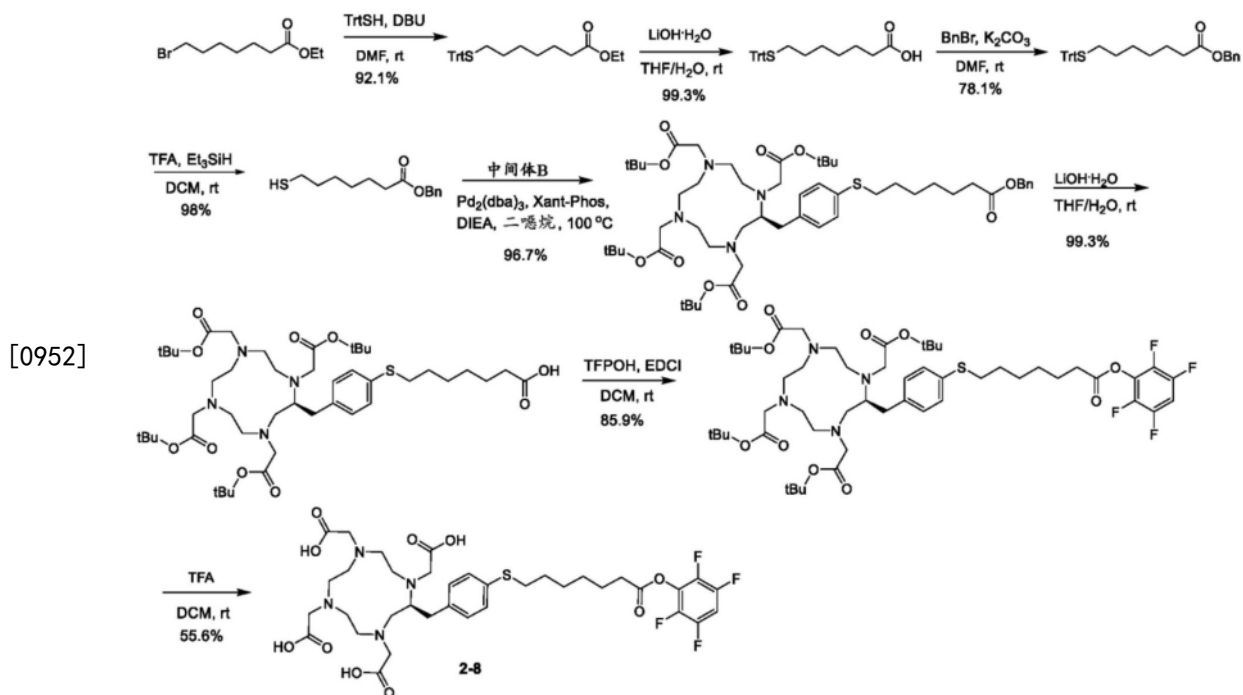
[0947] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(6-(6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己酰胺基)-己基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0948] 向(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(6-氨基己基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(210.0mg,0.26mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(3mL)中的溶液中添加双(2,3,5,6-四氟苯基)己二酸酯(227.0mg,0.51mmol)和N,N-二异丙基乙胺(116.0mg,0.90mmol)。将反应混合物在25℃搅拌1h并在真空中浓缩。将残余物在乙酸乙酯(100mL)与水(50mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈黄色油状物的脱保护的中间体(250.0mg,89.3%)。m/z实测值=1094.7(M+H)。

[0949] 将以上中间体(250.0mg,0.23mmol)在二氯甲烷(1mL)和三氟乙酸(2mL)中的溶液在30℃搅拌16h并在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC(18%-48% ACN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-7)(30.0mg,15.1%产率)。m/z实测值=870.5(M+H)。

[0950] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ =7.97-7.92(m, 1H), 7.83-7.80(m, 1H), 7.16-7.10(m, 4H), 3.97(s, 4H), 3.63-3.39(m, 13H), 3.03-3.00(m, 12H), 2.80-2.76(m, 2H), 2.11-2.08(m, 2H), 1.64-1.55(m, 6H), 1.36(s, 2H), 1.26(s, 4H)。

[0951] 实施例10.化合物2-8



[0953] 7-(三苯甲基硫基)庚酸乙酯的制备

[0954] 向7-溴庚酸乙酯(5.0g, 21.1mmol)和三苯基甲硫醇(7.0g, 25.3mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(45mL)中的混合物中添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯(6.4g, 42.2mmol)。将反应混合物在25℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈无色油状物的7-(三苯甲基硫基)庚酸乙酯(8.4g, 92.1%产率)。

[0955] 7-(三苯甲基硫基)庚酸的制备

[0956] 向7-三苯甲基硫烷基庚酸乙酯(8.4g, 19.4mmol)在四氢呋喃(7.5mL)和水(7.5mL)中的溶液中添加氢氧化锂水合物(0.7g, 29.1mmol)。将混合物在20℃搅拌2h并用盐酸水溶液(1M)调节至pH=6。将混合物在减压下浓缩。将残余物在乙酸乙酯(500mL)与水(200mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈白色固体的粗7-(三苯甲基硫基)庚酸(7.8g, 99.3%产率)。

[0957] 7-(三苯甲基硫基)庚酸苄酯的制备

[0958] 向7-(三苯甲基硫基)庚酸(7.8g, 19.3mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(80mL)中的溶液中添加(溴甲基)苯(4.0g, 23.1mmol)和碳酸钾(4.0g, 28.9mmol)。将混合物在25℃搅拌16h并过滤。将滤液在减压下浓缩,并将残余物通过柱色谱法(2%-10%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈黄色油状物的7-(三苯甲基硫基)庚酸苄酯(7.6g, 78.1%产率)。

[0959] 7-巯基庚酸苄酯的制备

[0960] 在25℃向7-(三苯甲基硫基)庚酸苄酯(700mg, 1.42mmol)在二氯甲烷(10mL)中的溶液中添加三乙基硅烷(197mg, 1.70mmol)和三氟乙酸(3.23g, 28.30mmol)。将反应在25℃搅拌3h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(10%-50%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈黄色油状物的7-巯基庚酸苄酯(350mg, 98%产率)。(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-(苄氧基)-7-氧代庚基)硫基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0961] 将中间体B(400mg, 0.50mmol)、7-巯基庚酸苄酯(253mg, 1.00mmol)、三(二苄叉基

丙酮)二钯(92mg, 0.10mmol)、(9,9-二甲基-9H-咕吨-4,5-二基)双(二苯基膦)(58mg, 0.10mmol)和DIPEA(162mg, 1.25mmol)在二噁烷(8mL)中的混合物在100℃在氮气气氛下搅拌3h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(1%-5%在二氯甲烷中的甲醇)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(470mg, 96.7%产率)。m/z实测值=970.0(M+H)。

[0962] (S)-7-((4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)硫基)庚酸的制备

[0963] 向(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-(苄氧基)-7-氧代庚基)硫基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(200mg, 0.21mmol)在甲醇(6mL)和水(2mL)中的溶液中添加一水氢氧化锂(22mg, 0.52mmol)。将反应在25℃搅拌1h并在减压下浓缩以去除甲醇。将所得混合物用水(5mL)稀释并用盐酸水溶液(1M)调节至pH=6。将所得混合物在乙酸乙酯(100mL)与水(50mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈棕色固体的粗品(S)-7-((4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)硫基)庚酸(180mg, 99.3%产率)。m/z实测值=879.3(M+H)。

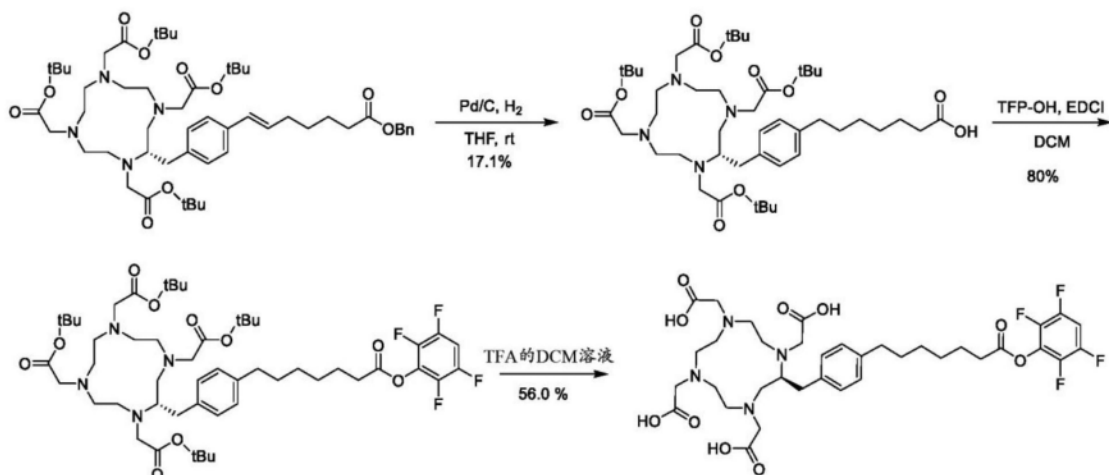
[0964] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氧代-7-(2,3,5,6-四氟苯氧基)庚基)硫基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0965] 向化合物(S)-7-((4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)硫基)庚酸(140.0mg, 0.16mmol)、2,3,5,6-四氟苯酚(39.7mg, 0.24mmol)在二氯甲烷(5mL)中的混合物中添加EDC(45.8mg, 0.24mmol)。将混合物在25℃搅拌16h并用二氯甲烷(20mL)稀释,用盐水(15mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈黄色油状物的粗标题化合物(140.0mg, 85.9%)。m/z实测值=514.4(M+2H/2)。

[0966] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氧代-7-(2,3,5,6-四氟苯氧基)庚基)硫基)-苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0967] 向化合物(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((7-氧代-7-(2,3,5,6-四氟苯氧基)庚基)硫基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(140.0mg, 0.15mmol)在二氯甲烷(2mL)中的溶液中添加三氟乙酸(6.2g, 54.00mmol)。将混合物在25℃搅拌3h并浓缩至干。将残余物通过制备型HPLC(23%-53% ACN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-8)(67.0mg, 55.6%产率)。m/z实测值=803.2(M+H)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ=8.00-7.92(m, 1H), 7.27-7.23(m, 4H), 3.03-2.76(m, 29H), 1.67-1.64(m, 2H), 1.58-1.56(m, 2H), 1.44-1.39(m, 4H)。

[0968] 实施例11. 化合物2-9



[0970] (S)-7-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)庚酸的制备

[0971] 向(S)-7-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)庚酸(700mg, 0.83mmol)在四氢呋喃(15mL)中的溶液中添加10%氢氧化钡/碳(881mg, 0.83mmol)。将反应在25℃在氢气(15psi)下搅拌16h并过滤。将滤液浓缩至干,以得到呈黄色油状物的标题化合物(120mg, 17.1%产率)。m/z实测值=847.7(M+H)。

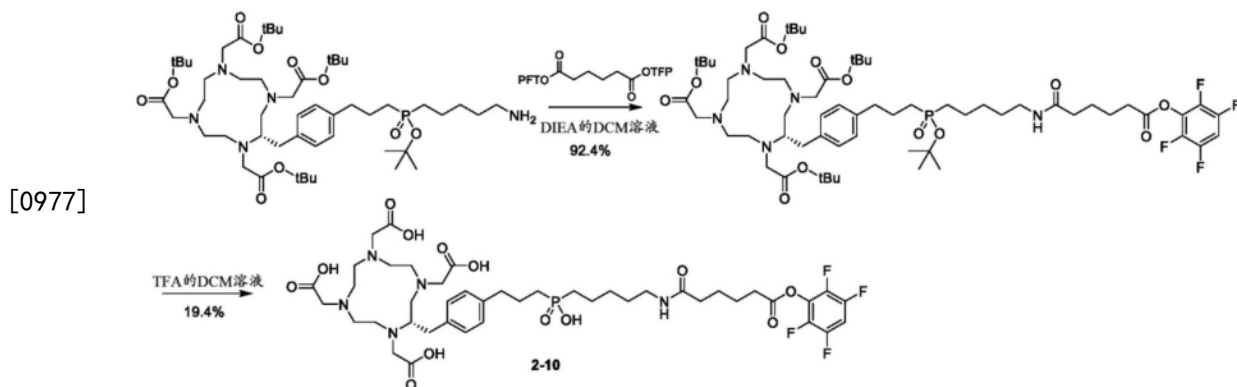
[0972] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(7-氧代-7-(2,3,5,6-四氟苯氧基)庚基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[0973] 在25℃向(S)-7-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)庚酸(86.0mg, 0.10mmol)、EDC(23.4mg, 0.12mmol)在二氯甲烷(3mL)中的溶液中添加2,3,5,6-四氟苯酚(18.6mg, 0.11mmol)。将反应在25℃搅拌16h并用二氯甲烷(100mL)稀释。将溶液用水(50mL)、盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈黄色油状物的粗化合物(80.0mg, 80%)。m/z实测值=996.35(M+H)。

[0974] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(7-氧代-7-(2,3,5,6-四氟苯氧基)庚基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0975] 向(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(7-氧代-7-(2,3,5,6-四氟苯氧基)庚基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(60mg, 0.06mmol)在二氯甲烷(1mL)中的溶液中添加三氟乙酸(2mL)。将反应在30℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物通过制备型HPLC(22%-52% ACN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-9)(20.1mg, 56.0%产率)。m/z实测值=771.3(M+H)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ=7.80-7.92(m, 1H), 7.17-7.13(m, 4H), 4.20-3.76(m, 6H), 3.65-3.30(m, 12H), 3.20-2.80(m, 7H), 2.79-2.75(m, 4H), 1.69-1.64(m, 2H), 1.62-1.54(m, 2H), 1.56-1.33(m, 4H)。

[0976] 实施例12. 化合物2-10



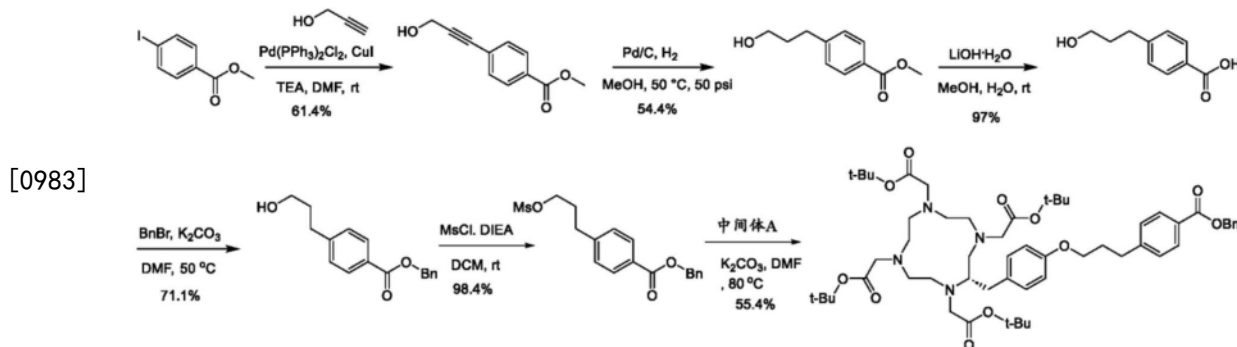
[0978] 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(叔丁氧基(5-(6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己酰胺基)戊基)磷酰基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

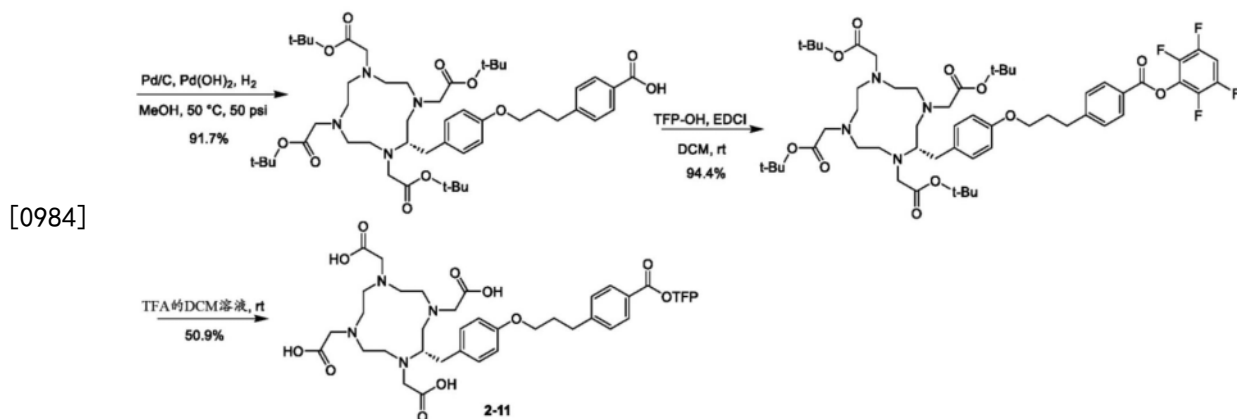
[0979] 向2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(叔丁氧基(5-(6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己酰胺基)戊基)磷酰基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(160.0mg,0.17mmol)、DIPEA(42.8mg,0.33mmol)在二氯甲烷(4mL)中的溶液中添加双(2,3,5,6-四氟苯基)己二酸酯(146.0mg,0.33mmol)。将混合物在20℃搅拌1h并用二氯甲烷(100mL)稀释。将溶液用水(50mL)、盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈淡黄色油状物的粗2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(叔丁氧基(5-(6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己酰胺基)戊基)磷酰基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(190.0mg,92.4%产率)。m/z实测值=1242.8(M+H)。

[0980] 2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(羟基(5-(6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-己酰胺基)戊基)磷酰基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[0981] 将2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(叔丁氧基(5-(6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己酰胺基)戊基)磷酰基)丙基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯在二氯甲烷(2mL)和三氟乙酸(4mL)中的溶液在30℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物通过制备型HPLC(25%-55% ACN/水)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-10)(31.9mg,19.4%产率)。m/z实测值=962.4(M+H)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ=8.00-7.89(m,1H),7.83-7.76(m,1H),7.27-7.11(m,5H),4.02-3.73(m,4H),3.27-3.12(m,10H),3.09-2.85(m,13H),2.78(br t,J=7.2Hz,3H),2.08(t,J=7.2Hz,2H),1.90-1.80(m,2H),1.68-1.53(m,4H),1.36-1.18(m,11H)。

[0982] 实施例13.化合物2-11





[0985] 4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯的制备

[0986] 将4-碘代苯甲酸甲酯(2.0g, 7.63mmol)、丙-2-炔-1-醇(1.19g, 21.2mmol)、双(三苯基膦)氯化钯(II)(0.8g, 1.14mmol)、碘化铜(I)(0.2g, 1.14mmol)和三乙胺(1.9g, 19.1mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中的混合物在 100°C 在氮气气氛下搅拌5h。将反应混合物浓缩至干,并将残余物通过柱色谱法(5%-20%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈黄色固体的4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯(0.9g, 61.4%产率)。

[0987] 4-(3-羟丙基)苯甲酸甲酯的制备

[0988] 向4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯(0.90g, 4.73mmol)在甲醇(20mL)中的溶液中添加10%钯/碳(0.15g, 1.41mmol)。将混合物在 50°C 在氢气气氛(50psi)下搅拌24h并过滤。将滤液在减压下浓缩,以得到呈黄色油状物的4-(3-羟丙基)苯甲酸甲酯(0.5g, 54.4%产率)。

[0989] 4-(3-羟丙基)苯甲酸的制备

[0990] 向4-(3-羟丙基)苯甲酸甲酯(500.0mg, 2.57mmol)在甲醇(3mL)和水(3mL)中的溶液中添加一水氢氧化锂(92.5mg, 3.86mmol)。将混合物在 25°C 搅拌2h并在减压下浓缩。将残余物用盐酸水溶液(1M)调节至 $\text{pH}=5$ 。将所得溶液在乙酸乙酯(100mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色固体的粗4-(3-羟丙基)苯甲酸(0.45g, 97.0%产率)。

[0991] 4-(3-羟丙基)苯甲酸苄酯的制备

[0992] 向4-(3-羟丙基)苯甲酸(0.45g, 2.50mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液中添加碳酸钾(0.52g, 3.75mmol)和苄基溴(0.51g, 3.00mmol)。将混合物在 25°C 搅拌2h并过滤。将滤液在减压下浓缩,并将残余物通过柱色谱法(5%-15%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈黄色油状物的4-(3-羟丙基)苯甲酸苄酯(0.48g, 71.1%产率)。m/z实测值=271.0(M+H)。

[0993] 4-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)苯甲酸苄酯的制备

[0994] 向4-(3-羟丙基)苯甲酸苄酯(300mg, 1.11mmol)在二氯甲烷(5mL)中的混合物中添加甲磺酰氯(250mg, 2.18mmol)和DIPEA(287mg, 2.22mmol)。将反应混合物在 25°C 搅拌1h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(5%-30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈无色油状物的4-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)苯甲酸苄酯(380mg, 98.4%)。m/z实测值=349.1(M+H)。

[0995] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(4-(苄氧基)羰基)苯基)-丙氧基)苄基)-1,4,7,

10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸四叔丁酯的制备

[0996] 向中间体A (356mg, 1.02mmol)、4-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)苯甲酸苄酯 (202mg, 1.21mmol) 在N,N-二甲基甲酰胺 (5mL) 中的混合物中添加碳酸钾 (282mg, 2.04mmol)。将反应混合物在80℃搅拌16h。冷却后,将反应混合物用乙酸乙酯 (200mL) 稀释并过滤。将滤液在减压下浓缩,并将残余物通过柱色谱法 (1%-5% 在二氯甲烷中的甲醇) 纯化,以得到呈黄色固体的标题化合物 (240mg, 55.4% 产率)。m/z 实测值=987.5 (M+H)。

[0997] (S)-4-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)苯甲酸的制备

[0998] 将(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(4-((苄氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯 (240mg, 0.24mmol)、10% 钯/碳 (259mg, 0.24mmol) 和20% 氢氧化钯/碳 (171mg, 0.24mmol) 在甲醇 (3mL) 中的混合物在50℃在氢气气氛 (50psi) 下搅拌8h并过滤。将滤液在减压下浓缩,以得到呈白色固体的粗标题化合物 (200mg, 91.7%)。m/z 实测值=897.4 (M+H)。

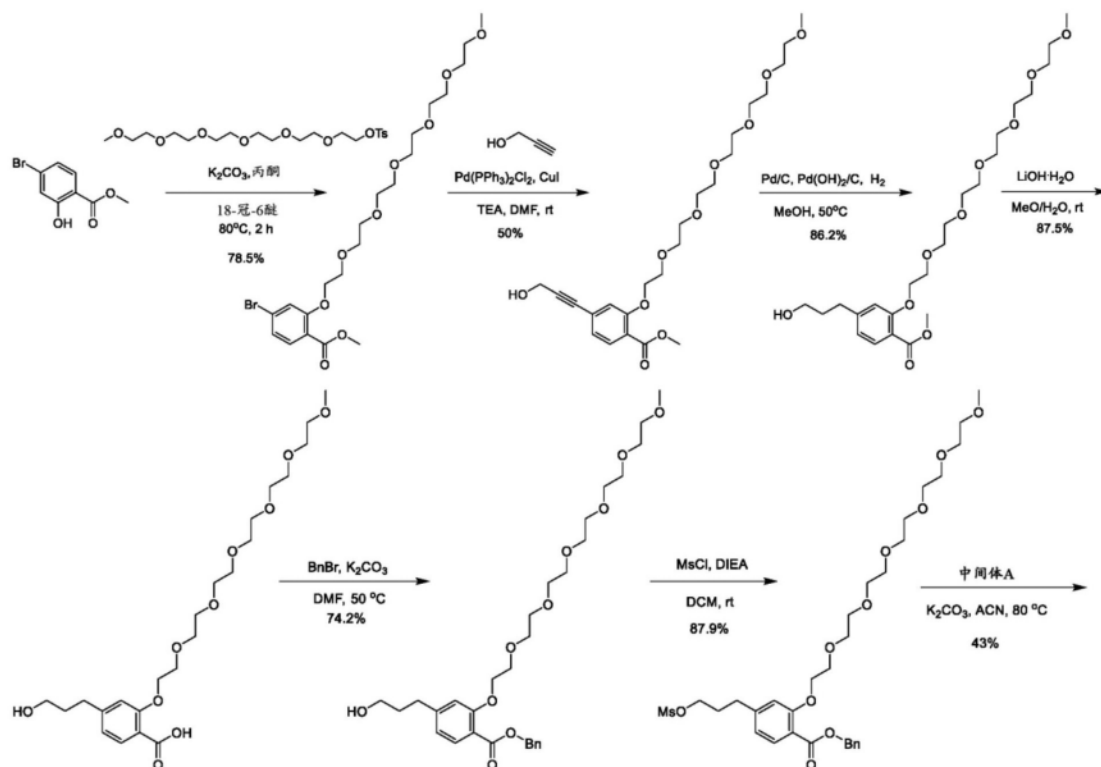
[0999] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(4-((2,3,5,6-四氟苯氧基)-羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[1000] 向(S)-4-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)苯甲酸 (200.0mg, 0.22mmol) 和2,3,5,6-四氟苯酚 (40.7mg, 0.25mmol) 在二氯甲烷 (5mL) 中的搅拌溶液中添加EDC (47.0mg, 0.25mmol)。将反应混合物在25℃搅拌1h并用二氯甲烷 (50mL) 稀释。将所得溶液用水 (10mL)、盐水 (2x 10mL) 洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈白色固体的粗标题化合物 (220.0mg, 94.4%)。m/z 实测值=1045.5 (M+H)。

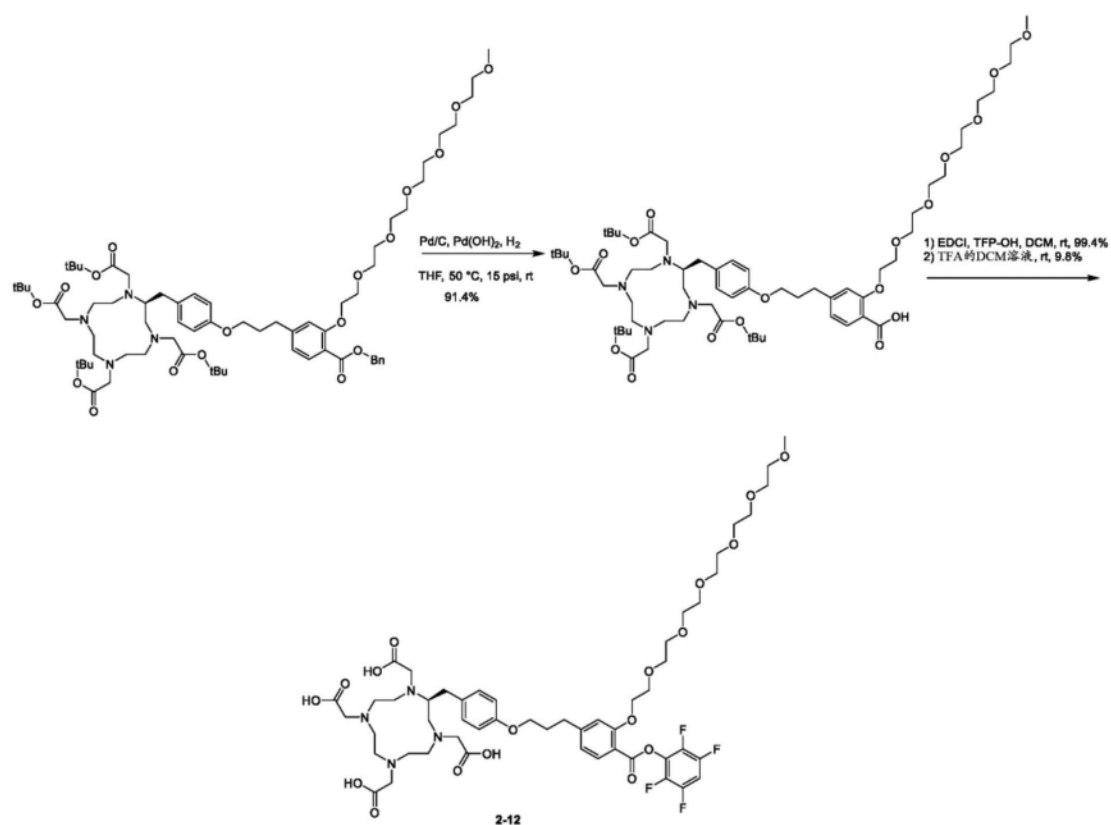
[1001] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(4-((2,3,5,6-四氟苯氧基)羰基)苯基)-丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[1002] 向(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(4-((2,3,5,6-四氟苯氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯 (220mg, 0.21mmol) 在二氯甲烷 (0.5mL) 中的溶液中添加三氟乙酸 (1mL)。将反应混合物在30℃搅拌16h并在减压下浓缩。将残余物通过制备型HPLC (24%-54% ACN/水+0.1% TFA) 纯化,以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物2-11) (20mg, 50.9% 产率)。m/z 实测值=821.2 (M+H)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.13-8.11 (m, 2H), 8.07-8.00 (m, 1H), 7.55-7.53 (m, 2H), 7.20-7.18 (m, 2H), 6.89-6.87 (m, 2H), 3.98-3.95 (m, 5H), 3.39-3.03 (m, 20H), 2.91-2.88 (m, 4H), 2.11-2.04 (m, 2H)。

[1003] 实施例14. 化合物2-12



[1004]



[1005] 2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-溴苯甲酸甲酯的制备

[1006] 在氮气气氛下,将4-溴-2-羟基苯甲酸甲酯(2.6g,11.3mmol)、4-甲基苯磺酸2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基酯(5.3g,11.8mmol)、碳酸钾(3.1g,22.5mmol)和1,4,7,10,13,16-六氧杂环十八烷(0.6g,2.25mmol)在丙酮(100mL)中的混合物在80℃搅拌2h并过滤。将滤液在减压下浓缩,并将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,30%-70%在石油醚

中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈无色油状物的标题化合物(4.5g,78.5%产率)。

[1007] 2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯的制备

[1008] 将2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-溴苯甲酸甲酯(4.50g, 8.83mmol)、丙-2-炔-1-醇(1.47g,26.22mmol)、碘化铜(I)(168mg,883 μ mol)、双(三苯基膦)二氯化钯(II)(620mg,883 μ mol)和三乙胺(2.23g,22.09mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(50mL)中的混合物在100℃在氮气气氛下搅拌5h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈淡色油状物的标题化合物(2.30g,50%产率)。m/z实测值=502.3(M+H₂O)。2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸甲酯的制备

[1009] 将2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯(2.3g,4.75mmol)、20%氢氧化钡/碳(333mg,4.75mmol)和10%钡/碳(505mg, 4.75mmol)在甲醇(20mL)中的混合物在50℃在H₂气氛(50psi)下搅拌12h并过滤。将滤液在减压下浓缩,以得到呈棕色油状物的粗化合物(2.0g,86.2%产率)。m/z实测值=488.3(M+H)。

[1010] 2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸的制备

[1011] 向2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸甲酯(2.0g,4.09mmol)在甲醇(6mL)和水(6mL)中的溶液中添加一水氢氧化锂(147.0mg, 6.14mmol)。将混合物在25℃搅拌2h并浓缩。将残余物用盐酸水溶液(1M)调节至pH=5。将所得溶液在乙酸乙酯(100mL)与水(50mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(30%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈淡色油状物的标题化合物(1.7g,87.5%产率)。m/z实测值=475.2(M+H)。

[1012] 2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸苄酯的制备

[1013] 向2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸(1.7g, 3.58mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中的溶液中添加碳酸钾(743.0mg,5.37mmol)和苄基溴(735.0mg,4.30mmol)。将混合物在25℃搅拌16h并过滤。将滤液在减压下浓缩,并将残余物通过柱色谱法(30%-70%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(1.5g,74.2%产率)。m/z实测值=582.3(M+H₂O)。2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)苯甲酸苄酯的制备

[1014] 在0℃向2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸苄酯(800mg,1.42mmol)、N-乙基-N-异丙基-丙烷-2-胺(366mg,2.83mmol)在二氯甲烷(10mL)中的溶液中添加甲磺酰氯(160mg,1.40mmol)。将混合物在20℃搅拌1h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(30%-70%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(0.8g,87.9%产率)。m/z实测值=660.3(M+H₂O)。

[1015] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-((苄氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[1016] 将2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙

基) 苯甲酸苄酯 (350mg, 0.54mmol)、中间体A (400mg, 0.54mmol) 和碳酸钾 (188mg, 1.36mmol) 在乙腈 (8mL) 中的混合物在 80℃ 搅拌 16h。将混合物过滤并将滤液在真空中浓缩。将残余物通过制备型 TLC (10% 在二氯甲烷中的甲醇, $R_f = 0.3$) 纯化, 以得到呈淡色油状物的标题化合物 (016-8) (300mg, 43.0% 产率)。m/z 实测值 = 1282.0 (M+H₂O)。

[1017] (S)-2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)苯甲酸的制备

[1018] 将化合物 (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-((苄氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯 (200mg, 0.16mmol)、10% 钯/碳 (166mg, 0.16mmol) 和 20% 氢氧化钯/碳 (109mg, 0.16mmol) 在四氢呋喃 (20mL) 中的混合物在 50℃ 在氢气气氛 (15psi) 下搅拌 1h 并过滤。将滤液浓缩至干, 以得到呈淡黄色固体的粗标题化合物 (170mg, 91.4% 产率)。m/z 实测值 = 596.8 (M+2H/2)。

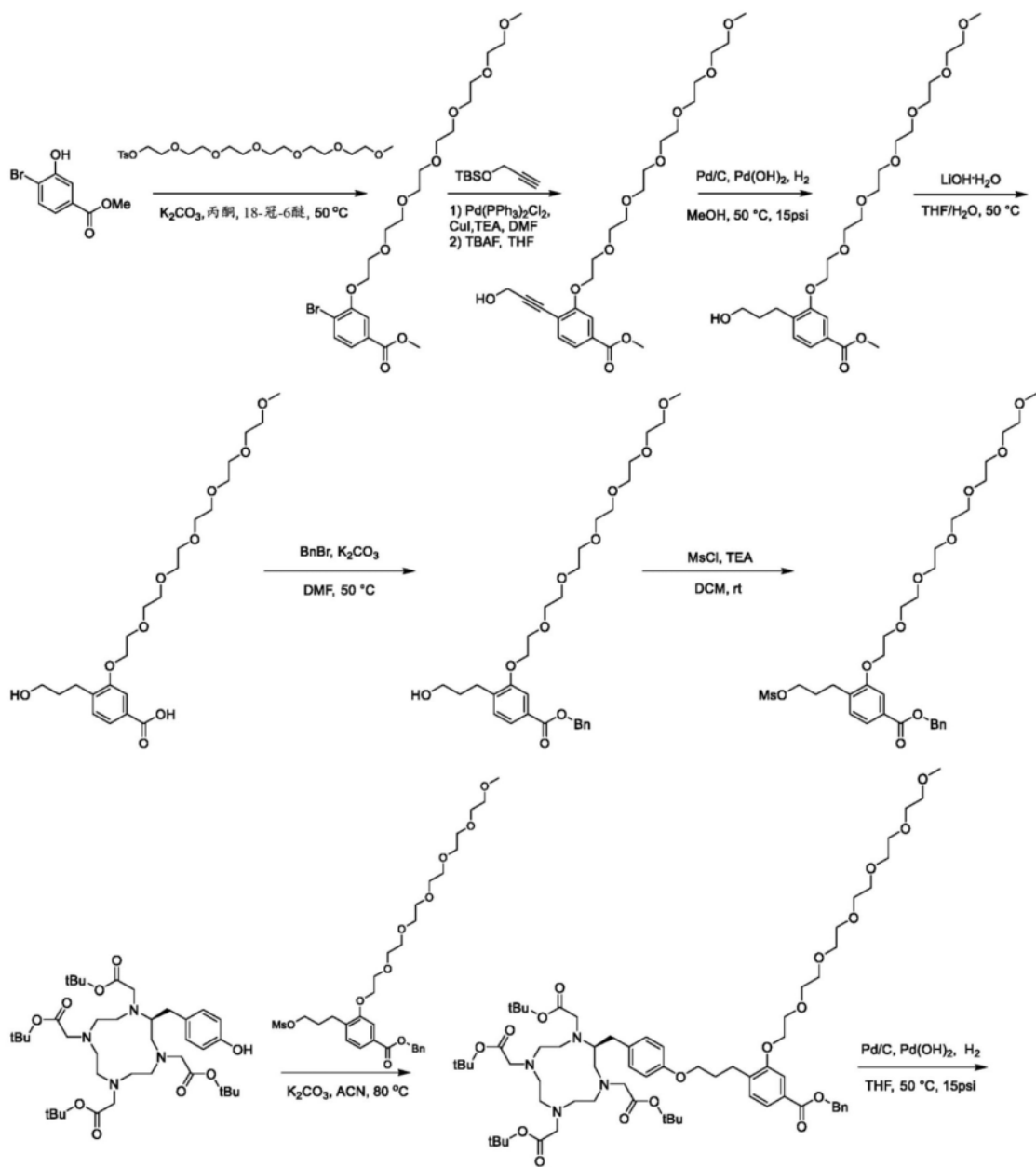
[1019] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-((2,3,5,6-四氟苯氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[1020] 将化合物 (S)-2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)苯甲酸 (170.0mg, 0.14mmol)、2,3,5,6-四氟苯酚 (30.8mg, 0.19mmol)、EDC (35.6mg, 0.19mmol) 在二氯甲烷 (5mL) 中的混合物在 20℃ 搅拌 5h。将混合物用二氯甲烷 (150mL) 稀释, 用盐水 (100mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干, 以得到粗品脱保护的中间体 (190mg, 99.4% 产率)。m/z 实测值 = 670.7 (M+2H/2)。

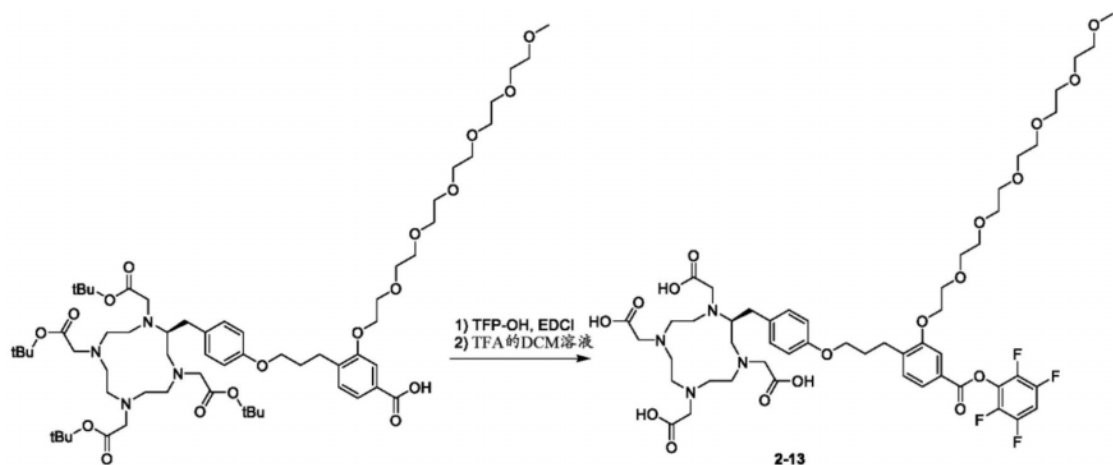
[1021] 将以上中间体 (160mg, 0.12mmol) 在二氯甲烷 (1.5mL) 和三氟乙酸 (3mL) 中的溶液在 30℃ 搅拌 16h 并浓缩至干。将残余物通过制备型 HPLC (26% - 56% ACN/水 + 0.1% TFA) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物 2-12) (13mg, 9.76% 产率)。m/z 实测值 = 1115.4 (M+H)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.04-7.95 (m, 1H), 7.93 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.23-7.09 (m, 3H), 7.02 (d, J = 8.4Hz, 1H), 6.88 (d, J = 8.4Hz, 2H), 4.25-4.20 (m, 2H), 4.00-3.91 (m, 4H), 3.79-3.71 (m, 2H), 3.59-3.55 (m, 4H), 3.52-3.44 (m, 27H), 3.23-3.03 (m, 13H), 2.89-2.81 (m, 4H), 2.13-2.03 (m, 2H)。

[1022] 实施例 15. 化合物 2-13

[1023]



[1024]



[1025] 3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-溴苯甲酸甲酯的制备

[1026] 将4-溴-3-羟基-苯甲酸甲酯(4.0g,17.31mmol)、4-甲基苯磺酸2,5,8,11,14,17-

六氧杂十九烷-19-基酯(7.8g,17.31mmol)、1,4,7,10,13,16-六氧杂环十八烷(915mg,3.46mmol)和碳酸钾(4.8g,34.6mmol)在丙酮(100mL)中的混合物在80℃搅拌10h并过滤。将滤液浓缩至干,并将残余物通过柱色谱法(10%-70%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈淡黄色油状物的3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-溴苯甲酸甲酯(6.5g,73.7%产率)。

[1027] 3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯的制备

[1028] 将3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-溴苯甲酸甲酯(8.60g,16.9mmol)、叔丁基二甲基(丙-2-炔-1-基氧基)硅烷(7.19g,42.2mmol)、N,N-二乙基乙胺(6.83g,67.5mmol)、双(三苯基膦)氯化钯(II)(1.19g,1.7mmol)和碘化铜(I)(321mg,1.7mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(80mL)中的混合物在80℃在氮气下搅拌10h。将反应混合物浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(30%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到呈棕色油状物的3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯(10.0g,98.9%产率)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ=7.58(dd,J=1.6Hz,8.0Hz,1H),7.55(d,J=1.2Hz,1H),7.44(d,J=7.6Hz,1H),4.58(s,2H),4.24(t,J=5.2Hz,2H),3.95-3.88(m,5H),3.80-3.75(m,2H),3.68-3.64(m,16H),3.57-3.53(m,2H),3.38(s,3H),0.94(s,9H),0.18(s,6H)。

[1029] 向以上中间体(9.3g,15.5mmol)在四氢呋喃(100mL)中的溶液中添加四丁基氟化铵(1.0M在四氢呋喃中,38.8mL,38.8mmol)。将混合物在20℃搅拌1h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(0-5%在二氯甲烷中的甲醇)纯化,以得到呈棕色油状物的标题化合物(2.3g,30.6%产率)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ=7.60(d,J=8.0Hz,1H),7.53(s,1H),7.44(d,J=8.0Hz,1H),4.51(d,J=6.0Hz,2H),4.23(t,J=4.4Hz,2H),3.98-3.86(m,8H),3.72-3.61(m,18H),3.57-3.51(m,2H),3.38(s,3H),3.23(t,J=6.0Hz,1H)。

[1030] 3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸甲酯的制备

[1031] 向化合物3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟基丙-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯(2.0g,4.13mmol)在甲醇(20mL)中的溶液中添加10%钯/碳(439mg,4.13mmol)和20%氢氧化钯/碳(238mg,4.13mmol)。将混合物在氢气下(15psi)下在50℃搅拌16h并过滤。将滤液浓缩至干,以得到粗标题化合物(1.8g,89.3%产率)。m/z实测值=489.1(M+H)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ=7.60(dd,J=1.2,7.6Hz,1H),7.49(s,1H),7.21(d,J=8.0Hz,1H),4.22-4.16(m,2H),3.96-3.85(m,5H),3.77-3.72(m,2H),3.71-3.60(m,16H),3.58-3.47(m,4H),3.38(s,3H),2.86-2.65(m,2H),1.91-1.79(m,2H)。

[1032] 3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸的制备

[1033] 将化合物3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸甲酯(1.7g,3.48mmol)和一水氢氧化锂(292mg,6.96mmol)在甲醇(20mL)和水(3mL)中的混合物在50℃搅拌16h并浓缩。将残余物用水(15mL)稀释,并然后用盐酸水溶液(1M)调节至pH=5。将混合物用乙酸乙酯(2x 250mL)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈白色固体的粗标题化合物(1.6g,96.9%产率)。

[1034] 3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸苄酯的制

备

[1035] 将化合物3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸(1.6g,3.37mmol)、苄基溴(865mg,5.06mmol)和碳酸钾(932mg,6.74mmol)在N,N-二乙基乙胺(10mL)中的混合物在50℃搅拌1h并过滤。将滤液在减压下浓缩,并将残余物通过柱色谱法(0-5%甲醇/二氯甲烷)纯化,以得到呈淡色油状物的标题化合物(820mg,43.1%产率)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ=7.65(dd,J=1.2,7.6Hz,1H),7.53(d,J=1.2Hz,1H),7.48-7.30(m,5H),7.21(d,J=7.6Hz,1H),5.36(s,2H),4.22-4.15(m,2H),3.93-3.85(m,2H),3.76-3.72(m,2H),3.71-3.68(m,2H),3.67-3.62(m,14H),3.57-3.51(m,4H),3.38(s,3H),2.81(t,J=7.6Hz,2H),1.89-1.77(m,2H)。

[1036] 3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)苯甲酸苄酯的制备

[1037] 向3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-羟丙基)苯甲酸苄酯(800mg,1.42mmol)、N-乙基-N-异丙基-丙烷-2-胺(366mg,2.83mmol)在二氯甲烷(10mL)的溶液中添加甲磺酰氯(130mg,1.13mmol)。将混合物在20℃搅拌1h并浓缩至干。将残余物通过柱色谱法(30%-70%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈淡色油状物的标题化合物(900mg,98.8%产率)。m/z实测值=660.3(M+H₂O)。

[1038] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-((苄氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[1039] 将化合物中间体A(600mg,0.82mmol)、3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-((甲基磺酰基)氧基)丙基)苯甲酸苄酯(525mg,0.82mmol)和碳酸钾(282mg,2.04mmol)在乙腈(7mL)中的混合物在60℃搅拌16h。将混合物用乙酸乙酯(50mL)稀释并过滤。将滤液浓缩至干,并将残余物通过柱色谱法(0-4%甲醇/二氯甲烷)纯化,以得到呈淡色油状物的标题化合物(380mg,36.3%产率)。m/z实测值=641.7(M+2H/2)。

[1040] (S)-3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)苯甲酸的制备

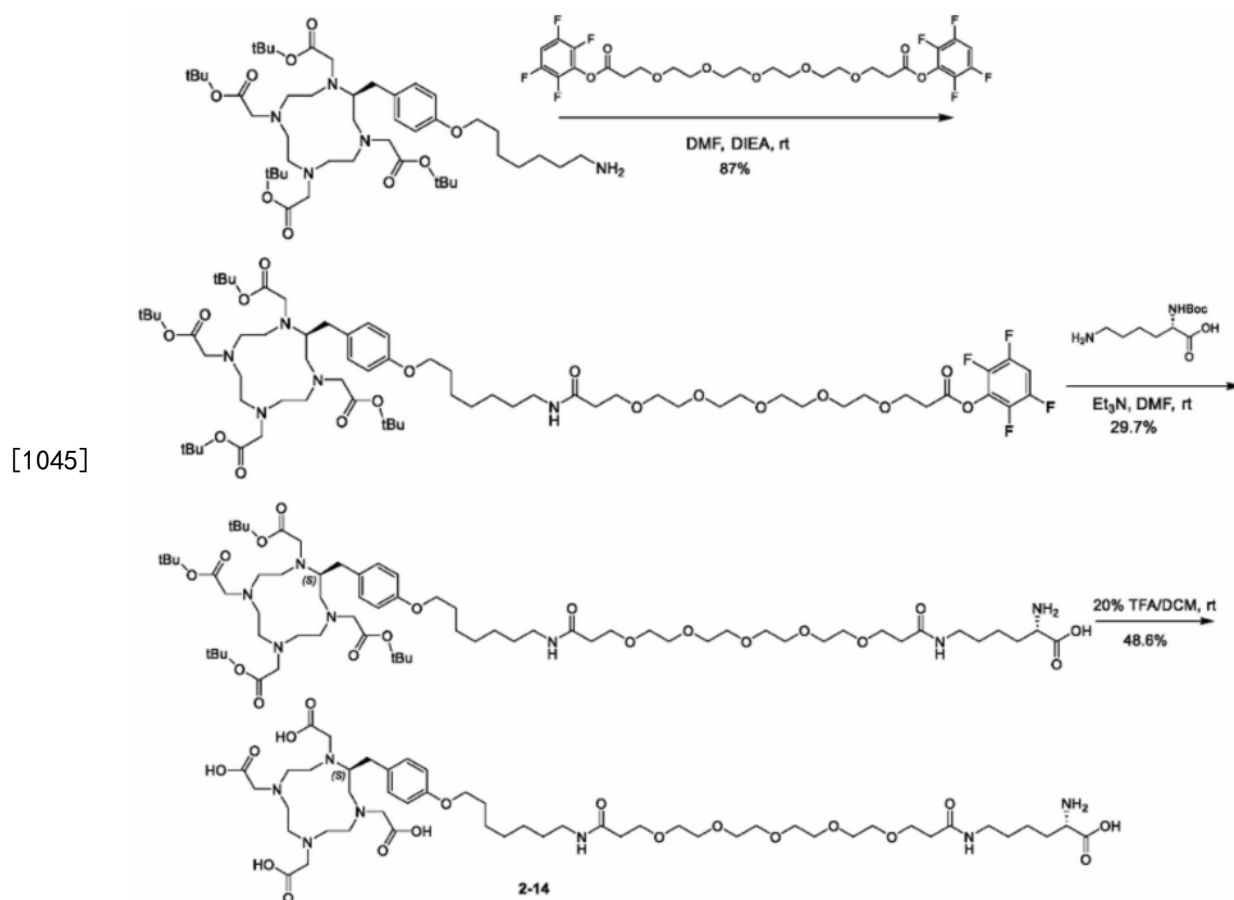
[1041] 将(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-((苄氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(370mg,0.29mmol)、10%钨/碳(307mg,0.29mmol)、10%氢氧化钨/碳(200.3mg,0.29mmol)在四氢呋喃(30mL)中的混合物在氢气(15psi)下在50℃搅拌16h。冷却后,将反应混合物过滤并将滤液浓缩至干,以得到呈淡色油状物的粗标题化合物(310mg,90.1%产率)。m/z实测值=596.6(M+2H/2)。(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(2-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-((2,3,5,6-四氟苯氧基)羰基)苯基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[1042] 将(S)-3-(2,5,8,11,14,17-六氧杂十九烷-19-基氧基)-4-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)丙基)苯甲酸(150mg,0.13mmol)、2,3,5,6-四氟苯酚(25mg,0.15mmol)和EDC(29mg,0.15μmol)在二氯甲烷(5mL)中的混合物在20℃搅拌2h。将反应混合物用二氯甲烷(100mL)稀释,用盐水

(50mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干, 以得到呈淡色油状物的粗品经保护的TFP酯 (160mg, 94.8% 产率)。m/z 实测值 = 1339.8 (M+H)。

[1043] 将以上中间体 (160mg, 0.12mmol) 在二氯甲烷 (1.5mL) 和三氟乙酸 (3mL) 中的溶液在 30℃ 搅拌 16h 并浓缩至干。将残余物通过制备型 HPLC (15% - 45% ACN/水 + 0.1% TFA) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物 2-13) (71mg, 53.3% 产率)。m/z 实测值 = 1115.5 (M+H)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.09-7.97 (m, 1H), 7.76 (dd, J = 1.6, 8.0Hz, 1H), 7.67 (d, J = 1.2Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.0Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.4Hz, 2H), 4.27-4.22 (m, 2H), 4.01-3.92 (m, 2H), 3.82-3.76 (m, 4H), 3.68-3.44 (m, 31H), 3.42-3.37 (m, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.19-2.75 (m, 11H), 2.11-1.96 (m, 2H)。

[1044] 实施例 16. 化合物 2-14



[1046] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((1,19-二氧代-1-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-4,7,10,13,16-五氧杂-20-氮杂二十七烷-27-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[1047] 向化合物 2-1 (200mg, 0.21mmol) 在 N,N-二甲基甲酰胺 (2mL) 中的溶液中添加 4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酸双(2,3,5,6-四氟苯基)酯 (132mg, 0.21mmol) 和 DIPEA (134mg, 1.04mmol)。将反应混合物在 25℃ 搅拌 0.5h。将混合物用乙酸乙酯 (100mL) 稀释, 用水 (50mL)、盐水 (50mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干, 以得到呈淡色油状物的粗标题化合物 (270mg, 87.0%)。m/z 实测值 = 659.3 (M+2H/2)。

[1048] (S)-2-氨基-8,26-二氧代-34-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)-11,14,17,20,23-五氧杂-7,27-二氮

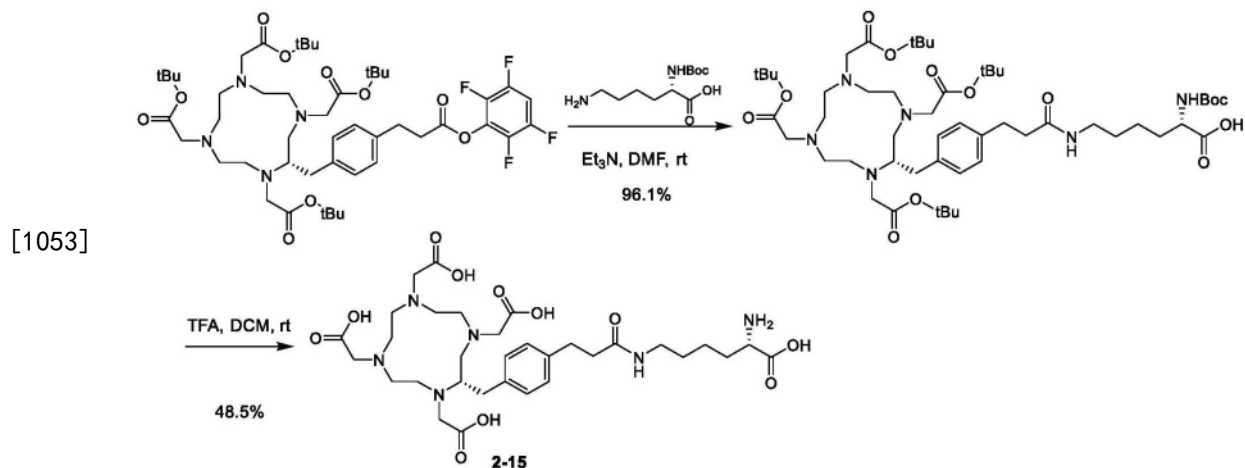
杂三十四烷-1-酸的制备

[1049] 将(S)-6-氨基-2-((叔丁氧基羰基)氨基)己酸(101mg, 0.41mmol)添加到中间体(S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-((1,19-二氧代-1-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-4,7,10,13,16-五氧杂-20-氮杂二十七烷-27-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(270mg, 0.21mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(2mL)中的混合物中。将反应混合物在25℃搅拌0.5h并在减压下浓缩。将残余物通过制备型HPLC(28%-58% ACN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈无色油状物的标题化合物(85mg, 29.7%产率)。m/z实测值=1398.4(M+H)。

[1050] 2,2',2'',2'''-((S)-2-(4-(((S)-1-氨基-1-羧基-7,25-二氧代-10,13,16,19,22-五氧杂-6,26-二氮杂三十三烷-33-基)氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[1051] 向化合物(S)-2-氨基-8,26-二氧代-34-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯氧基)-11,14,17,20,23-五氧杂-7,27-二氮杂三十四烷-1-酸(75mg, 0.054mmol)在二氯甲烷(2mL)中的溶液中添加三氟乙酸(4mL)。将反应在30℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物通过制备型HPLC(0-35% ACN/水+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物2-14)(28mg, 48.6%产率)。LCMS(方法5-95AB, ESI): $R_T=0.661\text{min}$, $[M/2+H]^+$ m/z实测值=537.0。 ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) $\delta=7.24-7.22(\text{m}, 2\text{H}), 6.92-6.90(\text{m}, 2\text{H}), 4.27-4.07(\text{m}, 4\text{H}), 3.98-3.95(\text{m}, 4\text{H}), 3.86-3.82(\text{m}, 2\text{H}), 3.76-3.72(\text{m}, 5\text{H}), 3.65-3.62(\text{m}, 18\text{H}), 3.50-3.47(\text{m}, 4\text{H}), 3.27-3.19(\text{m}, 8\text{H}), 3.11-2.84(\text{m}, 6\text{H}), 2.47-2.44(\text{m}, 4\text{H}), 2.02-1.90(\text{m}, 2\text{H}), 1.80-1.77(\text{m}, 2\text{H}), 1.59-1.40(\text{m}, 13\text{H})$ 。

[1052] 实施例17. 化合物2-15



[1054] (2S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-6-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)丙酰胺基)己酸的制备

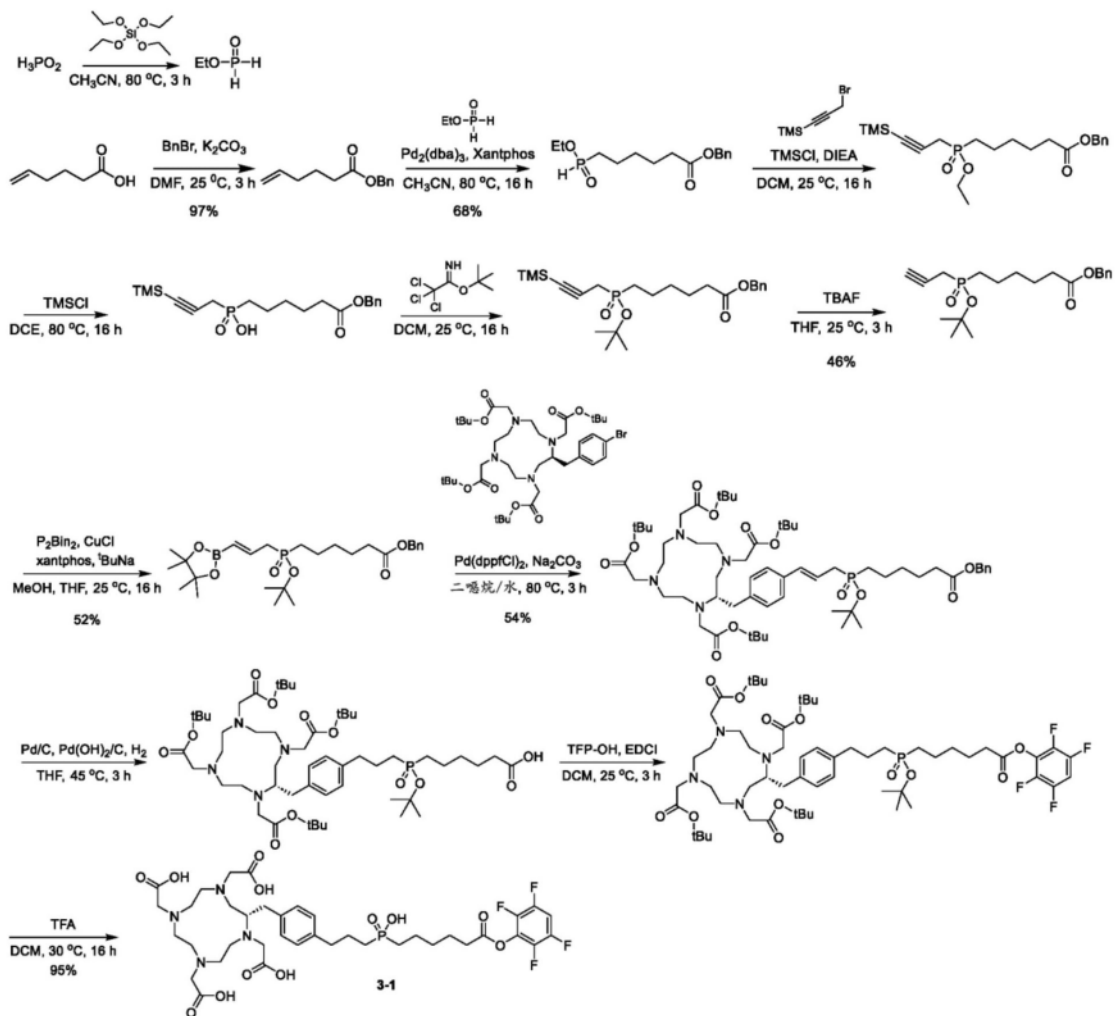
[1055] 将化合物2-5(230mg, 0.25mmol)、(S)-6-氨基-2-((叔丁氧基羰基)氨基)己酸(121mg, 0.49mmol)和DIPEA(48mg, 0.37mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液在20℃搅拌3h。将反应混合物在乙酸乙酯(100mL)与水(100mL)之间分配。将分离的有机层用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干,以得到呈淡黄色油状物的粗标题化合物(240mg, 96.1%产率)。m/z实测值=1019.7(M+H)。

[1056] 2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(((S)-5-氨基-5-羧基戊基)氨基)-3-氧代丙基)苄基)-

1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[1057] 将中间体 (2S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-6-(3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)丙酰胺基)己酸 (250mg, 0.25mmol) 在二氯甲烷 (2.5mL) 和三氟乙酸 (5mL) 中的溶液在 30℃ 搅拌 16h 并浓缩至干。将残余物通过制备型 HPLC 水 (0-30% ACN/水+0.1% TFA) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物 2-15) (82.6mg, 48.5% 产率)。m/z 实测值 = 695.7 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.26 (br s, 2H), 7.86 (t, J = 5.2Hz, 1H), 7.26-7.04 (m, 4H), 4.09-3.89 (m, 4H), 3.88-3.82 (m, 2H), 3.69-3.58 (m, 4H), 3.49-3.33 (m, 8H), 3.11-2.93 (m, 9H), 2.91-2.65 (m, 3H), 2.37-2.28 (m, 2H), 1.83-1.64 (m, 2H), 1.45-1.20 (m, 4H)。

[1058] 实施例18. 化合物3-1



[1060] 1-氧磷基氧基乙烷的制备

[1061] 向硅酸四乙酯 (96g, 462mmol) 在乙腈 (600mL) 中的溶液中添加羟基(氧代)磷 (30g, 462mmol)。将反应在 80℃ 在氮气气氛下搅拌 3h。直接使用反应混合物。

[1062] 己-5-烯酸苄酯的制备

[1063] 向己-5-烯酸 (23g, 197mmol) 和苄基溴 (34g, 197mmol) 在N,N-二甲基甲酰胺 (30mL) 中的溶液中添加碳酸钾 (55g, 394mmol)。将反应混合物在25℃搅拌3h。将反应混合物用乙酸乙酯 (500mL) 稀释, 用盐水 (500mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥并浓缩。将粗品通过柱色谱法 (硅胶,

100-200目, 0%-10%石油醚) 纯化, 以得到呈黄色油状物的己-5-烯酸苄酯 (39g, 97%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ =7.31-7.23 (m, 5H), 5.73-5.66 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.04-4.89 (m, 2H), 2.34-2.28 (m, 2H), 2.04-1.99 (m, 2H), 1.72-1.66 (m, 2H)。

[1064] 6-乙氧基膦酰基己酸苄酯的制备

[1065] 向己-5-烯酸苄酯 (30g, 147mmol)、Pd₂(dba)₃ (4g, 4.4mmol)、(9,9-二甲基-9H-咕吨-4,5-二基) 双(二苯基磷烷) (2.6g, 4.4mmol) 在乙腈 (10mL) 中的溶液中添加1-氧磷基氧基乙烷 (0.5M, 587.5mL)。将反应混合物在80℃在氮气气氛下搅拌16h。将反应混合物过滤并浓缩。将粗品通过柱色谱法 (硅胶, 100-200目, 10%-90%在石油醚中的乙酸乙酯) 纯化, 以得到呈黄色油状物的6-乙氧基膦酰基己酸苄酯 (30g, 68%产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ =7.32-7.24 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.12-4.03 (m, 2H), 2.32-2.28 (m, 2H), 1.62-1.54 (m, 6H), 1.38-1.30 (m, 2H), 1.29-1.28 (m, 3H)。

[1066] 6-[乙氧基(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)膦酰基]己酸苄酯的制备

[1067] 向6-乙氧基膦酰基己酸苄酯 (30g, 100mmol)、N-乙基-N-异丙基丙烷-2-胺 (26g, 201mmol) 在二氯甲烷 (200mL) 中的溶液中添加三甲基氯硅烷 (22g, 201mmol)。1h后, 然后添加(3-溴丙-1-炔-1-基) 三甲基硅烷 (29g, 151mmol)。将反应混合物在25℃搅拌16h。将反应混合物浓缩, 以得到呈黄色固体的粗6-[乙氧基(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)膦酰基]己酸苄酯 (40g, 粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=409.6。

[1068] 苄基(6-苄氧基-6-氧代-己基)-(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)次膦酸的制备

[1069] 向6-[乙氧基(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)膦酰基]己酸苄酯 (40g, 98mmol) 在1,2-二氯乙烷 (100mL) 中的溶液中添加三甲基氯硅烷 (37g, 343mmol)。将反应混合物在80℃在氮气气氛下搅拌16h。将反应混合物浓缩, 用乙酸乙酯 (500mL) 稀释, 用盐水 (500mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥并浓缩, 以得到呈黄色油状物的粗品(6-苄氧基-6-氧代-己基)-(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)次膦酸 (37g, 粗品)。

[1070] 6-[叔丁氧基(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)膦酰基]己酸苄酯的制备

[1071] 向(6-苄氧基-6-氧代-己基)-(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)次膦酸 (37g, 97.2mmol) 在二氯甲烷中的溶液中添加2,2,2-三氯乙酰亚胺叔丁酯 (85g, 389mmol)。将反应混合物在25℃搅拌16h。将反应混合物浓缩, 以得到呈黄色油状物的粗6-[叔丁氧基(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)膦酰基]己酸苄酯 (42g, 粗品)。 $[M+Na]^+$ 实测值=459.1。6-[叔丁氧基(丙-2-炔基)膦酰基]己酸苄酯的制备

[1072] 向6-[叔丁氧基(3-三甲基甲硅烷基丙-2-炔基)膦酰基]己酸苄酯 (42g, 96mmol) 在四氢呋喃 (100mL) 中的溶液中添加N,N-二丁基-N-丙基丁烷-1-氟化铵 (1M, 144mL)。将反应混合物在25℃搅拌3h。将反应混合物浓缩, 以得到粗化合物。将粗物质通过制备型HPLC([水(TFA)-ACN] 45%-75%) 纯化, 以得到呈黄色油状物的标题化合物 (16g, 44%产率, 经四个步骤)。 $[M+H]^+$ 实测值=365.1。

[1073] 6-[叔丁氧基-[(E)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)烯丙基]膦酰基]己酸苄酯的制备

[1074] 向氯化铜(I) (136mg, 1.4mmol) 和(5-二苯基磷烷基-9,9-二甲基-咕吨-4-基)-二苯基-磷烷 (794mg, 1.4mmol) 在四氢呋喃 (50mL) 中的溶液中添加2-甲基丙烷-2-醇钠 (396mg, 4.1mmol)。将反应混合物在25℃搅拌0.5h。然后在25℃添加4,4,5,5-四甲基-2-(4,

4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(7.0g, 27mmol)。10分钟后,添加6-[叔丁氧基(丙-2-炔基)磷酰基]己酸苄酯(5g,13.7mmol)和甲醇(3.5g,109.8mmol)。将反应混合物在25℃在氮气气氛下搅拌16h。将反应混合物用乙酸乙酯(100mL)稀释,用盐水(100mL)洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩,以得到粗化合物。将粗物质通过制备型HPLC([水(TFA)-ACN]40%-80%)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(3.5g, 52%产率)。

[1075] 6-[叔丁氧基-[(E)-3-[4-[[(2S)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]烯丙基]磷酰基]己酸苄酯的制备

[1076] 向2-[(6S)-6-[(4-溴苯基)甲基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯(中间体B)(300mg,376mmol)、6-[叔丁氧基-[(E)-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)烯丙基]磷酰基]己酸苄酯(278mg, 564mmol)、碳酸钠(120mg,1.1mmol)在水(1mL)和二噁烷(5mL)中的溶液中添加Pd(dppf)Cl₂(27.5mg,37.6mmol)。将反应混合物在80℃在氮气气氛下搅拌3h。将反应混合物浓缩,以得到粗化合物。将粗物质通过柱色谱法(硅胶,100-200目,0%-5%在二氯甲烷中的甲醇)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(220mg,54%产率)。 $[(M-56)/2+H]^+$ 实测值=514.3。

[1077] 6-[叔丁氧基-[3-[4-[[(2S)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丙基]磷酰基]己酸的制备

[1078] 向6-[叔丁氧基-[(E)-3-[4-[[(2S)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]烯丙基]磷酰基]己酸苄酯(210mg,194mmol)在四氢呋喃(8mL)中的溶液中添加10%钯/碳(206mg,193mmol)和20%氢氧化钯/碳(136mg, 194mmol)。将反应混合物在45℃在氢气气氛(15psi)下搅拌3h。将反应混合物过滤并浓缩,以得到呈黄色油状物的粗6-[叔丁氧基-[3-[4-[[(2S)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丙基]磷酰基]己酸(180mg,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=996.2。

[1079] 6-[叔丁氧基-[3-[4-[[(2R)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丙基]磷酰基]己酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯的制备

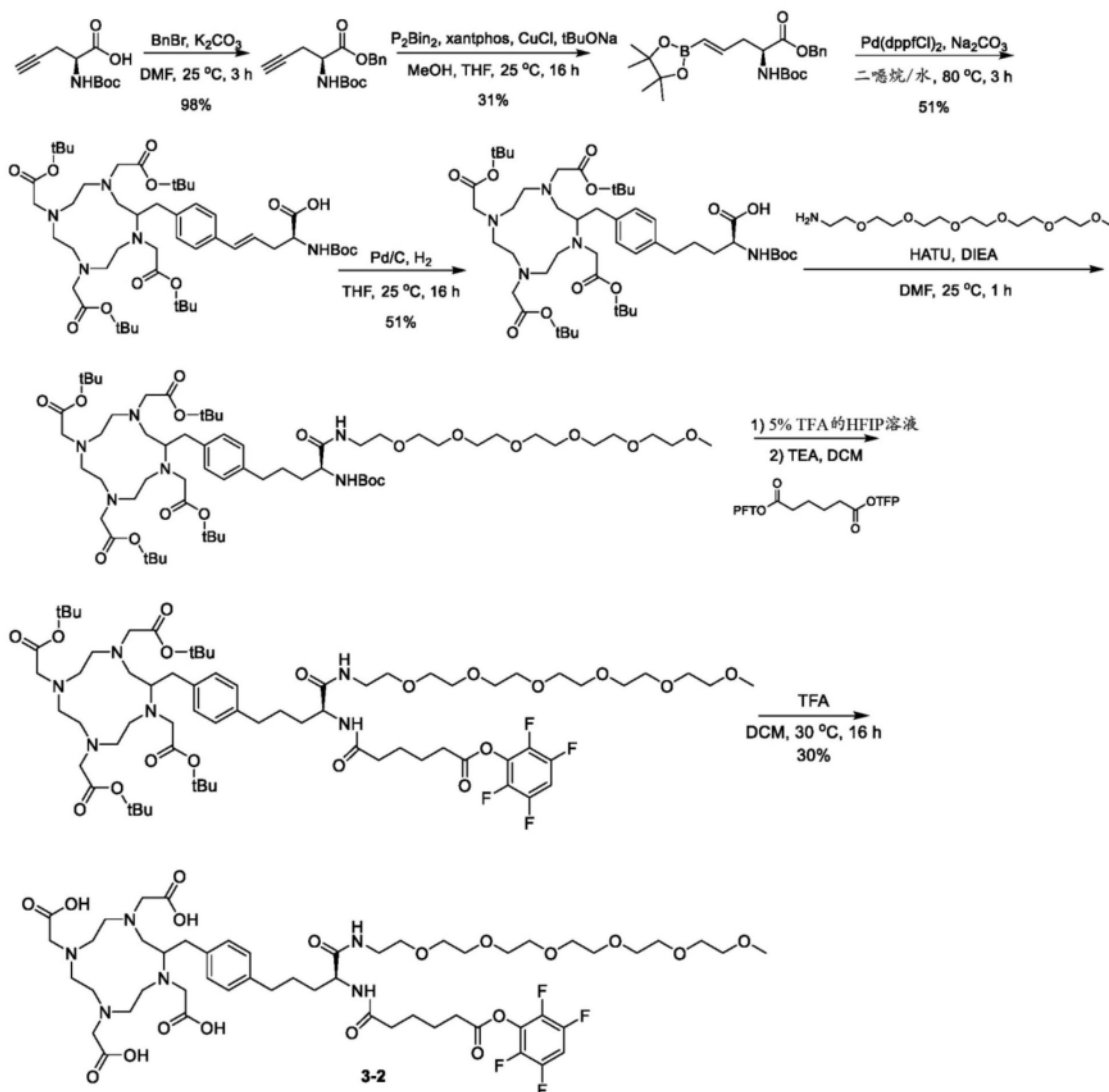
[1080] 向6-[叔丁氧基-[3-[4-[[(2S)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丙基]磷酰基]己酸(130mg,130mmol)在二氯甲烷(5mL)中的溶液中添加2,3,5,6-四氟苯酚(26mg,157mmol)、EDCI(30.05mg,156.74mmol)。将反应混合物在25℃搅拌3h。将反应混合物用二氯甲烷(20mL)稀释,用盐水(20mL)洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色油状物的粗6-[叔丁氧基-[3-[4-[[(2R)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丙基]磷酰基]己酸(2,3, 5,6-四氟苯基)酯(120mg,粗品)。

[1081] 2-[(6S)-4,7,10-三(羧甲基)-6-[[4-[3-[羟基-[6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)己基]磷酰基]丙基]苯基]甲基]-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸的制备

[1082] 向6-[叔丁氧基-[3-[4-[[(2R)-1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丙基]磷酰基]己酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯(120mg, 105mmol)在二氯甲烷(0.5mL)中的溶液中添加2,2,2-三氟乙酸(1mL)。将反应混合物在30℃搅拌16h。将反应混合物浓缩,以得到粗化合物。将粗物质通过制备型HPLC([水(TFA)-ACN]

12%-42%) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物(化合物3-1) (86mg, 51% 产率, 经三个步骤)。[M+H]⁺实测值=863.8。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.00-7.92 (m, 1H), 7.23-7.22 (m, 4H), 3.97-3.11 (m, 15H), 3.08-3.03 (m, 10H), 2.78-2.76 (m, 2H), 1.90-1.88 (m, 2H), 1.67-1.63 (m, 2H), 1.41-1.30 (m, 10H)。

[1083] 实施例19. 化合物3-2



[1085] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊-4-炔酸苄酯的制备

[1086] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊-4-炔酸(10g, 46.9mmol)、碳酸钾(13g, 94mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(50mL)中的溶液中添加溴甲基苯(8g, 47mmol)。将反应混合物在25°C搅拌3h。将反应混合物用乙酸乙酯(500mL)稀释, 用盐水(500mL)洗涤, 经硫酸钠干燥并浓缩。将粗品通过柱色谱法(硅胶, 100-200目, 0%-10%石油醚)纯化, 以得到呈黄色油状物的(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊-4-炔酸苄酯(14g, mmol, 98%产率)。

[1087] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊-4-炔酸苄酯的制备

[1088] 向氯化铜(I) (98mg, 989μmol)、(5-二苯基磷烷基-9,9-二甲基-咕吨-4-基)-二苯基-磷烷(572mg, 989μmol)在四氢呋喃(60mL)中的溶液中添加2-甲基丙烷-2-醇钠(285mg, 3.0mmol)。将反应混合物在25°C搅拌0.5h。然后在25°C添加4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(3.8g, 14.8mmol)。10

分钟后,添加(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊-4-炔酸苄酯(3g,9.9mmol)和甲醇(2.5g,79mmol)。将反应混合物在25℃在氮气气氛下搅拌16h。将反应混合物用乙酸乙酯(500mL)稀释,用盐水(500mL)洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩。将粗品通过制备型HPLC([水(NH₃H₂O+NH₄HCO₃)-ACN]55%-85%)纯化,以得到呈黄色油状物的标题化合物(1.3g,31%产率)。

[1089] (E,2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]戊-4-烯酸的制备

[1090] 向2-[(6S)-6-[(4-溴苯基)甲基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯(中间体B)(300mg,376.01mmol)、(E,2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)戊-4-烯酸苄酯(243mg,564mmol)、碳酸钠(120mg,1.13mmol)在二噁烷(5mL)和水(5mL)中的溶液中添加Pd(dppf)Cl₂(28mg,37.6mmol)。将反应混合物在80℃在氮气气氛下搅拌3h。将反应混合物浓缩,以得到粗化合物。将粗物质通过制备型HPLC([水(FA)-ACN]32%-62%)纯化,以得到呈黄色固体的标题化合物(180mg,51%产率)。 $[M+H]^+$ 实测值=932.5。

[1091] (2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]戊酸的制备

[1092] 向(E,2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]戊-4-烯酸(170mg,182mmol)在四氢呋喃(5mL)中的溶液中添加10%钯/碳(194mg,182mmol)。将反应混合物在25℃在氢气气氛(15psi)下搅拌16h。将反应混合物过滤并浓缩,以得到呈黄色油状物的粗品(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]戊酸(160mg,粗品)。LCMS(方法5-95AB,ESI): $R_T=0.820\text{min}$, $[M+H]^+=934.7$ 。

[1093] 2-[6-[[4-[(4S)-4-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-戊基]苯基]甲基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯的制备

[1094] 向(2S)-2-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]戊酸(140mg,150mmol)、2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]乙胺(53.12mg,179.83mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中的溶液中添加HATU(74.08mg,194.82mmol)、N-乙基-N-异丙基丙烷-2-胺(58.10mg,449.58mmol)。将反应混合物在25℃搅拌1h。将反应混合物用乙酸乙酯(100mL)稀释,用盐水(100mL)洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色油状物的粗2-[6-[[4-[(4S)-4-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-戊基]苯基]甲基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯(140mg,粗品)。 $[M/2+H]^+$ 实测值=606.9。

[1095] 6-[[[(1S)-1-[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]-乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基甲酰基]-4-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丁基]氨基]-6-氧代-己酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯的制备

[1096] 步骤1:向2-[6-[[4-[(4S)-4-(叔丁氧基羰基氨基)-5-[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-戊基]苯基]甲基]-4,7,10-

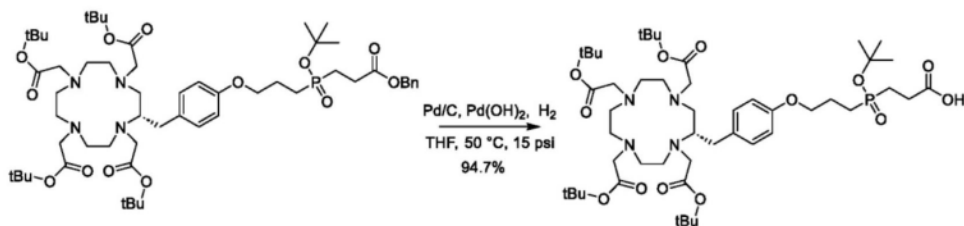
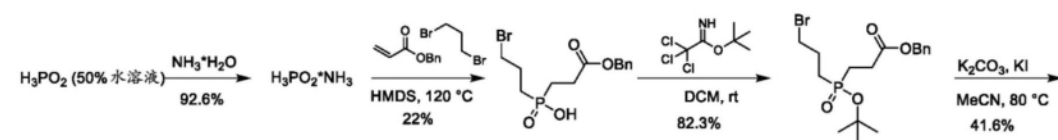
三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯(130mg, 107mmol)在HFIP(3mL)中的溶液中添加2,2,2-三氟乙酸(150mL)。将反应混合物在25℃搅拌16h。将反应混合物浓缩,以得到呈黄色油状物的粗2-[6-[[4-[(4S)-4-氨基-5-[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-戊基]苯基]甲基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯(110mg,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=1112.4。

[1097] 步骤2:向2-[6-[[4-[(4S)-4-氨基-5-[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-戊基]苯基]甲基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯(100mg, 90mmol)、N-乙基-N-异丙基丙烷-2-胺(46.5mg, 359.9mmol)在二氯甲烷(2mL)中的溶液中添加双(2,3,5,6-四氟苯基)己烷二酸酯(60mg, 135mmol)。将反应混合物在25℃搅拌16h。将反应混合物浓缩,以得到呈黄色油状物的粗6-[[[(1S)-1-[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基甲酰基]-4-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丁基]氨基]-6-氧代-己酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯(120mg,粗品)。

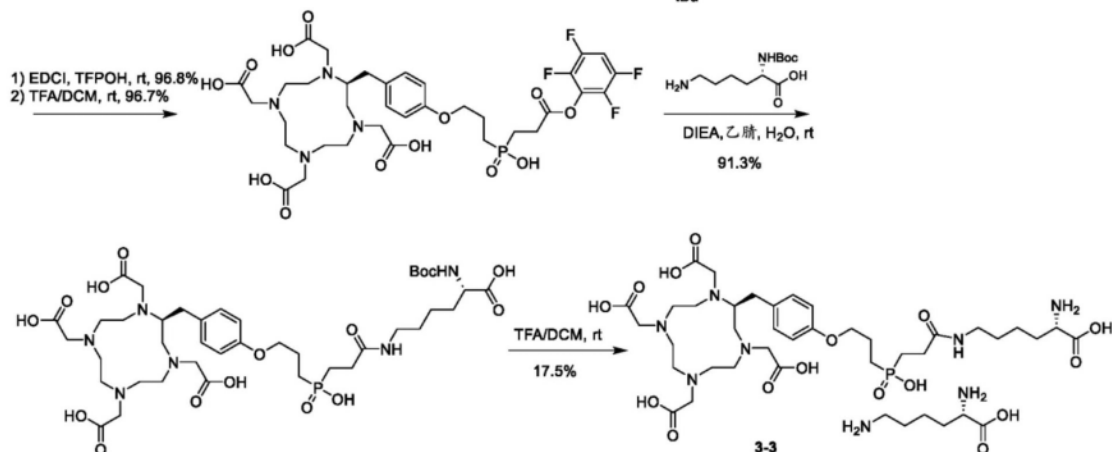
[1098] 2-[4,7,10-三(羧甲基)-6-[[4-[(4S)-5-[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)-乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-5-氧代-4-[[6-氧代-6-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-己酰基]氨基]戊基]苯基]甲基]-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸的制备

[1099] 向6-[[[(1S)-1-[2-[2-[2-[2-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基氨基甲酰基]-4-[4-[[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]甲基]苯基]丁基]氨基]-6-氧代-己酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯(120mg, 86.5mmol)在二氯甲烷(0.5mL)中的溶液中添加2,2,2-三氟乙酸(1mL)。将反应混合物在30℃搅拌16h。将反应混合物浓缩,以得到粗化合物。将粗物质通过制备型HPLC([水(FA)-ACN] 12%-42%)纯化,以得到呈白色固体的标题化合物(化合物3-2)(30mg, 14%产率,经四个步骤)。 $[M+H]^+$ 实测值=1163.7。 ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ =8.00-7.92(m, 2H), 7.16-7.09(m, 3H), 4.28-3.38(m, 24H), 3.23-2.19(m, 35H), 1.64-1.60(m, 2H), 1.59-1.51(m, 6H)。

[1100] 实施例20. 化合物3-3



[1101]



[1102] 氧卑膦酸铵的制备

[1103] 在0℃将 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (28%, 38.0g, 304mmol) 逐滴添加到氧卑膦酸 (020-1) (54%, 30.0g, 253mmol) 中。将混合物在20℃搅拌0.5h并浓缩至干, 以获得呈白色固体的氧卑膦酸铵 (19g, 92.6%产率)。(3-(苄氧基)-3-氧代丙基)(3-溴丙基)次膦酸的制备

[1104] 将氧卑膦酸铵 (020-2) (19.0g, 235mmol) 在六甲基二甲硅烷基胺 (37.9g, 235mmol) 中的混合物在氮气下在120℃搅拌1h。在冷却至0℃后, 逐滴添加丙烯酸苄酯 (38.0g, 235mmol)。将混合物在50℃搅拌2h并冷却至室温, 然后添加1,3-二溴丙烷 (142.0g, 704mmol)。将混合物在120℃再搅拌5h并用水 (100mL) 淬灭。将溶液用饱和碳酸氢钠水溶液调节至pH=7并用石油醚 (3x 200mL) 洗涤。将分离的水相用盐酸水溶液 (1M) 调节至pH=3并用乙酸乙酯 (3x 200mL) 萃取。将合并的有机层经无水硫酸钠干燥并浓缩。将残余物通过柱色谱法 (硅胶, 100-200目, 0-10%在二氯甲烷中的甲醇) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (18g, 22.0%产率)。 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 实测值=348.9。

[1105] 3-((3-溴丙基)(叔丁氧基)磷酰基)丙酸苄酯的制备

[1106] 将(3-(苄氧基)-3-氧代丙基)(3-溴丙基)次膦酸 (17.8g, 51mmol) 和2,2,2-三氯乙酰亚胺叔丁酯 (44.6g, 204mmol) 在二氯甲烷 (70mL) 中的混合物在20℃搅拌16h并过滤。将滤液浓缩至干。将残余物通过柱色谱法 (硅胶, 100-200目, 5%-50%在石油醚中的乙酸乙酯) 纯化, 以得到呈无色油状物的标题化合物 (17.0g, 82.3%产率)。 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 实测值=428.9。

[1107] 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)(叔丁氧基)磷酰基)丙氧基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[1108] 将(S)-2,2',2'',2'''-((2-(4-羟基苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯 (中间体A) (500mg, 0.68mmol)、3-((3-溴丙基)(叔丁氧基)磷酰基)丙酸

苄酯 (020-4) (276mg, 0.68mmol)、碳酸钾 (423mg, 3.06mmol) 和碘化钾 (113mg, 0.68mmol) 在乙腈 (12mL) 中的混合物在 80℃ 搅拌 16h 并过滤。将滤液浓缩至干, 并将残余物通过柱色谱法 (硅胶, 100-200 目, 0-10% 在二氯甲烷中的甲醇) 纯化, 以得到呈浅黄色油状物的标题化合物 (300mg, 41.6% 产率)。[M+H]⁺ 实测值 = 1059.9。

[1109] 3-(叔丁氧基 (3-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基) 甲基) 苯氧基) 丙基) 磷酰基) 丙酸 (020-6) 的制备

[1110] 将 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基) (叔丁氧基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸四叔丁酯 (300mg, 0.28mmol)、10% 钨/碳 (300mg, 0.28mmol) 和 20% 氢氧化钨/碳 (199mg, 0.28mmol) 在四氢呋喃 (20mL) 中的混合物在 50℃ 在氢气气氛 (15psi) 下搅拌 16h 并过滤。将滤液浓缩至干, 以得到呈浅黄色油状物的粗 3-(叔丁氧基 (3-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基) 甲基) 苯氧基) 丙基) 磷酰基) 丙酸 (260mg, 94.7% 产率)。[M+H]⁺ 实测值 = 969.6。2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(羟基 (3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-丙基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸 (020-7) 的制备

[1111] 将 3-(叔丁氧基 (3-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基) 甲基) 苯氧基) 丙基) 磷酰基) 丙酸 (260mg, 0.27mmol)、2,3,5,6-四氟苯酚 (49mg, 0.30mmol) 和 N¹-((乙基亚氨基) 亚甲基)-N³,N³-二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐 (62mg, 0.32mmol) 在二氯甲烷 (6mL) 中的混合物在 20℃ 搅拌 2h。将混合物用二氯甲烷 (150mL) 稀释, 用盐水 (50mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩至干, 以得到呈淡黄色油状物的粗 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(叔丁氧基 (3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基) 丙基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基)-

[1112] 1,4,7,10-四氮杂环-十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸四叔丁酯 (290mg, 96.8% 产率)。[M+H]⁺ 实测值 = 1117.6。

[1113] 将 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(叔丁氧基 (3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基) 丙基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸四叔丁酯 (290mg, 0.26mmol) 在二氯甲烷 (2mL) 和三氟乙酸 (4mL) 中的溶液在 30℃ 搅拌 16h 并浓缩至干, 以得到呈淡黄色油状物的标题化合物 (210mg, 96.7% 产率)。[M+H]⁺ 实测值 = 837.3。

[1114] 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-((3-(((S)-5-((叔丁氧基羰基) 氨基)-5-羧基戊基) 氨基)-3-氧代丙基) (羟基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸的制备

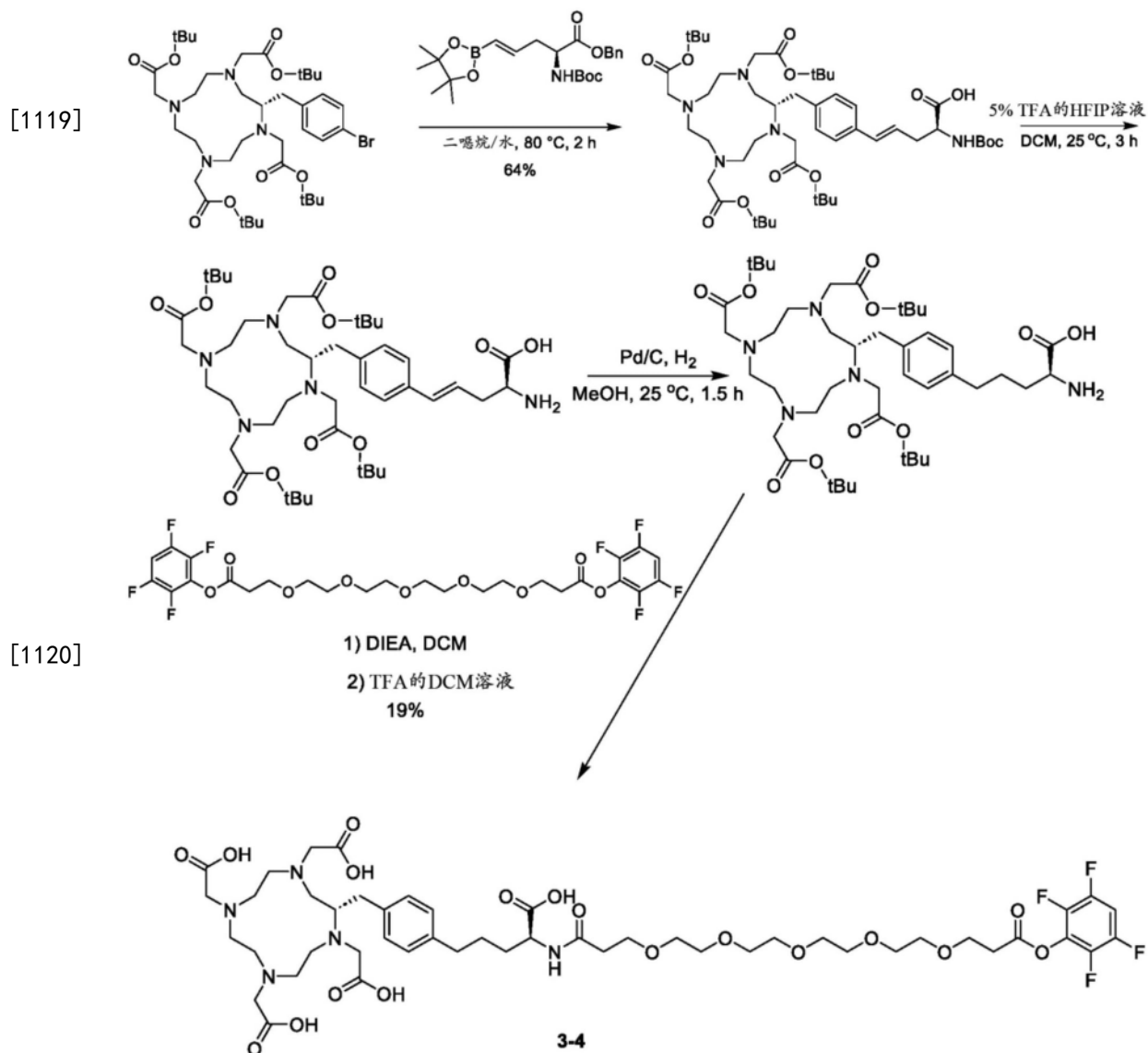
[1115] 将 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-(羟基 (3-氧代-3-(2,3,5,6-四氟苯氧基) 丙基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸 (200mg, 0.24mmol)、(S)-6-氨基-2-((叔丁氧基羰基) 氨基) 己酸 (118mg, 0.48mmol) 和 N-乙基-N-异丙基丙烷-2-胺 (124mg, 0.96mmol) 在二氯甲烷 (5mL) 中的混合物在 20℃ 搅拌 3h 并浓缩至干, 以得到呈淡黄色油状物的粗 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-((3-(((S)-5-((叔丁氧基羰基) 氨基)-5-羧基戊基) 氨基)-3-氧代丙基) (羟基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸 (200mg, 91.3% 产率)。[M+H]⁺ 实测值 = 917.6。

[1116] 2,2',2'',2'''-((2S)-2-(4-(3-((3-(((S)-5-氨基-5-羧基戊基) 氨基)-3-氧代丙基

基) (羟基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基) -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸的制备

[1117] 将2,2',2'',2'''-(2S)-2-(4-(3-((3-(((S)-5-((叔丁氧基羰基)氨基)-5-羧基戊基)氨基)-3-氧代丙基) (羟基) 磷酰基) 丙氧基) 苄基) -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) 四乙酸 (200mg, 0.22mmol) 在三氟乙酸 (1.5mL) 和二氯甲烷 (1.5mL) 中的溶液在30℃搅拌16h并浓缩至干。将残余物通过制备型HPLC ([水 (HCl) -ACN] 12% -42%) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物 (化合物3-3) (31mg, 17.5% 产率)。[M+H]⁺实测值=817.4。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.16 (br s, 2H), 7.95 (t, J=5.6Hz, 1H), 7.14 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.85 (d, J=8.8Hz, 2H), 3.97 (t, J=6.0Hz, 2H), 3.92-3.77 (m, 5H), 3.19-2.69 (m, 26H), 2.42-2.34 (m, 2H), 2.29-2.22 (m, 2H), 1.92-1.62 (m, 2H), 1.45-1.21 (m, 4H)。

[1118] 实施例21. 化合物3-4



[1121] (S,E)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-5-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)戊-4-烯酸的制备

[1122] 向2,2',2'',2'''-(2-(4-溴苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基) (S)-四乙酸四叔丁酯 (中间体B) (600mg, 752.01μmol)、(S,E)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-5-

(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)戊-4-烯酸苄酯(356.8mg,827.21 μ mol)和1,1-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯钯(II)(55.0mg,75.20 μ mol)在二噁烷(6mL)和水(4mL)中的溶液中添加碳酸钠(239.1mg,2.26mmol)。将反应在80℃搅拌2h。将混合物用乙酸乙酯(50mL)稀释,用盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩至干。将粗产物通过制备型HPLC(水(FA)-CAN 26%-56%)纯化,以得到呈棕色固体的标题化合物(450mg,64%产率)。 $[M+H]^+$ 实测值=932.7。

[1123] (S,E)-2-氨基-5-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)戊-4-烯酸的制备

[1124] 向(S,E)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-5-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)戊-4-烯酸(021-2)(400mg,429.10 μ mol)在二氯甲烷中的溶液中添加5%2,2,2-三氟乙酸的1,1,1,3,3,3-六氟丙烷-2-醇溶液(4mL)。将反应在25℃搅拌3h。将反应混合物浓缩,以得到呈棕色油状物的标题化合物。 $[M+H]^+$ 实测值=833。

[1125] (S)-2-氨基-5-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)戊酸的制备

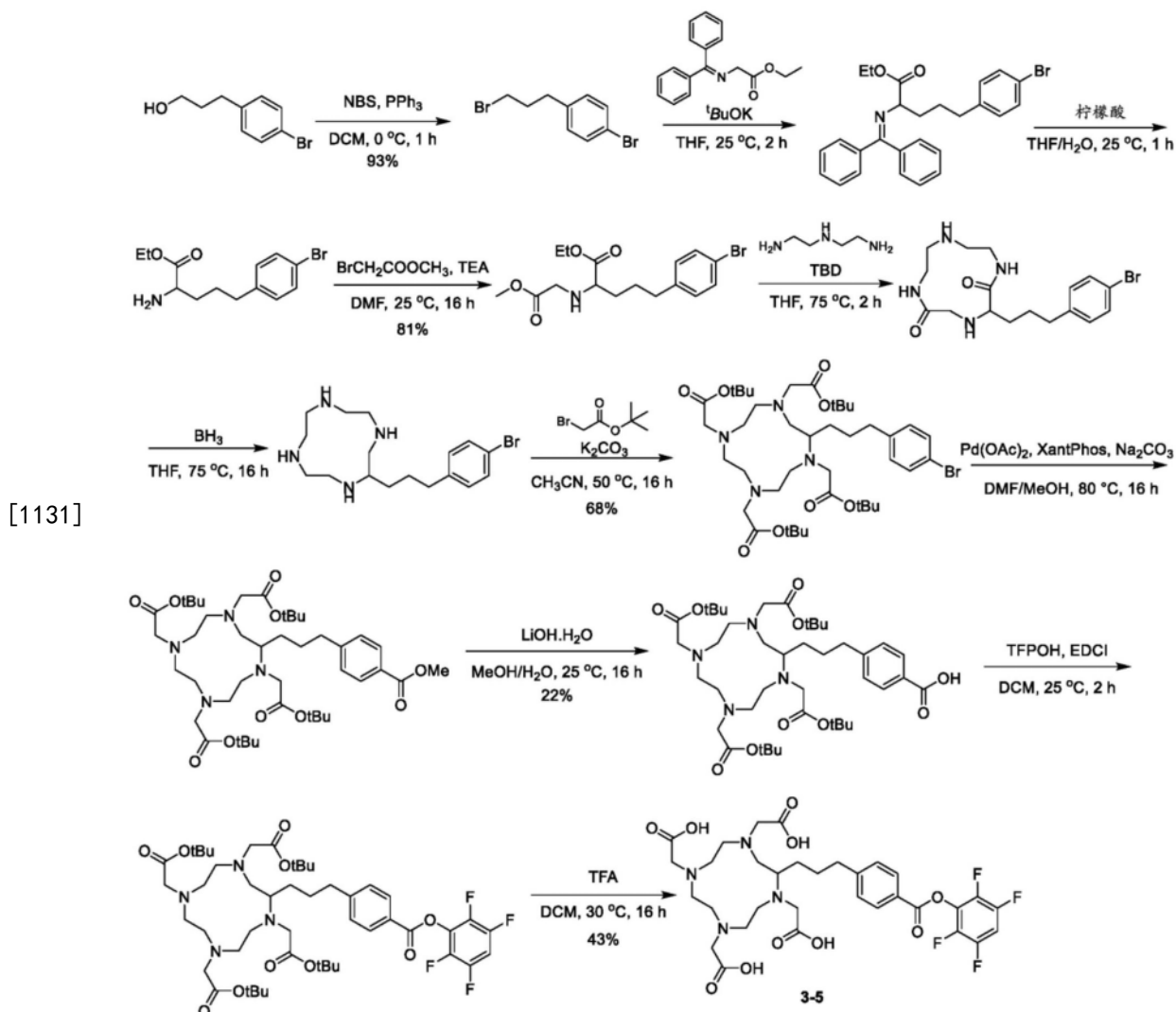
[1126] 向(S,E)-2-氨基-5-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)戊-4-烯酸(350mg,420.64 μ mol)在甲醇(5mL)中的溶液中添加10%钯/碳(447.6mg,420.64 μ mol)。将反应在25℃在氢气气氛下搅拌2h。将反应混合物过滤并浓缩,以得到呈黄色油状物的标题化合物(021-4)(340mg,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=835.4。

[1127] 2,2',2'',2'''-(((S)-2-(4-((S)-21-羧基-1,19-二氧代-1-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-4,7,10,13,16-五氧杂-20-氮杂二十四烷-24-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[1128] 步骤1:向(S)-2-氨基-5-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)戊酸(160mg,191.83 μ mol)、4,7,10,13,16-五氧杂十九烷二酸双(2,3,5,6-四氟苯基)酯(97.4mg,153.46 μ mol)在二氯甲烷(3mL)中的溶液中添加N-乙基-N-异丙基丙烷-2-胺(62mg,479.56 μ mol)。将反应在25℃搅拌2h。将反应混合物用二氯甲烷(20mL)稀释,用盐水(50mL)洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色油状物的(S)-4,22-二氧代-22-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-2-(3-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)丙基)-7,10,13,16,19-五氧杂-3-氮杂二十二烷酸(150mg,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=1303。

[1129] 步骤2:向(S)-4,22-二氧代-22-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-2-(3-(4-(((S)-1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)丙基)-7,10,13,16,19-五氧杂-3-氮杂二十二烷酸(150mg,115.16 μ mol)在二氯甲烷(1mL)中的溶液中添加2,2,2-三氟乙酸(2mL)。将反应在25℃搅拌16h。将反应混合物浓缩。将粗产物通过制备型HPLC(水(TFA)-ACN 12%-42%)纯化,以得到呈黄色固体的标题化合物(化合物3-4)(23.6mg,19%产率)。 $[M+H]^+$ 实测值=539.9。 ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ =8.12(d,J=8.0Hz,1H),7.98-7.88(m,1H),7.20-7.11(m,4H),3.53-3.45(m,50H),2.42-2.30(m,2H),1.73-1.60(m,2H),1.59-1.54(m,2H)。

[1130] 实施例22. 化合物3-5



[1132] 2-(二苯亚甲基氨基)-5-(4-溴苯基)戊酸乙酯的制备

[1133] 在0℃向1-溴-4-(3-溴丙基)苯(6g, 21.58mmol)在四氢呋喃(100mL)中的溶液中添加2-(二苯亚甲基氨基)乙酸乙酯(6.92g, 25.90mmol)和2-甲基丙烷-2-醇钾(2.91g, 25.90mmol)。将反应混合物在25℃搅拌2h。将反应混合物用乙酸乙酯(100mL)稀释,用水(100mL)和盐水(50mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色油状物的2-(二苯亚甲基氨基)-5-(4-溴苯基)戊酸乙酯(10g,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=464.0。

[1134] 2-氨基-5-(4-溴苯基)戊酸乙酯的制备

[1135] 向2-(二苯亚甲基氨基)-5-(4-溴苯基)戊酸乙酯(10g, 21.53mmol)在四氢呋喃(50mL)和水(50mL)中的溶液中添加柠檬酸水合物(22.6g, 107.65mmol)。将反应混合物在25℃搅拌1h。将反应混合物用HCl(1M)调节至pH=6并用乙酸乙酯(200mL)萃取。将水相用饱和碳酸钠调节至pH=8。将水相用乙酸乙酯(500mL)萃取。将有机层分离,经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色油状物的2-氨基-5-(4-溴苯基)戊酸乙酯(3.8g,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=301.9。5-(4-溴苯基)-2-[(2-甲氧基-2-氧代-乙基)氨基]戊酸乙酯的制备

[1136] 向2-氨基-5-(4-溴苯基)戊酸乙酯(3.8g, 12.66mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(30mL)中的溶液中添加三乙胺(3.84g, 37.98mmol, 5.29mL)和2-溴乙酸甲酯(3.49g, 22.79mmol,

2.15mL)。将反应混合物在25℃搅拌16h。将反应混合物用乙酸乙酯(80mL)稀释,用水(100mL)和盐水(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法(硅胶,100-200目,0%-30%在石油醚中的乙酸乙酯)纯化,以得到呈黄色油状物的5-(4-溴苯基)-2-[(2-甲氧基-2-氧代-乙基)氨基]戊酸乙酯(3.8g,81%产率)。 $[M+H]^+$ 实测值=373.7。

[1137] 3-[3-(4-溴苯基)丙基]-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮的制备

[1138] 向5-(4-溴苯基)-2-[(2-甲氧基-2-氧代-乙基)氨基]戊酸乙酯(3.8g,10.21mmol)在四氢呋喃(5mL)中的溶液中添加N'-(2-氨基乙基)乙烷-1,2-二胺(1.26g,12.25mmol,1.32mL)和3,4,6,7,8,9-六氢-2H-嘧啶并[1,2-a]嘧啶(426mg,3.06mmol)。将反应混合物在75℃在氮气气氛下搅拌2h。将反应混合物在减压下浓缩。向残余物中添加水(100mL)并再搅拌30min。将所得混合物过滤。将滤液浓缩,以得到呈白色固体的标题化合物(022-6)(1.4g,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=398.6。

[1139] 2-[3-(4-溴苯基)丙基]-1,4,7,10-四氮杂环十二烷的制备

[1140] 向3-[3-(4-溴苯基)丙基]-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2,6-二酮(1g,2.52mmol)在四氢呋喃(30mL)中的溶液中添加在二甲基硫烷中的硼烷(10M,7.55mL)。将反应混合物在75℃在氮气气氛下搅拌16h。在氮气气氛下,将反应混合物通过甲醇(15mL)缓慢淬灭。将混合物在减压下浓缩。添加浓HCl(12M,3mL)和水(3mL)。将所得混合物在100℃搅拌3h。将反应混合物用碳酸钾调节至pH=7。将混合物浓缩以去除水。向残余物中添加10%在二氯甲烷中的甲醇(100mL)并搅拌15min。将所得混合物过滤并浓缩,以得到呈黄色油状物的标题化合物(920mg,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=369.0。

[1141] 2-[6-[3-(4-溴苯基)丙基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯的制备

[1142] 向2-[3-(4-溴苯基)丙基]-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(920mg,2.49mmol)在乙腈(30mL)中的混合物中添加2-溴乙酸叔丁酯(2.92g,14.95mmol,2.21mL)和碳酸钾(2.75g,19.93mmol)。将反应混合物在50℃搅拌16h。将反应混合物过滤并在减压下浓缩。将残余物通过制备型HPLC(水(TFA)-ACN 29%-59%)纯化,以得到呈黄色固体的标题化合物(1.4g,68%产率)。 $[M+H]^+$ 实测值=827.5。

[1143] 4-[3-[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]丙基]苯甲酸甲酯的制备

[1144] 将2-[6-[3-(4-溴苯基)丙基]-4,7,10-三(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸叔丁酯(300mg,363.2 μ mol)、碳酸钠(77.0mg,726.5 μ mol)、甲醇(233mg,7.26mmol,293.97 μ L)、Xantphos(21.0mg,36.32 μ mol)和Pd(OAc)₂(8.2mg,36.3 μ mol)在N,N-二甲基甲酰胺(5mL)中的混合物在80℃在一氧化碳气氛下搅拌16h。将反应混合物用乙酸乙酯(20mL)稀释,用水(10mL)和盐水(2x 10mL)洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并浓缩,以得到呈黄色油状物的标题化合物(290mg,粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=805.6。

[1145] 4-[3-[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]丙基]苯甲酸的制备

[1146] 向4-[3-[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]丙基]苯甲酸甲酯(290mg,360.2 μ mol)在甲醇(1mL)和水(1mL)中的溶液中添加氢氧化锂

水合物 (22.7mg, 540.3 μ mol)。将反应混合物在25℃搅拌16h。将反应混合物用HCl (1M) 调节至pH=6, 用乙酸乙酯 (20mL) 萃取, 用盐水 (20mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将残余物通过制备型HPLC (水 (TFA) -ACN 30%-60%) 纯化, 以得到呈无色油状物的标题化合物 (65mg, 22% 产率)。 $[M+H]^+$ 实测值=791.6。

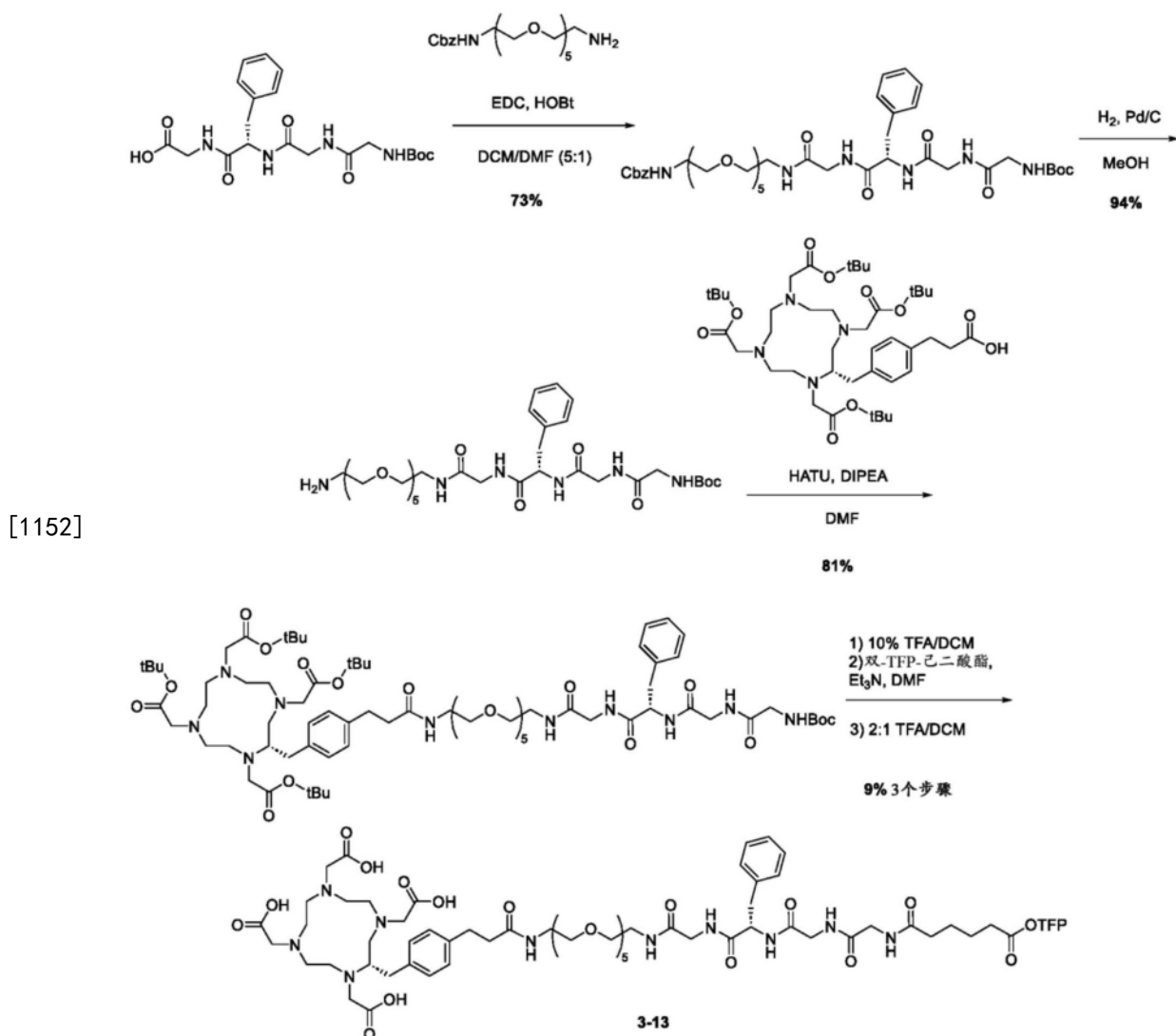
[1147] 4-[3-[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]丙基]苯甲酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯的制备

[1148] 向4-[3-[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]丙基]苯甲酸(106mg, 134.0 μ mol) 和2,3,5,6-四氟苯酚(26.7mg, 160.8 μ mol) 在二氯甲烷(5mL) 中的溶液中添加 N^1 -((乙基亚氨基)亚甲基)- N^3 , N^3 -二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐(30.83mg, 160.80 μ mol)。将反应混合物在25℃搅拌2h。将反应混合物用二氯甲烷(20mL) 稀释, 用水(10mL) 和盐水(2x 10mL) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥并浓缩, 以得到呈黄色油状物的标题化合物(125mg, 粗品)。 $[M+H]^+$ 实测值=939.5。

[1149] 2-[4,7,10-三(羧甲基)-6-[3-[4-(2,3,5,6-四氟苯氧基)羰基-苯基]丙基]-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]乙酸的制备

[1150] 向4-[3-[1,4,7,10-四(2-叔丁氧基-2-氧代-乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-2-基]丙基]苯甲酸(2,3,5,6-四氟苯基)酯(125mg, 133.1 μ mol) 在二氯甲烷(2mL) 中的溶液中添加2,2,2-三氟乙酸(6.16g, 54.02mmol, 4mL)。将反应混合物在30℃搅拌16h。将反应混合物在减压下浓缩。将残余物通过制备型HPLC (水 (TFA) -ACN 15%-45%) 纯化, 以得到呈白色固体的标题化合物(化合物3-5) (50mg, 43% 产率)。 $[M+H]^+$ 实测值=715.3。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ =8.14-8.12 (m, 2H), 8.05-7.99 (m, 1H), 7.53-7.51 (m, 2H), 3.97-3.67 (m, 9H), 3.16-2.50 (m, 16H), 1.72-1.62 (m, 3H), 1.30-1.24 (m, 1H)。

[1151] 实施例23. 化合物3-13



[1153] (7-苄基-2,5,8,11-四氧代-15,18,21,24,27-五氧杂-3,6,9,12-四氮杂二十九烷-1,29-二基) (S)-二氨基甲酸苄基叔丁酯的制备将DIPEA (82 μ L, 0.458mmol) 添加到EDC.HCl (66mg, 0.344mmol) 和1-羟基苯并三唑水合物 (53mg, 0.344mmol) 在DMF (1.0mL) 中的溶液中。将该溶液添加到(叔丁氧基羰基)甘氨酸基甘氨酸基-L-苯基丙氨酸基甘氨酸 (100mg, 0.229mmol) 在DMF (1.0mL) 中的溶液中。将(3,6,9,12,15-五氧杂十七烷-1,17-二基)二氨基甲酸二苄酯 (114mg, 0.229mmol) 溶解在DMF (1.0mL) 中。将第一混合物逐滴添加到其中。将反应在室温搅拌36h。存在通过LC-MS确认的所需产物形成,并且将DMF在高真空中蒸发。将粗残余物溶解于DCM中并用饱和NaHCO₃溶液 (2x) 洗涤。将DCM层经硫酸钠干燥,过滤,并在真空中浓缩,以产生良好纯度的粗品经保护的中间体 (140mg, 73%)。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.28 (d, J=5.4Hz, 1H), 8.20 (d, J=6.9Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.42-7.35 (m, 2H), 7.35-7.18 (m, 5H), 5.52 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.59-4.48 (m, 2H), 3.96-3.81 (m, 1H), 3.81-3.67 (m, 2H), 3.44-3.28 (m, 20H), 1.47 (s, 9H)。m/z 实测值=833.4 (M+H)。

[1154] (S)-(29-氨基-7-苄基-2,5,8,11-四氧代-15,18,21,24,27-五氧杂-3,6,9,12-四氮杂二十九烷基)氨基甲酸叔丁酯的制备

[1155] 将化合物(7-苄基-2,5,8,11-四氧代-15,18,21,24,27-五氧杂-3,6,9,12-四氮杂二十九烷-1,29-二基) (S)-二氨基甲酸苄基叔丁酯 (140mg, 0.168mmol) 直接溶解于甲醇

(4mL)中。将反应混合物用N₂气吹扫,然后使所添加的Pd/C(14mg,10%)悬浮。将反应混合物再次用N₂气吹扫并在室温在气球中的氢气气氛下搅拌过夜。HPLC表明所需产物的完全转化。将反应混合物通过0.2μm无菌过滤器过滤。将甲醇层经硫酸钠干燥,过滤,并在真空中浓缩,以产生良好纯度的粗品经保护的中间体(110mg,94%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ7.36-7.20(m,5H),4.73-4.59(m,1H),4.54-4.41(m,1H),3.97-3.80(m,2H),3.80-3.72(m,3H),3.72-3.62(m,20H),3.47-3.36(m,2H),3.18-3.10(m,2H),3.06-2.94(m,2H),1.47(s,9H)。m/z实测值=699.4(M+H)。

[1156] 2,2',2'',2'''-(2-(4-((S)-12-苄基-2,2-二甲基-4,7,10,13,16,36-六氧代-3,20,23,26,29,32-六氧杂-5,8,11,14,17,35-六氮杂三十八烷-38-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[1157] 将DIPEA(45μL,0.253mmol)添加到HBTU(44.4mg,0.190mmol)在DMF(1.0mL)中的溶液中。将该溶液添加到在DMF(1.0mL)中的3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苯基)丙酸(100mg,0.126mmol)中。将化合物(S)-(29-氨基-7-苄基-2,5,8,11-四氧代-15,18,21,24,27-五氧杂-3,6,9,12-四氮杂二十九烷基)氨基甲酸叔丁酯(106mg,0.126mmol)溶解在DMF(1.0mL)中。将第一混合物逐滴添加到其中。将反应在室温搅拌36h。存在通过LC-MS确认的所需产物形成,并且将DMF在高真空下蒸发。将粗残余物溶解于DCM中并用饱和NaHCO₃溶液(2x)洗涤。将DCM层经硫酸钠干燥,过滤,并在真空中浓缩,以产生良好纯度的粗品经保护的中间体(150mg,81%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ7.34-7.13(m,9H),4.64(s,2H),4.52(s,2H),3.98-3.82(m,4H),3.82-3.69(m,4H),3.69-3.61(m,20H),3.54-3.43(m,2H),3.42-3.36(m,6H),3.26-3.18(m,2H),3.18-3.13(m,2H),3.08-2.75(m,8H),2.75-2.42(m,4H),2.35-2.19(m,2H),2.19-2.03(m,4H),1.55(s,9H),1.53(s,18H),1.51(s,9H),1.48(s,9H)。m/z实测值=1471.80(M+H)。

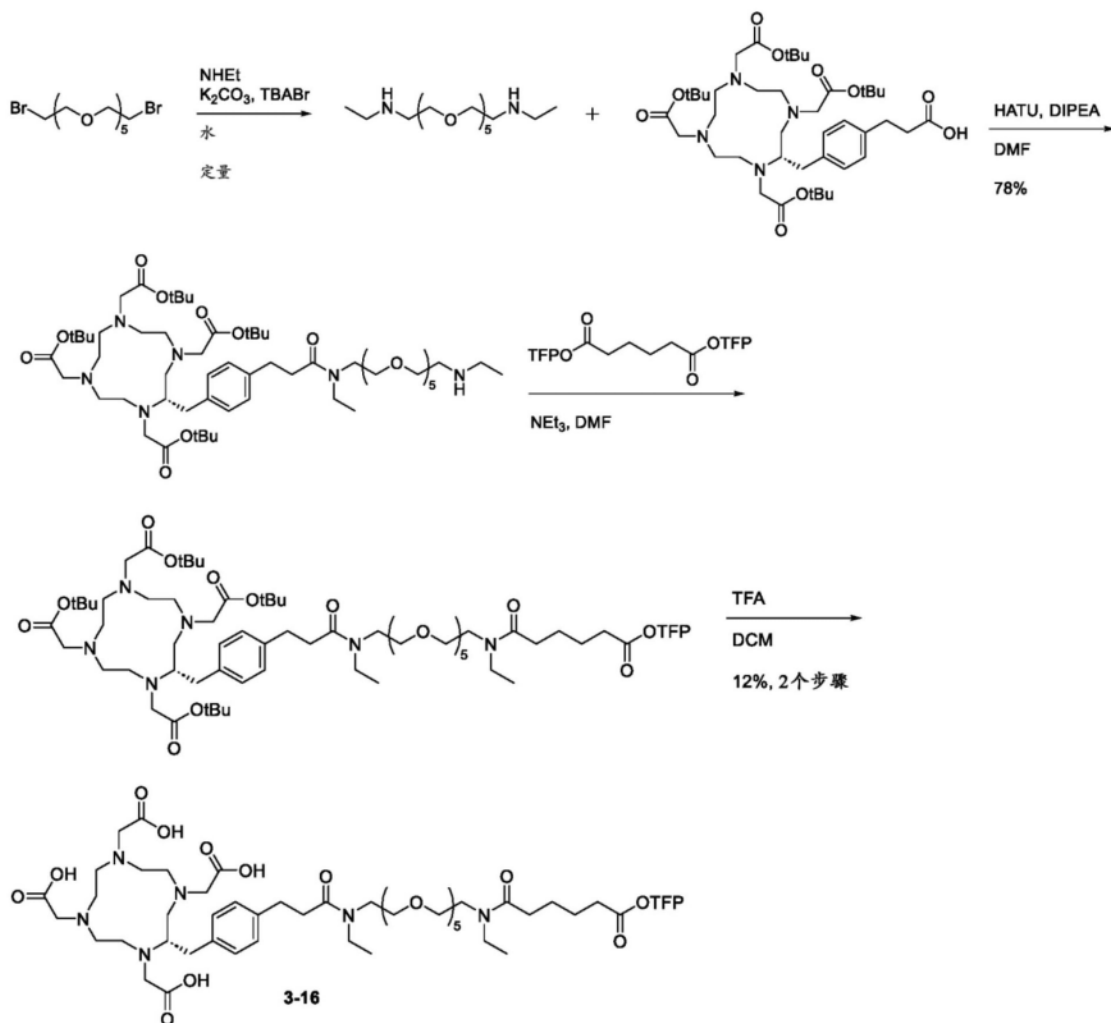
[1158] 2,2',2'',2'''-(2-(4-((S)-27-苄基-3,23,26,29,32,35,40-七氧代-40-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-7,10,13,16,19-五氧杂-4,22,25,28,31,34-六氮杂四十烷基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯的制备

[1159] 将化合物2,2',2'',2'''-(2-(4-((S)-12-苄基-2,2-二甲基-4,7,10,13,16,36-六氧代-3,20,23,26,29,32-六氧杂-5,8,11,14,17,35-六氮杂三十八烷-38-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸四叔丁酯(150mg,0.102mmol)溶解于DCM(2.7mL)中,并添加TFA(0.3mL)。1h后,HPLC显示无Boc保护的衍生物的起始材料。将反应在真空中浓缩并与DCM共蒸发一次。在超声处理下,将粗油状物用二乙醚研磨2次并通过过滤收集,以产生粗残余物(130mg,93%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ7.42-7.19(m,9H),4.60-4.45(m,2H),4.45-4.33(m,2H),4.09-3.86(m,6H),3.86-3.78(m,4H),3.78-3.61(m,20H),3.61-3.56(m,2H),3.56-3.41(m,10H),3.37(s,2H),3.26-3.13(m,1H),3.13-2.84(m,4H),2.85-2.55(m,4H),1.73-1.43(m,4H),1.22(s,10H),1.20(s,18H),1.18(s,9H)。

[1160] 将来自前一步骤的粗中间体(130mg,0.095mmol)直接溶解于DMF(2mL)中。向该混合物中添加DIPEA(49μL,0.284mmol)和双(2,3,5,6-四氟苯基)己烷二酸酯(126mg,0.284mmol)并在室温搅拌18h。将反应混合物在高真空下蒸发。将残余物溶解在DCM中并用盐水(2x)溶液洗涤。将DCM层经硫酸钠干燥,过滤,并在真空中浓缩,以产生良好纯度粗品的经保护的中间体(130mg,83%)。

[1161] 将来自前一步骤的粗中间体 (130mg, 0.079mmol) 溶解于DCM (1mL) 中并添加TFA (2mL)。18h后, HPLC显示无起始材料或叔丁基中间体剩余。将反应在真空中浓缩并与DCM共蒸发一次。在超声处理下, 将粗油状物用二乙醚研磨2次并通过过滤收集, 以产生粗残余物。将残余物用50% ACN/水 (5.0mL) 稀释并通过直接注射到制备型HPLC (梯度为20% -60% ACN/水+0.1% TFA) 上纯化, 以产生呈白色粉末 (约1x TFA盐) 的化合物3-13 (10.3mg, 9%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ7.29-7.15 (m, 3H), 7.15-7.04 (m, 7H), 4.51-4.42 (m, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.77-3.61 (m, 4H), 3.53 (d, J=6.2Hz, 2H), 3.45 (d, J=5.6Hz, 4H), 3.37 (t, J=5.3Hz, 4H), 3.28-3.21 (m, 8H), 3.17 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.12-3.02 (m, 2H), 3.01-2.84 (m, 2H), 2.84-2.71 (m, 4H), 2.68 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.42 (t, J=7.3Hz, 4H), 2.28 (t, J=6.9Hz, 4H), 1.75-1.55 (m, 6H)。m/z实测值=1423.50 (M+H)。

[1162] 实施例24. 化合物3-16



[1164] N¹, N¹⁷-二乙基-3,6,9,12,15-五氧杂十七烷-1,17-二胺的制备

[1165] 在0℃向溴-PEG5-溴化物 (500mg, 1.23mmol) 在水 (1.75mL, 97.1mmol) 中的溶液中添加碳酸钾 (847mg, 6.13mmol)、叔丁基溴化铵 (18.9mg, 123μmol) 和乙胺 (627mg, 13.9mmol)。30min后, 去除冰浴并将反应搅拌18h。将溶液用盐水稀释, 然后用CH₂Cl₂萃取六次。将有机层用盐水洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩, 以得到呈无色油状物的标题化合物 (412mg, 定量产率)。m/z实测值=337.2 (M+H)。¹H (DMSO-d₆) : δ 3.54-3.49 (m, 18H), 3.44

(t, J=5.8Hz, 4H), 2.64(t, J=5.8Hz, 4H), 2.64(q, J=7.1Hz, 4H), 0.99(t, J=7.2Hz, 6H)。

[1166] 2,2',2'',2'''-(2-(4-(21-乙基-22-氧代-6,9,12,15,18-五氧杂-3,21-二氮杂二十四烷-24-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)(S)-四乙酸四叔丁酯的制备将3-(4-((1,4,7,10-四(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-基)甲基)苄基)丙酸(100mg, 0.126mmol)溶解在DMF(3mL)中并置于氮气气氛下。然后将DIPEA(96.9μL, 556μmol)和HATU(130mg, 328μmol)添加到溶液中,随后添加以上中间体(196mg, 582μmol)在DMF(2mL)中的溶液。在室温1h后,SM仍然明显,但主峰是所需产物。将反应混合物在50℃搅拌2h,倒入水中,用EtOAc萃取,经无水Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩。然后将粗残余物用Et₂O研磨三次并在减压下浓缩,以得到呈橙色油状物的标题化合物(108mg, 77%产率)。m/z实测值=1109.6(M+H)。

[1167] 2,2',2'',2'''-(2-(4-(4,22-二乙基-3,23,28-三氧代-28-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-7,10,13,16,19-五氧杂-4,22-二氮杂二十八基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)(S)-四乙酸四叔丁酯的制备

[1168] 向2,2',2'',2'''-(2-(4-(21-乙基-22-氧代-6,9,12,15,18-五氧杂-3,21-二氮杂二十四烷-24-基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)(S)-四乙酸四叔丁酯(0.1g, 90.1μmol)在二甲基甲酰胺(9.01mL, 116mmol)中的溶液中添加三乙胺(105μL, 750μmol),随后添加双(2,3,5,6-四氟苯基)己二酸酯(140mg, 3.5当量, 315μmol)。将反应在室温搅拌1h 20min并在减压下浓缩,以得到呈棕色油状物的粗TFP酯中间体。m/z=693.5(M+2H)。

[1169] (S)-2,2',2'',2'''-(2-(4-(4,22-二乙基-3,23,28-三氧代-28-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-7,10,13,16,19-五氧杂-4,22-二氮杂二十八基)苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸的制备

[1170] 将来自以上的TFP酯中间体溶解在二氯甲烷(1mL)中并添加三氟乙酸(2mL)。将反应搅拌18h,浓缩,并通过制备型HPLC(40%-60% ACN/H₂O+0.1% TFA)纯化,以得到呈白色粉末的标题化合物(化合物3-16)(12.5mg, 12%产率)。m/z实测值=1161.4(M+H)。¹H NMR(500MHz, DMSO)δ7.94(tt, J=10.8, 7.3Hz, 1H), 7.18(d, J=5.5Hz, 4H), 4.11-3.81(m, 9H), 3.50(m, 28H), 2.79(m, 8H), 2.66-2.55(m, 5H), 2.36(dt, J=12.6, 7.3Hz, 4H), 1.69(h, J=7.6Hz, 3H), 1.60(p, J=7.6Hz, 3H), 1.13-0.96(m, 8H)。

[1171] 实施例25. 化合物4-1(p-SCN-Bn-DOTA, 在一些图中为“SL”)

[1172] 在一些例子中,螯合因子-接头是化合物4-1((R)-2,2',2'',2'''-(2-(4-异硫氰基苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四基)四乙酸),其来自Macrocyclics(Plano, TX;目录号:B-205)。

[1173] 实施例26. 代表性比较实施例的合成

[1174] 化合物4-2(TFP-己二酸酯-PEG5-DOTAGA, 在一些图中为“LL”): 在一些例子中,螯合因子-接头是化合物4-2,其根据PCT/IB2022/000077中的实施例制备。

[1175] 化合物4-3(TFP-己二酸酯-PEG5-Py4Pa): 在一些例子中,螯合因子-接头是化合物4-3,其根据PCT/IB2022/000077中的实施例制备。

[1176] 化合物4-4(p-SCN-Bn-Et-Py4Pa): 在一些例子中,螯合因子-接头是化合物4-4,其通过遵循L Li等人Bioconjugate Chem. 2021, 32, 1348-1363中的条件而制备。

[1177] 生物学实施例

[1178] 下文实施例描述了放射性同位素递送平台,其大小介于60kDa与110kDa之间,并且与传统的IgG相比,其半衰期更短(例如,4天或更短),但是与较小的单体抗体片段形式(例如,大于10小时)相比,其半衰期更长。此外,本文所提供的某些放射性同位素递送平台表现出体外或体内的稳定性高、免疫原性低以及合适的治疗窗。这些放射性同位素递送平台优选用于在体内靶向放射性同位素以治疗疾病。通过与半衰期超过4天和/或分子量低于60kDa的抗体相比,表现出不良作用减少,这些放射性同位素递送平台特别可用于在对象中安全且有效地靶向递送 α 发射体。

[1179] 下文,在某些短语中,“Fc部分”关于变体恒定结构域而使用,并且“铰链”关于“铰链区”而使用,如本领域普通技术人员将理解的那样。

[1180] 实施例B-1.抗体产生

[1181] 通过将具有铰链和Fc部分(人IgG1 CH2-CH3)的VHH序列克隆到哺乳动物表达载体中来生成VHH-Fc质粒。在一些情况下,将突变引入到Fc部分中。为了产生重组VHH-Fc及其变体,将质粒转染到HEK293.SUS细胞(ATUM或类似细胞)中。在分泌3-5天之后,通过离心和无菌过滤从含有抗体的上清液中清除掉细胞。使用Mab Select SuRe PCC柱(GE,目录号:11003495)纯化抗体,并且将缓冲液更换为pH 7.0的PBS。使用A280或BCA定量蛋白质。使用标准规程,通过SDS-PAGE、毛细管电泳、HPLC-SEC和LC-MS测试抗体的纯度。关于VHH多肽,参见例如McMahon等人,Nature Structural&Molecular Biology|VOL 25|2018年3月|289-296Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies;Moutel等人,eLife 2016;5:e16228 NaLi-H1:A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies;De Genst E,Saerens D,Muyldermans S,Conrath K.Antibody repertoire development in camelids.Dev Comp Immunol.2006;30(1-2):187-98.doi:10.1016/j.dci.2005.06.010.PMID:16051357;Vincke C,Gutiérrez C,Wernery U,Devoogdt N,Hassanzadeh-Ghassabeh G,Muyldermans S.Generation of singledomain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs.Methods Mol Biol.2012;907:145-76.doi:10.1007/978-1-61779-974-7_8.PMID:22907350;Arbabi Ghahroudi M,Desmyter A,Wyns L,Hamers R,Muyldermans S.Selection and identification of singledomain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies.FEBS Lett.1997Sep15;414(3):521-6.doi:10.1016/s0014-5793(97)01062-4.PMID:9323027。

[1182] 对于VHH人源化,参见例如,Vincke C,Loris R,Saerens D,Martinez-Rodriguez S,Muyldermans S,Conrath K.General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold.J Biol Chem.2009Jan 30;284(5):3273-84.doi:10.1074/jbc.M806889200.Epub 2008Nov 14.PMID:19010777。

[1183] 对于VHH稳定性,参见例如,Kunz P,Flock T,Soler N,Zaiss M,Vincke C,Sterckx Y,Kastelic D,Muyldermans S,Hoheisel JD.Exploiting sequence and stability information for directing nanobody stability engineering.Biochim

Biophys Acta Gen Subj.2017Sep;1861(9):2196-2205.doi:10.1016/j.bbagen.2017.06.014.Epub 2017Jun 20.PMID:28642127;PMCID:PMC5548252;Kunz P, Zinner K,Mücke N,Bartoschik T,Muyldermans S,Hoheisel JD.The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance.Sci Rep.2018May 21;8(1):7934.doi:10.1038/s41598-018-26338-z.PMID:29784954;PMCID:PMC5962586。

[1184] 许多VHH-Fc原型和变体是使用VHH序列工程化的,诸如抗HER2克隆2RS15d VHH(参见例如,W02016/016021) (SEQ ID NO:20) 和抗DLL3克隆hz10D9v7.251 VHH序列(参见例如,W02020/07967) (SEQ ID NO:30),除非本文另外说明,否则收集和显示的数据是使用这些克隆的VHH抗原结合区获得的。

[1185]

表1-构建体			
VHH Fc 名称	FcRn 突变体	Fc 效应子突变体	靶标
H101	wt	wt	HER2
D102	wt	wt	DLL3
H105	I253A	wt	HER2
H106	S254A	wt	HER2
H107	H310A	wt	HER2
H108	H435Q	wt	HER2
H109	Y463A	wt	HER2
D111	I253A	wt	DLL3
D112	S254A	wt	DLL3
D113	H310A	wt	DLL3
D114	H435Q	wt	DLL3
D115	Y463A	wt	DLL3
H133	wt	AEASS	HER2
D134	wt	AEASS	DLL3
H135	H310A	AEASS	HER2
D136	H310A	AEASS	DLL3
H137	H435Q	AEASS	HER2
D138	H435Q	AEASS	DLL3
根据EU编号的变体; AEASS= L234A, L235E, G237A, A330S 和P331S			

[1186] 实施例B-2. 抗体结合特性: 针对靶蛋白和靶细胞的测定

[1187] 根据标准规程,通过ELISA评估VHH-Fc与靶可溶性蛋白(人、鼠科动物和食蟹猴直系同源物,视情况而定)的结合。抗原是商业来源的,或者通过将已知抗原序列(Uniprot)克隆到具有HIS、FLAG或用于纯化和检测目的的等同标签的哺乳动物表达载体中来生产。包括了可商购获得的对照抗靶标IgG。将板(96孔maxisorp,Corning3368)涂覆50μL至100μL浓度经过优化以便包被的各感兴趣的靶蛋白。以起始浓度200nM至400nM制备纯化的VHH-Fc和hIgG1同种型对照(Sigma,目录号I5154),并且1:4向下滴定。在室温(RT)下将一抗孵育1小时并洗涤之后,添加0.2ug/ml HRP标记的二抗,并且在RT下孵育1h(山羊抗人IgG-Fc-HRP Jackson,目录号109-035-098)。使用50μL/孔的TMB(Neogen,目录号308177)检测反应。用1M HCl(50μl)停止显色。使用Spectromax读板器在450nm下测量光密度(OD),并使用SoftMaxPro处理数据。数据显示抗靶标VHH-Fc结合人、鼠科动物和食蟹猴靶抗原。所用的重

组DLL3蛋白为人DLL3.FLAG (Adipogen#AG-40B-0151, 氨基酸27-466)、或人DLL3.HIS (abcam#ab255797, 氨基酸27-492)、或鼠科动物DLL3.HIS (IPA定制, 氨基酸25-477)、或食蟹猴DLL3.HIS (Acrobiosystems#, 氨基酸27-490)。DLL3结合的对照抗体是洛伐妥珠单抗 (Creative Biolabs#TAB-216CL)。所用的重组HER2蛋白是人Her2.HIS (Sinobiologics, #10004-H08H) 和鼠科动物HER2.HIS (Sinobiologics#50714-M08H)。HER2结合的对照抗体是曲妥珠单抗 (DIN:02240692, ROCHE)。图1A和1B显示在ELISA中特异性结合可溶性靶抗原的抗Her2和抗DLL3 VHH-Fc, 测试了另外的包含降低效应子功能和/或FcRn结合的在Fc区中的突变的VHH-Fc, 但其不显著影响与靶抗原的结合。

[1188] 通过流式细胞术, 针对与一系列靶标阳性癌细胞系的结合对VHH-Fc进行了筛选。除非另外说明, 否则所有细胞系都来源于ATCC, 并且将它们根据制造商的说明和推荐的培养基进行培养。所用的HER2阳性细胞系是SKBR3 (ATCC#HTB-30) 和BT474 (ATCC#HTB-20) 和HEK293-6E (NRC) 细胞。所测试的DLL3阳性细胞系包括SHP-77 (ATCC CR1-2195)、NCI-H82 (ATCC HTB-175)、NCI-H69 (ATCC HTB-119)、HEK-DLL3 (Creative Biogene#CSC-R00531)。所测试的HER2阴性细胞系包括SHP-77。所测试的DLL3阴性细胞系包括HCT-116 (CCL-247)、BT-474和SKBR3。将以与ELISA相同的方式稀释的一抗添加到细胞中并在冰上孵育1小时。将细胞用含1%FBS的PBS洗涤两次, 在450G下离心4分钟, 并且与2 μ g/mL AlexaFluor 647缀合的抗人IgG (Jackson, 目录号109-605-098) 或AlexaFluor 647缀合的抗小鼠IgG (Jackson, 目录号115-605-164) 一起以1:1000DAPI (Biolegend, 目录号422801) 在冰上孵育30分钟。根据标准规程, 在另外的两次洗涤之后, 将细胞重新悬浮, 并且在iQue screener平台 (Intellicyt) 上通过流式细胞术进行分析, 并且使用Forecyt处理数据。图2A、2B和2C显示与靶标阳性细胞系的结合, 并且显示结合对靶标阳性细胞具有特异性 (即, 通过与阴性对照细胞的结合比较)。另外的实验指示, 与野生型Fc相比, 降低效应子功能和/或FcRn结合的Fc突变不影响与癌细胞的结合。

[1189] 实施例B-3. 内化测定

[1190] 使用与pH敏感性染料缀合的二抗测试VHH-Fc被表达靶标的细胞的内化。根据制造商的说明, 将山羊抗hu IgG-Fc二抗胺缀合至pH敏感性pHAb染料 (Promega 目录号G9845)。pHAb染料在pH>7时具有低荧光或无荧光, 但在抗体内化之后在酸性环境中发出荧光。将靶标阳性细胞和靶标阴性细胞以 1.0×10^6 /mL铺板于96孔V底板中。将VHH-Fc和hIgG1同种型对照在培养基中稀释至75nM。离心细胞以除去上清液, 将其与制备的一抗一起重新悬浮并在冰上孵育1小时。从细胞洗掉过量的一抗, 然后将其与pHAb标记的二抗一起在冰上孵育30分钟。然后洗掉过量的二抗并将细胞重新悬浮于培养基中。将一个样品集合放置于37 $^{\circ}$ C的培养箱中以使其内化, 并且将另一集合置于冰上 (0 $^{\circ}$ C) 作为仅结合对照。在0至24小时的不同时间点对细胞进行采样。将细胞用DAPI染色, 并且使用iQue screener平台在572/28通道上通过流式细胞术进行读取。VHH-Fc在靶标阳性细胞上显示出比阴性对照 (同种型, 缓冲液) 更高的荧光。图3A和3B显示H101和D102被SHP-77和HEK-DLL3细胞内化。

[1191] 实施例B-4. 抗体热稳定性测定

[1192] 使用Protein Thermo Shift Dye KitTM (ThermoFisher, 目录号:4461146), 根据差示扫描荧光测定法 (DSF) 确定VHH-Fc的变性温度 (T_m)。简言之, 在每个反应中使用共计1 μ g抗体。使用Applied Biosystems QuantStudio 7Flex实时PCR系统, 使用试剂盒手册中所说

明的推荐设定,生成抗体的溶解曲线。然后通过使用ThermoFisher Protein Thermal Shift软件(v.1.3)确定表1中抗体的T_m。通过DSF确定VHH-Fc的T_m。H101和D102均显示67.5 ± 0.1℃的良好热稳定性。另外,测试了包含降低效应子功能和/或FcRn结合的在Fc区中的突变的VHH-Fc的热稳定性,并且其导致热稳定性稍低(1至2℃),但仍在可接受的范围内。

[1193] 实施例B-5.受体密度测定

[1194] 为了测试免疫缀合物结合相对于靶标密度的功效,测量了靶标阳性细胞系上的受体密度。使用ABC(抗体结合能力)测定测量靶标密度。用细胞解离缓冲液收获表达感兴趣的靶标的癌细胞以及阴性对照细胞系,将它们以约5x 10⁴个细胞/孔接种到96孔V底板(Sarstedt82.1583.001)中。按照制造商的说明,使用QuantiBRITE PE珠(BD目录号340495)和PE缀合的抗hu IgG(Biolegend克隆HP6017)测试细胞的受体表达。简言之,基于先前的实验,以合适的饱和浓度制备VHH-Fc和同种型对照抗体。将抗体样品稀释液与细胞系小组在冰上孵育1小时。将细胞用含1% FBS的1x PBS(FACS缓冲液)洗涤两次,以400G离心4min。然后将细胞与4μg/mL小鼠PE缀合的抗hu和DAPI(1:1000)一起在冰上孵育30分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次,以400G离心4分钟并且重新悬浮于FACS缓冲液中。在iQue Screener平台上测量PE通道上的荧光强度,并且用ForeCyt软件处理数据。然后基于已知的PE分子/Quantibrite珠粒样品,将从不同的一抗生成的PE信号的量拟合到标准曲线,以确定每个细胞的抗体结合位点的数量。相对抗体结合位点与细胞表面上抗原或受体的数量相关。表2显示与癌细胞系小组结合的抗DLL3和抗HER2 VHH-Fc的受体密度数,并且其范围与文献中报道的范围相似。

表2-针对每种结合剂和细胞系估计的表位/细胞数量							
		SHP-77	HEK-DLL3	BT474	H82	HEK293-6E	HCT-116
[1195] 抗DLL3	Rova	969	1679	-	936	-	-
	D102	807	1734	-	794	-	-
抗HER2	Tmab	625	1575	356690	-	1969	2790
	H101	572	1490	401604	-	1935	2604

[1196] 实施例B-6.抗体对靶蛋白的亲合力

[1197] 使用Octet Red96e(ForteBio)评估抗体亲合力。使用抗hIgG Fc(AHC)捕获生物传感器(Fortebio目录号18-5063),通过生物层干涉测量法测量缔合速率常数(k_a)、解离速率常数(k_d)和亲和常数(KD)。每个循环均以1,000rpm的轨道式震荡速度进行。从在动力学缓冲液(Fortebio,目录号18-1105)中的合适起始浓度1:2滴定抗原。将AHC生物传感器的集合浸入动力学缓冲液中,持续60s的基线步骤。将抗靶标VHH-Fc(5μg/mL,在动力学缓冲液中)加载到生物传感器上,持续240s,之后进行30s的第二基线步骤。将IgG捕获的传感器浸入缓冲液中以进行单一参考扣除,以补偿捕获IgG的自然解离。然后将每个生物传感器浸入对应浓度的靶蛋白(人、鼠科动物或食蟹猴单体蛋白)中600s,之后在动力学缓冲液中或优化的条件下持续1800s的解离时间。每个VHH-Fc均使用新的AHC生物传感器的集合。通过全局拟合1:1模型分析缔合和解离步骤的数据(Octet软件版本v11.0)。表3显示结合亲合力数据。

[1198]

表3-H101和D102对靶蛋白的亲和力		
VHH-Fc	分析物	KD (nM)
D102	人DLL3-Flag	0.472
D102	小鼠DLL3-His	8.75
H101	人HER2-His	3.79

[1199] 实施例B-7.FcRn和Fc效应子突变亲和力确定

[1200] VHH-Fc的FcRn亲和力通常可以用于预测抗体血清清除的半衰期。(参见例如, Datta-Mannan A等人, “FcRn affinity-pharmacokinetic relationship of five human IgG4 antibodies engineered for improved in vitro FcRn binding properties in cynomolgus monkeys.” Drug Metab Dispos. 2012 Aug; 40(8):1545-55)。简言之, 使用Octet RED96e (ForteBio), 用SA生物传感器捕获10nM生物素化hFcRn (Sino Biological, 目录号: CT071-H27H-B)。将hFcRn包被的生物传感器浸入在磷酸钠缓冲液 (100mM Na₂HPO₄、150mM NaCl w/0.05% Tween-20, pH 6.0) 中的样品溶液中, 测量测试抗体的系列浓度以及缔合。通过将生物传感器浸入不含抗体的磷酸钠缓冲液中来测量解离。使用Octet Data Analysis HT 11.0软件确定KD值。在分析中使用2:1 (异质配体 (Heterogeneous Ligand)) 结合模型。表4显示FCRN对野生型VHH-Fc的亲和力, 以及对于突变体而言Fc中的特定突变对亲和力的影响。FcRn亲和力的变化在各靶标上是一致的。仅具有Fc效应子突变的构建体对FcRn亲和力没有影响。将Fc效应子突变添加到FcRn突变构建体不影响FcRn亲和力。表4显示VHH-Fc和Fc突变体对FcRn的亲和力。

[1201] 表4a-FcRn VHH-Fc和Fc突变体对FcRn的亲和力

[1202]

VHH.Fc	FcRn突变体	KD (nM)
H101	wt	3.7
D102	wt	3.8
H105	I253A	弱
H106	S254A	13
H107	H310A	无结合
H108	H435Q	弱
H109	Y463A	13
H110	H310A/H435Q	无结合
D111	I253A	弱
D112	S254A	19
D113	H310A	无结合
D114	H435Q	弱
D115	Y463A	20
D116	H310A/H435Q	无结合
H133	wt	2.1
D134	wt	1.9
H135	H310A	无结合

D136	H310A	无结合
H137	H435Q	弱
D138	H435Q	弱

[1203] 还使用Octet Red96e平台,通过生物层干涉测量法测试了VHH-Fc对Fc γ R的亲和力。每个循环均以1,000rpm的轨道式震荡速度进行。使用动力学缓冲液(PBS+0.1% BSA+0.02% Tween-20),将链霉亲和素(SA)生物传感器(Sartorius 18-5019)再水化10min。然后将生物素化的Fc γ R(Acro Biosystems)以范围介于1-5 μ g/mL之间的浓度(在PBS中稀释)加载到SA生物传感器上,持续40-100s。以范围介于5000nM至37.5nM之间的起始浓度,在样品缓冲液(PBS+0.02% Tween-20)中1:2连续稀释VHH-Fc。然后将加载的生物传感器与VHH-Fc缔合,持续60-120s。在样品缓冲液中测量VHH-Fc解离,持续30-900s。然后使用3个5s再生缓冲液(150mM NaCl,300mM柠檬酸钠)和5s样品缓冲液的循环去除结合的VHH-Fc。使用全局拟合的1:1Langmuir结合模型(Fc γ RI)或稳态分析(Octet软件版本HT v11.1)分析数据。

[1204] 分析显示,对于具有如表4b中所示掺入的那些突变的构建体,与Fc γ R的结合(由较高的KD表示)减少。

[1205] 表4b FcRn VHH-Fc和Fc变体对Fc受体的亲和力

[1206]

	Fc 突变	Fc γ RI nM KD	Fc γ RIIa (H167) nM KD	Fc γ RIIa (R167) nM KD	Fc γ RIIb/c nM KD	Fc γ RIIIa (F176) nM KD	Fc γ RIIIa (V176) nM KD
曲妥珠单抗	wt	0.92	270	520	3700	630	110
H101	wt	1.01	340	160	450	1600	480
H133	AEASS	-	-	2300	弱	-	-
H135	AEASS+ H310A	-	-	1200	弱	-	-
H137	AEASS+ H435Q	-	-	1200	弱	-	-
D102	wt	1.27	390	530	430	1200	730
D134	AEASS	-	弱	460	1100	-	-
D136	AEASS+ H310A	-	弱	570	2200	-	-
D138	AEASS+ H435Q	-	弱	520	770	-	-
(-) 表示未检测到结合							

[1207] 实施例B-8.使用AC-SINS的自缔合研究

[1208] 使用金纳米颗粒(Au-NP)(Ted Pella,目录号:15705),根据亲和捕获自相互作用纳米颗粒光谱(AC-SINS)确定VHH-Fc的自缔合的倾向。(PMID:24492294,30395473)简言之,使用山羊IgG和山羊抗人Fc IgG(1:4摩尔比)包被Au-NP。将缀合的Au-NP与5 μ g每种VHH-Fc在96孔板中混合,一式四份。使用Synergy Neo2读板器测量波长扫描。通过用PBS缓冲液的 λ_{max} 减去每个反应的 λ_{max} 来计算最大吸光度的差($\Delta\lambda_{max}$)。使用二次多项式拟合,在Excel中用Linest函数分析数据。测定中包括具有已知高ACSINS评分(高于文献确定的IgG的截止值11)的对照抗体。图4显示测试物品和对照的ACSINS评分。

[1209] 实施例B-9.多反应性研究

[1210] VHH-Fc对带负电荷的生物分子的多反应性通过ELISA来确定(如Avery等人, “Establishing in vitro in vivo correlations to screen monoclonal antibodies for physicochemical properties related to favorable human pharmacokinetics.” MAbs.2018Feb/Mar;10(2):244-255中那样)。简言之,将ELISA板用5 μ g/mL人胰岛素(SigmaAlrich,目录号:I9278)和10 μ g/mL双链DNA(SigmaAlrich,目录号:D1626-250MG)包被过夜。用ELISA缓冲液(PBS,1mM EDTA,0.05%Tween-20,pH 7.4)封闭板。将10 μ g/mL测试VHH-Fc一式四份地加载到板上并孵育2小时。然后添加与HRP缀合的山羊抗人Fc(0.01 μ g/mL)并将板孵育1小时。使用TMB产生信号,并且使Synergy Neo2读板器测量A450吸光度。对于每种测试的抗体,用未包被孔的信号将信号归一化。表5显示与对照抗体相比的多反应性评分。

[1211] 表5-多反应性测定评分

[1212]

VHH.Fc	胰岛素	dsDNA
H101	1.176	1.406
D102	2.311	2.248
H105	1.207	
H106	1.321	1.446
H107	1.306	1.678
H108	1.420	1.663
H109	1.244	1.579
H110	1.181	1.317
D111	2.202	
D112	3.461	2.970
D113	2.829	2.594
D114	3.161	3.015
D115	2.503	2.252
D116	2.446	2.302
甘特内鲁单抗 (Gantenerumab)	>10	>10

[1213] 实施例B-10.Fc变体有效缩短VHH-Fc半衰期

[1214] 在某些情况下,缩短 α 发射体的药物半衰期对于安全性和避免与治疗相关联的非所毒性来说很重要。然而,抗体的半衰期通常长达14天或更长。因此,测试了VHH-Fc变体的半衰期,以观察和测量半衰期的任何缩短。

[1215] 将二十八(28)只8周龄雄性B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg (FCGRT) 32Dcr/DcrJ (Tg32 hom, JAX stock#014565)小鼠分配成7个组,每组4只小鼠,如表中所概述。Tg32小鼠包含人源化FcRn,并且与非人灵长类动物相比,通常被视为抗体的人类药代动力学的替代品。(参见例如,Avery LB等人,“Utility of a human FcRn transgenic mouse model in drug discovery for early assessment and prediction of human pharmacokinetics of monoclonal antibodies.” MAbs.2016Aug-Sep;8(6):1064-78)。在第0天,测量体重并且以3mg/kg和5ml/kg向所有小鼠IV施用测试物品。以各时间间隔从每只小鼠收集25 μ L血液样

品。将血液样品收集到1μL K₃EDTA中,处理成血浆,在含50%甘油的PBS中1/10稀释,转移到专门的96孔储存板中,并且在-20℃下储存。所有血浆样品都经由针对其对所有七种测试物品的高敏感性所选择的hIgG ELISA进行评估。

[1216]

表6-HER2 VHH-Fc的药代动力学参数汇总					
	终末半衰期	清除	Cmax	AUC	分布体积
	天	mL/天	μg/mL	μg-天/mL	mL
H105	1.12	152.1	63.9	841	137
sem	0.03	3.4	3.6	29	1
H106	7.10	19.8	53.5	2193	177
sem	0.31	0.8	0.4	29	3
H107	0.41	304.4	62.4	516	82
sem	0.01	15.0	4.3	22	3
H108	1.57	117.5	46.6	903	174
sem	0.10	6.6	0.7	40	6
H109	6.92	18.2	52.2	2519	152
sem	0.34	0.6	0.8	28	4
H101	6.91	28.7	57.0	1946	218
sem	0.77	5.2	1.6	231	35
曲妥珠单抗	14.54	5.9	59.0	4108	108
sem	1.12	0.5	2.3	109	2

[1217] 如表6中所观察,在FcRn内引入突变通常能够缩短抗HER2VHH-Fc的半衰期。有趣的是,与此项领域中已公布的结果相反,当包含在测试的免疫缀合物中时,不是所有Fc变体都显示半衰期缩短,与在文献中发现的先前公布的结果一致。(参见例如,Burvenich IJ等人,“Cross-species analysis of Fc engineered anti-Lewis-Y human IgG1variants in human neonatal receptor transgenic mice reveal importance of S254 and Y436 in binding human neonatal Fc receptor.”MAbs.2016年5月-6月;8(4):775-86)。

[1218] 表7-DLL3 VHH-Fc的药代动力学汇总

[1219]

	终末半衰期	清除
	天	mL/天
D111	10.2	10.8
SEM	4.4	10.5
D112	14.2	7.8
SEM	3.2	1.0
D113	1.1	254.8
SEM	0.2	27.0
D114	2.5	46.9

	终末半衰期	清除
SEM	0.1	3.6
D115	11.0	6.9
SEM	13.2	1.1
D102	13.3	10.3
SEM	3.3	3.8
曲妥珠单抗	18.4	3.7
SEM	5.9	0.9

[1220] 如表7中所观察,在FcRn内引入突变通常能够缩短抗DLL3VHH-Fc的半衰期。与HER2结合免疫缀合物相似并且与已公布的结果相反,不是所有Fc变体都显示半衰期缩短,与在文献中发现的先前公布的结果一致。

[1221] 实施例B-11.VHH-Fc完整质量分析

[1222] 将VHH-Fc抗体去糖基化,之后使用内部Endo-S酶(最终浓度为10 μ g/mL)或商业Endo-S(New England BioLabs Inc.,目录号:P0741L)在37 $^{\circ}$ C下分析1小时。为了分析完整质量,将8 μ L样品注入具有UPLC BEH200 SEC 1.7 μ m 4.6x150 mm柱的Waters Acquity UPLC-Q-TOF。这些样品用具有0.1% TFA和0.1% FA(甲酸)的水/ACN(70/30,v/v)的流动相以流速0.25mL/min洗脱11min。

[1223] 实施例B-12.双功能螯合因子的缀合

[1224] 可以使用许多可用于制备IgG放射性缀合物和IgG抗体-药物缀合物的方法进行缀合。对于关于适用方法的范围的信息,参见PW Howard Antibody-Drug Conjugates (ADCs), Protein Therapeutics,第一版,第9章,pp.278-279(2017)。

[1225] 对于典型的基于赖氨酸的缀合,通过Microsep Advance离心装置(Pall,10K MWC0, Omega改性PES膜,目录号:MCP010C41)、Amicon超离心过滤单元(Millipore,40Kda MWC0,再生纤维素膜,目录号:UFC803096)或Vivaspin Turbo 4超滤单元(Sartorius,30kDa MWC0,高通量PES膜,目录号:VS04T21),将抗体进行缓冲液交换到0.1M NaHCO₃(pH 9.0)中,随后用0.22 μ m的Costar Spin-X离心管(Corning,目录号:8160)杀菌。通过Pierce BCA测定(Thermo Scientific,目录号:23225)或A280(Unchained Labs,Lunatic)定量缓冲液交换的抗体。在一些情况下,可能已浓缩抗体,以便可在缓冲液交换到0.1M NaHCO₃(pH 9.0)中后将其浓度调节至5mg/mL;在大多数程序中,通过在缓冲液交换后添加另外的0.1M

NaHCO₃,将抗体稀释至在0.1M NaHCO₃ (pH 9.0) 中的2mg/mL。

[1226] 接下来,将适当摩尔过量(5-30当量)的螯合因子-接头(20-50mM在DMSO中)添加到向mAb溶液(2或5mg/mL最终浓度)中。在一些情况下,添加DMSO,以使溶液始终为2%-5% DMSO。将反应在Eppendorf thermomixer C (以300rpm持续振荡)中在25℃孵育过夜。反应完成后,根据制造商的方案,使样品通过Zeba旋转脱盐柱(40KDa MWC0, ThermoFisher, 目录号:87770),以去除未使用的螯合因子-接头并将其缓冲液交换到PBS (pH 7.4) (LifeTechnologies, 目录号:10010-023)中。将每种抗体-螯合因子缀合物(ACC)储存在4℃,直至分析和纯化。

[1227] 缀合实验的代表性结果呈现于表8A中。

[1228] 表8A

[1229]

化合物 编码	VHH	螯合因子- 接头: Ab rxn比率	MS- CAR	单体 (%)	结合EC50 (nM), SHP77, V038/V002 = 0.13-0.14)
2-5	D138	5	2.77	93%	-
	D138	7	0.92	94%	-
	D138	7.3	3.93	95%	-
	D138	9	5	95%	0.23
3-16	D138	6	3.74	97%	0.18
	D138	7.5	4.75	95%	-
	D138	9	5.19	94%	-
2-6	D138	7.5	1.71	96%	-
	D138	15	3.31	93%	-
2-4	D138	7.5	2.95	93%	-
	D138	11	4.62	92%	0.15
	D138	15	5.45	94%	-
3-1	D138	6	5.25	96%	0.14
	D138	7.5	4.8	95%	-
	D138	15	9.31	95%	-
3-4	D138	7.5	2.91	95%	-
	D138	11	3.83	97%	0.18
	D138	15	5.48	95%	-
2-13	D138	7	5.22	97%	0.15
	D138	7.5	4.47	95%	-
	D138	15	10.7	97%	-
4-1	D138	18	3.99	88%	0.20
	D138	18	4.65	92%	-
3-13	D138	9	2.2	95%	-
	D138	11	3.12	95%	0.20
2-1	D102	5	2.04	97%	0.06
	D102	9	3.76	97%	0.10

[1230]

化合物 编码	VHH	螯合因子- 接头: Ab rxn比率	MS- CAR	单体 (%)	结合EC50 (nM), SHP77, V038/V002 = 0.13-0.14)
	D102	21	8.08	96%	0.12
2-2	D102	2.3	1.64	93%	0.13
	D102	5.5	4.01	97%	0.10
	D102	11.5	8.13	96%	0.12
2-3	D102	15.3	1.81	96%	0.04
	D102	30.1	3.83	92%	0.06
	D102	70	7.51	95%	0.10
2-5	D102	2.2	1.91	94%	0.09
	D102	5	3.81	91%	0.10
	D102	10.8	8.18	96%	0.16
2-10	D102	6	2.72	95%	-
	D102	8	3.29	92%	-
	D102	10	3.99	92%	-

[1231] 实施例B-13.通过制备型SEC纯化

[1232] 为了去除高分子量物质 (HMWS) 和低分子量物质 (LMWS), 通过SEC, 使用具有Cytiva HiLoad 16/600Superdex 200pg柱的AKTA Pure FPLC系统纯化VHH-Fc。将pH 7.6的TBS缓冲液 (50mM Tris, 150mM NaCl, OmniTrace Ultra水 [VWR, 目录号: CAWX0003-2]) 用于SEC缓冲液。将含有完整VHH-Fc的级分汇集在一起并且使用Microsep Advance离心装置 (Pall 10k MWC0, 目录号: MCP010C41) 浓缩。将浓缩的样品转移到0.22 μ m 0.5mL的Ultrafree-MC GV离心过滤器 (Millipore, 目录号: UFC30GV0S) 并且以3,000x g旋转3分钟。

[1233] 实施例B-14.通过BCA测定进行蛋白质定量

[1234] 对于一些样品, 使用通过西妥昔单抗 (LIST/E: 094822, DIN 02271249, 2mg/mL) 标准化的Pierce BCA蛋白测定试剂盒 (Thermo, 目录号: 23225) 定量VHH-Fc蛋白或VHH-Fc缀合物含量。

[1235] 对于其他样品, 使用2 μ L样品与Lunatic UV/Vis分光光度计 (Unchained Labs), 通过测量溶液在280nm处的吸光度以及蛋白质在280nm处的经计算消光系数来定量VHH-Fc蛋白或VHH-Fc缀合物含量。

[1236] 实施例B-15.螯合因子与VHH-Fc比率 (CAR) 分析

[1237] 螯合因子负载 (本文描述为CAR (螯合因子-抗体比率)) 可以通过适用于抗体缀合物领域从业者的方法进行分析。对于ADC背景下这些方法的综述, 参见A Wakankar等人, mAbs 3:161 (2011)。

[1238] VHH-Fc抗体在用市售Endo-S (New England BioLabs Inc., 目录号: P0741L) 的内部Endo-S酶 (最终浓度为10 μ g/mL) 分析之前在37 $^{\circ}$ C去糖基化持续1小时。对于完整质量的分析, 将8 μ L样品注射到具有BEH200 SEC 1.7 μ m 4.6x150 mm柱的Waters Acquity UPLC-Q-TOF中。用含0.1% TFA和0.1% FA (甲酸) 的水/ACN (70/30, v/v) 流动相洗脱这些样品 11min, 流速为0.25mL/min。解卷积光谱显示代表具有一定数量的附接的螯合因子-接头的物质的质量分布。使用峰强度通过取各峰强度的总和乘以由该质量代表的修饰次数, 然后

除以所有抗体质量的总强度来计算缀合物制剂的平均CAR。(也可代入方程式中)。在这种情况下,在光谱解卷积后获得质量分布,从而允许计算制剂的平均CAR。

[1239] 可替代地,使用Agilent AdvanceBio 6545XT LC/QTOF质谱仪(流动相梯度为开始以80%流动相A(含0.1%甲酸的Milli-Q水)和20%流动相B(含0.1%甲酸的乙腈)持续4min,然后在接下来的7min内在Agilent PLRP-S柱(I.D.2.1mm/长度:50mm/粒度:5 μ m/孔径:1000 Å,部件号:PL1912-1502PK)上以0.6mL/min的恒定流速线性变化至90%流动相B),通过UPLC-Q-TOF-MS分析一些缀合物。在Agilent的MassHunter工作站上用Agilent的BioConfirm软件(12.0版)进行原始数据的解卷积和CAR计算。

[1240] 实施例B-16.VHH-Fc缀合物与表达靶蛋白的细胞的结合

[1241] 在一些情况下,缀合可能对VHH-Fc与靶蛋白的结合产生负面影响。因此,与上文所述相似,测试了VHH-Fc缀合物的结合。表8显示VHH-Fc螯合因子缀合物的细胞结合数据。

[1242] 表8-VHH-Fc螯合因子缀合物的细胞结合数据。

表8-VHH-Fc螯合因子缀合物的细胞结合数据					
EC50 (nM)					
缀合物	抗体	SHP-77	HCT-116	HEK-DLL3	HEK-293
	洛伐妥珠单抗	0.11	-	0.06	-
化合物4-1	曲妥珠单抗	-	1.16	1.06	0.69
	hIgG1	-	-	-	-
	H101 (CAR 0)	-	2.21	1.62	1.14
	H101 (CAR 0.6)	-	1.96	1.73	1.16
	H101 (CAR 1.1)	-	2.46	1.39	1.42
	H101 (CAR 2.3)	-	3.34	2.05	1.68
	H101 (CAR 2.7)	-	2.96	1.88	1.58
	H101 (CAR 4.6)	-	5.63	2.99	2.27
	H101 (CAR 8.3)	-	5.32	4.43	3.52
	D102 (CAR 0)	0.53	>100	1.42	>10
	D102 (CAR 0.9)	0.41	-	0.48	-
	D102 (CAR 4.7)	0.38	-	0.56	-
化合物4-2	H101 (CAR 0)	-	2.21	1.62	1.14
	H101 (CAR 2.0)	-	4.01	3.99	3.11
	H101 (CAR 8.9)	-	40.11	28.37	28.89
	D102 (CAR 0)	0.53	>100	1.42	>10
	D102 (CAR 2.7)	0.50	-	0.58	-
	D102 (CAR 9.3)	0.60	-	0.91	-
H101=Her2 抗原结合; D102=DLL3 抗原结合; CAR=螯合因子与VHH比率					

[1244] 如表8中所观察到的,针对两种缀合物均观察到结合。还如表8所示,在递增的螯合因子VHH-Fc比率(CAR)的情况下也观察到结合。

[1245] 实施例B-17.完整百分比分析

[1246] 通过HPLC-SEC确定完整免疫缀合物的百分比。将12 μ L缀合物添加到在标准HPLC小瓶中的玻璃瓶插入物中。将10 μ L样品注入到具有Wyatt Technology WTC-050S5 SN:0429BN

WBD129柱的Agilent HPLC-SEC上,并且使用1x PBS(100%),以流速0.5mL/min洗脱40min。

[1247] 可替代地,使用与保护柱(TSKgel SWXL保护柱I.D.6.0mm/长度:40mm/粒度:7 μ m,部件号:08543)组合的Tosoh Bioscience TSKgel G3000SW XL柱(I.D.7.8mm/长度:300mm/粒度:5 μ m/孔径:250 Å,部件号:08541)柱,使用等度洗脱(流动相由0.2 μ m过滤的78mM KH₂PO₄、122mM K₂HPO₄、250mM KCl、15% 2-丙醇(pH 7.0)组成,以0.5mL/min的恒定流速经45min)进行相同分析。

[1248] 实施例B-18.内毒素水平确定

[1249] 根据制造规程,使用Wako的鲎阿米巴样溶胞产物Pyrostar™ ES-F单次测试(目录号:WPESK-0015)进行内毒素测试。基于为研究中的每个动物设计的最大注射剂量,同时按照适当的动物护理和FDA指南设定QC截止。

[1250] 表8B-经纯化螯合因子-接头缀合物与VHH-Fc的数据

化合物	VHH	C:Ab rxn 比率	预纯化		SEC后纯化						
			MS-CAR	M (%)	浓度 (mg/mL)	MS-CAR	M (%)	内毒素 (EU/mg)	结合 EC ₅₀ (nM),	量 (mg)	产率 (%)
[1251]	D138	7	0.92	94%	10.4	0.85	99%	-	-	2	66%
		9	5	95%	6.25	5.1	99%	-	0.225	2	66%
	D138	6	3.74	97%	5.68	3.43	99%	-	0.179	1.4	47%
	D138	11	4.62	92%	5.25	4.29	98%	<0.0303	0.154	2.15	61%
	D138	6	5.25	96%	5	5.05	98%	<0.0303	0.139	2.1	60%
	D138	11	3.83	97%	4.7	3.73	99%	<0.0303	0.184	2.44	70%
	D138	7	5.22	97%	4.83	4.5	98%	<0.0333	0.153	2.75	79%
	D138	18	3.99	88%	5.3	4.18	100%	<1	0.2	4.4	60%
	D138	11	3.12	95%	6.05	3.29	98%	-	0.197	2.6	87%
	D102	18	4.65	92%	5.79	4.62	100%	<1	-	4.5	81%
	D102	14.5	-	-	3.9	3.9	99%	<0.0258	-	0.8	27%
	D102	6.01	-	-	6.67	4.26	99%	<0.112	0.11	7.2	72%
	D102	7.5	-	-	9.7	4.3	98%	0.0266	-	2	68%
	D102	10.1	-	-	7.15	3.91	99%	<0.084	0.091	6.72	67%

[1252] C:Ab rxn比率=螯合因子-接头:Ab rxn比率

[1253] M(%)=单体(%)

[1254] 实施例B-19.使用¹¹¹In进行放射性标记

[1255] 将40 μ g 4种测试物品中的每一个用0.1M乙酸铵缓冲液在500 μ L lo-bind Eppendorf管中稀释至100 μ L,并且添加18-25 μ L (20-22MBq) [¹¹¹In] InC13且使用移液管混合。将反应混合物于培养箱中在37℃下孵育1小时。然后将管转移到4℃冰箱中。

[1256] 通过在1.5x 10cm iTLC条带的起点处点样0.5 μ L样品来确定放射性核素的掺入。然后将条带放置于含有2mL流动相(含25mM EDTA的pH 5 0.1M乙酸钠缓冲液)的50mL Falcon管中,直到溶剂到达条带顶部。将条带取出并暴露于磷光体成像板,然后在Cyclone磷光体成像仪中扫描成像板。在对应于蛋白质结合和未结合的¹¹¹In的迁移的斑点上绘制感兴趣的区域,并且计算各自的比例。

[1257] 还通过SEC-HPLC分析了放射性缀合物:将对应于0.1-0.2MBq的体积的样品移液到

500 μ L lo-bind Eppendorf管中,并且在电离室中测量放射性。将样品吸出到注射器中,并且注入到HPLC系统中。用PBS洗脱样品。收集系统的洗脱液并测量放射性,以确定柱的回收率(针对样品管和注射器中剩余的活性进行校正)。

表-9 ¹¹¹ In放射性标记效率			
螯合因子-接头	抗体	合成后标记效率	
		尝试1	尝试2
4-1	H101	95.9%	96.5%
4-2		97.5%	97.7%
4-1	D102	97.5%	97.0%
4-2		98.1%	97.2%

[1259] 表9A. 新型螯合因子-缀合物的In-111放射性标记和稳定性数据

化合物	VHH	MS-CAR	M (%)	EOS (iTLC)	24 h PBS (iTLC)	M % (SEC)	HWMS (SEC)	LMWS (SEC)	24 h PBS (IRF)	24 h 血清 (IRF)
2-5	D138	5.1	99%	99%	99%	96%	3%	1%	89%	85%
3-16	D138	3.43	99%	99%	98%	97%	1%	2%	74%	81%
2-4	D138	4.29	98%	99%	99%	96%	2%	2%	84%	88%
3-1	D138	5.05	98%	99%	99%	97%	3%	1%	91%	92%
3-4	D138	3.73	99%	99%	100%	95%	4%	2%	89%	90%
2-13	D138	4.5	98%	99%	99%	90%	9%	1%	92%	90%
4-1	D138	4.18	100%	99%	100%	96%	3%	1%	95%	89%
4-1	D102	4.62	100%	99%	100%	-	-	-	95%	88%
2-1	D102	3.9	99%	99%	99%	-	-	-	84%	78%
2-2	D102	4.26	99%	98%	98%	-	-	-	88%	78%
2-5	D102	4.3	98%	99%	99%	-	-	-	87%	77%

[1261] M(%) = 单体(%) ; M% (SEC) = 单体% (SEC)

[1262] 实施例B-20. 使用²²⁵Ac进行放射性标记

[1263] 将800 μ g 4种测试物品中的每一个用0.2M pH 6.5的乙酸铵缓冲液在500 μ L lo-bind Eppendorf管中稀释至200 μ L,并且添加2 μ L (400kBq) 氯化²²⁵Ac且使用移液管混合。在Py4Pa缀合物的情境中,将反应混合物于培养箱中在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,并且对于DOTA缀合物来说,孵育2小时。然后将管转移到4 $^{\circ}$ C冰箱中。

[1264] 通过在1.5x 10cm iTLC条带的起点处点样0.5 μ L样品并使其干燥几分钟来测量掺入。然后将条带放置于含有2mL流动相(含25mM EDTA的pH 5 0.1M乙酸钠缓冲液)的50mL Falcon管中,直到溶剂到达条带顶部。将条带取出并使其平衡至少2小时,之后将其暴露于磷光体成像板,然后在Cyclone磷光体成像仪中扫描成像板。在对应于蛋白质结合和未结合的²²⁵Ac的迁移的斑点绘制感兴趣的区域,并且计算各自的比例。

[1265] 可替代地,可以通过HPLC-SEC测定样品:DOTA缀合物的HPLC使用BioSEP SEC 5 μ m s3000 3007.88mm柱,采用含20%乙腈的PBS进行洗脱。Py4Pa缀合物的HPLC使用Wyatt 050S5 5 μ m 500 $\text{\AA}$ 7.8x300mm柱,采用含20%乙腈的PBS进行洗脱。

[1266] 将50 μ L每个样品吸出到Hamilton注射器中,并且注入到HPLC系统中。注入之后10-30分钟,手动地将30秒洗脱液级分(0.25mL)收集到计数管中。使各级分达到长期平衡,持续

24小时,然后在伽马计数器中测量。还对每种制剂的5 μ L样品进行计数,以计算HPLC系统的回收率。通过呈总计数的百分比分别确定DOTA和Py4Pa缀合物的18.5-22.5min和19.5-23.5min的峰下面积来确定放射化学纯度。如表10所示,所有螯合因子-接头组合均显示良好的标记效率。

[1267]

表10- ^{225}Ac 放射性标记效率		
螯合因子-接头	抗体	制备后即刻的iTLC标记效率
4-1	H101	92.0%
4-2		96.3%
4-3		93.1%
4-4		96.0%
4-1	D102	98.5%
4-2		99.5%
4-3		98.0%
4-4		100%

[1268] 实施例B-21.放射性缀合物的稳定性

[1269] 针对 ^{225}Ac 和 ^{111}In 测试了放射性标记的免疫缀合物的稳定性。如上文所述,对VHH-Fc螯合因子-缀合物进行放射性标记(^{111}In 或 ^{225}Ac)。针对在PBS中的稳定性,将50 μ L每种标记的测试物品添加到200 μ L PBS(具有 ^{111}In)或200 μ L PBS/抗坏血酸盐(具有 ^{225}Ac)中并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。针对在血清中的稳定性,将50 μ L每种标记的测试物品添加到200 μ L小鼠血清中并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育。在不同的时间点取出等分试样,并且使用iTLC和/或HPLC-SEC分析放射化学纯度,如上文所述。这些稳定性实验的结果示于下文表11和表12中,并且指示放射性缀合物在PBS和血清中都是稳定的。

表11-用¹¹¹In标记的Her2和DLL3缀合物的稳定性

根据HPLC (iTLC) 的放射化学纯度	DLL3 (D102)		HER2 (H101)	
	4-1	4-2	4-1	4-2
PBS 1h	97.5%	98.1%	97.5%	98.4%
PBS 24h	89.1%	95.2%	96.5%	98.4%
血清24h	94% (94%)	98% (94%)	97%	94%
血清72h	92% (92%)	96% (94%)	100% (87%)	100% (84%)
血清168h	92% (94%)	95%	95% (91%)	92%
TLC放射化学并入值呈现于括号中。除其中示出外, iTLC并入> 95%				

[1270]

表12-用²²⁵Ac标记的Her2和DLL3缀合物的稳定性

根据HPLC (iTLC) 的放射化学纯度	DLL3 (D102)				HER2 (H101)			
	4-1	4-2	4-3	4-4	4-1	4-2	4-3	4-4
PBS 1h	91%	92%	83%	82%	93%	93%	84%	N/D
PBS 24h	92%	92%	83%	83%	93%	91%	82%	82%
血清24h	88% (94%)	91%	78%	69%	91%	90%	75%	68%
血清72h	89% (90%)	90% (94%)	73%	65%	89% (87%)	85% (94%)	74%	61%
血清168h	81% (91%)	86%	71%	59%	85% (89%)	80%	70%	56%
TLC放射化学并入值呈现于括号中。除其中示出外, iTLC并入> 95%								

[1271] 实施例B-22.VHH-Fc放射性缀合物的免疫反应性

[1272] 通过SK Sharma等人在Nucl.Med.Biol.2019,71,32-38中描述的方法确定免疫反应性分数(IRF)。对于分析以及在体内实验之前,将样品于PBS中在4℃下孵育过夜,而一些样品于血清中在37℃下孵育3天和7天,作为稳定性的替代量度。

[1273] 实施例B-23.珠粒包被

[1274] 将Dynabead和抗原(0.15nmol/0.125μg珠粒)于B/W缓冲液(25μL/0.125ug珠粒)中在室温下,在试管旋转器上孵育30分钟。将Eppendorf以100×g旋转15秒,并且放置于磁力架上3分钟。去除上清液并且用PBSF洗涤珠粒。然后将1mg珠粒重新悬浮于200μL B/W缓冲液中,并且将2mg珠粒重新悬浮于400μL B/W缓冲液中。以相同的方式制备对照珠粒,除了不向管中添加抗原之外。

[1275] 实施例B-24.免疫反应性分数(IRF)测定

[1276] 将上文生成的适当体积的珠粒(25μL/0.125mg珠粒)添加到用1mL PBSF预洗涤的微量离心管中。将放射性标记的VHH-Fc-缀合物(10ng)、封闭剂(10或50ug未缀合抗体;需要时)和PBSF添加到每个反应中,以实现最终体积350μL。将样品在室温下于转子上孵育30分钟。之后,将管以100x g离心15秒,并且放置于磁力架上3分钟。将上清液收集在伽马计数管

中。用400 μ L PBSF洗涤珠粒两次,并且收集在单独的伽马计数管中。最后将珠粒重新悬浮于500 μ L PBSF中并转移至伽马计数管中。用500 μ L PBSF洗涤反应管,并且将其添加到含有珠粒的伽马计数管中。

[1277] 如图7A所示,对于DLL3,所有接头整合因子组合都显示相似的免疫反应性分数,指示基于特定接头整合因子组合的标记没有偏差,图7B显示在PBS或血清中24小时之后免疫反应性分数没有由于Fc区突变而受到影响,图7C显示²²⁵Ac标记的抗DLL3 VHH-Fc (D102) 的免疫反应性分数以及在血清和血浆中的稳定性。

[1278] 实施例B-25. 通过IRF确定的缀合物的稳定性

[1279] 使用以上呈现的IRF测定来探测由新型接头形成的缀合物的稳定性。使用免疫反应性测量与固定靶抗原结合的放射性的%允许经验确定有多少放射性保持靶向结合抗原。放射性的中靶结合的减少允许对不同整合因子-接头、不同靶向载体进行比较分析,并显示随缀合物溶液有效靶向所需抗原的能力的时间降解。

[1280] 简言之,来自实施例B-21 (稳定性研究) 的稳定性的分析中的溶液的等分试样也可以应用于实施例B-22-24 (IRF测定) 中所述的IRF测定,并且计算结合反应性%并在不同时间点进行比较。通常,在0、1、3和/或7天采集样品用于各种测定。

[1281] 实施例B-26. 在未处理小鼠中用¹¹¹In进行的体内成像实验,以使用不同的缀合物测量放射性的全身清除率

[1282] 成像(例如,使用¹¹¹In) 提供了收集药代动力学和生物分布数据的能力,这些数据可以用于进行针对治疗计划的剂量测定计算。(参见例如, Sgouros G, Hobbs RF. "Dosimetry for radiopharmaceutical therapy." Semin Nucl Med. 2014年5月; 44 (3) : 172-8)。不受理论束缚,用成像标记观察到的靶向的定量展示指示出用能够引起靶细胞死亡的放射性标记(例如, α 发射体)进行靶向的能力。对不同组织中存在的放射性的比较分析允许比较用不同整合因子-接头制备的缀合物的相对性能和排泄特性。

[1283] 简言之,经由尾静脉向雌性CD-1小鼠 (n=21) 注射如上所述放射性标记(实施例B-19, 针对研究按比例调整) 的7种选择的整合因子-接头缀合物(7组) 之一,其中In-111 10MBq的比活为0.5MBq/ μ g (每组n=3)。在麻醉下对动物进行全身SPECT成像,随后进行CT。选择三个时间点(24h、72h和144/168h)。分析数据以显示全身ID% (注射剂量百分比) 和清除率。稍后可以通过绘制感兴趣区域(ROI) 而对图像进行再处理,以确定单个器官中分离的活性。

[1284] 该研究的数据汇总于图19A和图19B中。

[1285] 实施例B-27. 具有新型整合因子-接头的VHH-Fc放射性免疫缀合物的生物分布

[1286] 类似于上述实验,可以通过用荷瘤小鼠进行的生物分布实验测试来自实施例B-12和B-13的经纯化的缀合物。该研究将与SHP77或BT474肿瘤异种移植物以相似的组大小和时间点进行。该研究的读数将表明哪些化合物与放射性的正常组织吸收形成具有更有利肿瘤的缀合物。

[1287] 简言之,该研究将使用上述DLL3结合整合因子-接头-VHH-Fc缀合物与H82或SHP-77异种移植模型进行。6-8周龄雌性无胸腺裸小鼠 (n=30, 6组n=5) 将通过注射 5×10^6 个H82细胞至下侧腹中来接种。当肿瘤达到150-250mm³的目标体积时,将经由尾静脉向小鼠注射如上所述放射性标记(实施例B-19, 针对研究按比例调整) 的7种选择的整合因子-接头缀

合物(7组)之一,其中In-111 10MBq的比活为0.5MBq/ug (每组n=5)。将在麻醉下对来自每组的四只动物进行全身SPECT成像,随后进行CT。将选择三个时间点(24h、72h和168h)。在终末成像时间点之后,将对这四只动物实施安乐死,并将分析以下组织的残留活性,以提供168h时的离体生物分布数据:肿瘤、血液、肝脏、肾脏、脾脏、淋巴结、股骨头(膝盖)、骨髓和尾部。

[1288] 实施例B-28.VHH-Fc放射性免疫缀合物的生物分布在HER2+BT474肿瘤中随时间推移的生物分布和组织积聚

[1289] 成像(例如,使用铟-111 (^{111}In))提供了收集药代动力学和生物分布数据的能力,所述数据可以用于进行治疗计划的剂量测定计算。(参见例如,Sgouros G,Hobbs RF. "Dosimetry for radiopharmaceutical therapy." Semin Nucl Med.2014年5月;44(3):172-8)。不受理论的束缚,用成像标记观察到的靶向的定量证明指示了用能够引起靶向细胞死亡的放射性标记(例如, α 发射体)进行靶向的能力。此类现象由图8示出,其示出用成像同位素 ^{111}In (上图)标记的小鼠表现出治疗性同位素 ^{225}Ac 在表达少量抗原和大量抗原的肿瘤中的积聚,在此实施例中分别是表达DLL3的SHP77肿瘤和表达HER2的BT474肿瘤。

[1290] 此项研究的目的是观察在携带BT-474肿瘤(乳腺癌细胞)的裸鼠中跨选择的测试物品的 ^{111}In 放射性标记SPECT/CT成像的生物分布。以下物品以约4的CAR进行测试: ^{111}In -H101-4-1、 ^{111}In -H1014-2、 ^{111}In -H105-4-2、 ^{111}In -H107-4-2和 ^{111}In -H108-4-2。图9A、9B和9C显示 ^{111}In -H101-SL、 ^{111}In -H101-4-2和 ^{111}In -H108-4-2的随时间推移的组织积聚。图9D显示在HER2+肿瘤模型中使用靶向DLL3的VHH-Fc的最小肿瘤积聚,进一步证明了靶向HER2的VHH-Fc的特异性。图10A、10B和10C显示肿瘤:组织的比率。在每种情况下,肿瘤:组织的比率均大于5,指示肿瘤积聚增加,并且用于确定安全性的数据更好(例如,与较低的肿瘤:组织的比率相比)。图11显示 ^{111}In -H101-4-2、 ^{111}In -H105-4-2、 ^{111}In -H107-4-2和 ^{111}In -H108-4-2在144小时的% ID/g。在每种情况下,VHH-Fc变体都显示对肿瘤组织的有利靶向。图12显示VHH-Fc(H101)和VHH-Fc变体(H105、H107和H108)的全身清除,其中VHH-Fc变体显示清除增加,从而在考虑安全性和防止不想要的组织毒性时可以是进一步有利的。在所有情况下,所有测试物品都避免了显著的肾积聚,进一步证明了良好的安全性并且避免了不想要的组织毒性。表13具体地显示了 ^{111}In -H101-4-2、 ^{111}In -H105-4-2、 ^{111}In -H107-4-2和 ^{111}In -H108-4-2随时间推移的肿瘤积聚。

[1291] 表13:抗HER2 VHH-Fc变体的肿瘤积聚(平均值% ID/g;n=4)

[1292]

		4 h	24 h	48 h	72 h	144 h
¹¹¹ In-H108-4-2	平均值	4.7	12.2	14.4	12.7	13.7
	SEM	0.6	1.8	2.1	0.9	2.2
¹¹¹ In-H101-4-2	平均值	4.9	9.3	14.2	14.1	11.1
	SEM	0.5	1.1	2.0	2.6	2.6
¹¹¹ In-H105-4-2	平均值	4.9	7.1	9.0	9.4	9.0
	SEM	1.1	2.0	1.9	2.2	1.8
¹¹¹ In-H107-4-2	平均值	6.2	12.6	18.6	18.0	17.1
	SEM	1.1	1.9	2.3	2.6	2.8

[1293] 在DLL3+SHP-77肿瘤中随时间推移的生物分布和组织积聚

[1294] 此项研究的目的是观察在携带SHP-77肿瘤的裸鼠中跨选择的测试物品的 ^{111}In

SPECT/CT的生物分布。与HER2相比,DLL3通常以较低的拷贝数存在于细胞表面上。因此,DLL3代表靶向低拷贝数靶蛋白的能力,而HER2代表安全且有效地靶向高拷贝数靶蛋白的能力。测试了以下物品: ^{111}In -D102-4-2、 ^{111}In -D111-4-2、 ^{111}In -D113-4-2和 ^{111}In -D114-4-2。有趣的是,对DLL3模型观察到与HER2模型相似的靶向特性和观察结果,说明靶向高拷贝数和低拷贝数靶标的能力。图13显示 ^{111}In -D102-4-2肿瘤:组织比率和图14显示 ^{111}In -D1024-2、 ^{111}In -D1114-2、 ^{111}In -D113-4-2和 ^{111}In -D114-4-2在144小时的% ID/g。如针对HER2所观察的那样,抗DLL3 VHH-Fc显示对肿瘤组织的有利靶向。另外,肝积聚指示清除增加,从而在考虑安全性和防止不想要的组织毒性时可以是进一步有利的。在所有情况下,所有测试物品都避免了显著的肾积聚,进一步证明了良好的安全性并且避免了不想要的组织毒性。表14具体地显示了 ^{111}In -D102-4-2、 ^{111}In -D111-4-2、 ^{111}In -D113-4-2和 ^{111}In -D114-4-2随时间推移的肿瘤积聚。

[1295] 表14:抗DLL3 VHH-Fc变体的肿瘤积聚(平均值% ID/g;n=4)

[1296]	^{111}In -D102-4-2		4 h	24 h	48 h	72 h	144 h
		平均值	6.0	12.8	18.0	19.0	23.7
		SEM	0.7	1.7	2.1	2.1	5.4
[1297]	^{111}In -D111-4-2	平均值	5.5	12.8	16.6	16.8	15.9
		SEM	1.4	1.1	2.0	2.3	2.9
	^{111}In -D113-4-2	平均值	4.5	8.7	10.0	9.4	5.7
		SEM	0.6	1.2	1.4	1.2	0.9
	^{111}In -D114-4-2	平均值	5.1	10.9	14.6	15.8	13.2
		SEM	0.5	0.9	1.6	2.4	3.1

[1298] 总而言之, ^{111}In 成像结果显示,使用放射性标记的VHH-Fc和VHH-Fc变体可以实现对高拷贝数和低拷贝数靶标的靶向。这些结果进一步指示靶向肿瘤组织、避免非肿瘤组织以及在某些情况下有效清除放射性标记的VHH-Fc(例如,具有降低FcRn亲和力的突变的VHH-Fc)的良好的安全性和特异性特性。

[1299] ^{225}Ac 放射性标记的VHH-Fc的生物分布和组织积聚

[1300] 此项研究的目的是观察以下的生物分布:(i) BT-474肿瘤小鼠模型中的 ^{225}Ac 放射性标记的HER2 VHH-Fc,如上文所述;以及(ii) SHP-77肿瘤小鼠模型中的 ^{225}Ac 放射性标记的DLL3 VHH-Fc,如上文所述。通过伽马计数实现了在肿瘤和正常组织中的离体放射性定量。

[1301] 如本文所述,HER2模型代表在癌细胞上具有高受体密度(例如,约300,000个拷贝/细胞)的靶标。图15A显示 ^{225}Ac -H101-4-2和 ^{225}Ac -H108-4-2在144小时的% ID/g。两种测试物品均显示有利的靶向特性,与 ^{111}In 成像数据一致。值得注意的是,肿瘤组织的特异性靶向是使用与成像数据一致的有利的肿瘤:组织的比率实现的。对于VHH-Fc变体 ^{225}Ac -H108-4-2,在血液中检测到较低的放射性,指示VHH-Fc变体的清除更快速(与实施例10中的结果一致)。 ^{225}Ac -H108-4-2还展示较少的肾积聚和较多的肝积聚,指示通过肝途径的清除增加以及避开了肾,这进一步支持具有FcRn突变的VHH-Fc的安全性增加。 ^{225}Ac -H108-4-2的较低肿瘤积聚可能归因于血清半衰期缩短(即,清除更快速)。表15还显示注射之后第6天的肿瘤体积,其中在施用 ^{225}Ac -H101-4-2和 ^{225}Ac -H108-4-2之后肿瘤体积减小。表15指示,注射具有野生型Fc或具有FcRn突变的VHH免疫缀合物的小鼠在注射后6天均肿瘤缩小。

[1302]

表15: 抗HER2 VHH-Fc 治疗之前及之后的肿瘤体积 (平均值 mm ³ ; n = 5)										
	天数	-15	-11	-8	-6	-4	-1	0 (剂量)	3	6
²²⁵ Ac-H101-4-2	平均值	57.4	66.5	51.9	54.7	65.6	73.9	74.4	31.3	47.0
	SD	19	10	10	10	20	36	22	11	12
²²⁵ Ac-H108-4-2	平均值	46.4	56.5	67.9	63.2	67.3	62.6	78.1	46.2	51.2
	SD	9	11	16	12	14	14	27	19	23

[1303] 如本文所述, DLL3代表在癌细胞上具有低靶标密度(例如, 约3,000个拷贝/细胞)的靶标。图15B显示²²⁵Ac-D102-4-2和²²⁵Ac-D114-4-2在144小时的% ID/g。两种测试物品均显示有利的靶向特性, 与¹¹¹Ln成像数据一致。另外, 肿瘤组织的特异性靶向是使用与成像数据一致的有利的肿瘤:组织的比率实现的。如使用抗HER2 VHH-Fc变体所观察到的, 对于VHH-Fc变体²²⁵Ac-D114-4-2, VHH-Fc变体显示清除率增加以及肾脏暴露减少, 从而在考虑安全性和防止不想要的组织毒性时可以是进一步有利的。²²⁵Ac-D114-4-2的较低肿瘤积聚可能归因于血清半衰期缩短(即, 清除更快速)。

[1304] 实施例B-29. 与VHH-Fc放射性免疫缀合物相关联的低毒性

[1305] 进行了研究以确定加载了²²⁵Ac的VHH-Fc的耐受性。以四个不同的活性剂量水平(18.5kBq、12kBq、6kBq、2kBq), 向幼稚雌性无胸腺裸小鼠的尾部静脉中静脉内注射(IV) ²²⁵Ac-H101-4-2(具有野生型Fc的抗HER2, 螯合因子-接头4-2)或²²⁵Ac-H107-4-2(具有H310A Fc的抗HER2, 螯合因子-接头4-2)。针对注射当天测量的体重调整活性剂量体积。每天监测所有动物的不良作用。所有动物每周记录三次(有时两次或四次)体重, 直到注射后23天研究结束。注射后23天处死所有动物。对尸体进行解剖。记录全身、脾和肝的重量。图16A、16B和16C显示, 如通过重量变化百分比(16A)、肝质量(16B)和脾质量(16C)所测量, 高达740kBq/kg的所有剂量的²²⁵Ac标记的抗体均具有良好的耐受性, 并且没有观察到放射病的指示。

[1306] 实施例B-30. SHP77异种移植小鼠的功效测试

[1307] 使用SHP77肺癌细胞系进行抗DLL3 VHH-Fc(WT和不同变体)的功效研究。将选择肿瘤大小相似的八十(80)只动物进行测试物品注射。将研究的动物分配到以下各组, 并且在尾部静脉中以单次弹丸式静脉内注射(IV)注射标记的测试物品。每只小鼠的靶标注射体积150μL, a)第1组: IV注射媒介物(PBS), n=8; b)第2组: IV注射V002(无放射性标记), n=8; 第3组: IV注射²²⁵Ac-V002-4-2, 低剂量, n=8; 第4组: IV注射²²⁵Ac-V002-4-2, 高剂量, n=8; 第5组: IV注射²²⁵Ac-V014-4-2, 低剂量, n=8; 第6组: IV注射²²⁵Ac-V014-4-2, 高剂量, n=8; 第7组: IV注射¹⁷⁷Lu-V002-4-2, 低剂量, n=8; 第8组: IV注射¹⁷⁷Lu-V002-4-2, 高剂量, n=8; 第9组: IV注射¹⁷⁷Lu-V014-4-2, 低剂量, n=8; 第10组: IV注射¹⁷⁷Lu-V014-4-2, 高剂量, n=8。

[1308] 两种测试物品的活性剂量水平为: a) ²²⁵Ac: 6kBq/小鼠(低), 18.5kBq/小鼠(高); b) Lu-177: 350kBq(低), 700kBq(高)。

[1309] 两种测试物品的质量剂量水平: 基于活性剂量和比活性。a) 对于²²⁵Ac组: 10μg/小鼠(低), 31μg/小鼠(高); b) 对于¹⁷⁷Lu组: 10μg(低), 20μg(高)。

[1310] 在给药当天或前一天对动物进行称重并测量肿瘤(参考数据)。每天将监测所有动物的不良作用。对于任何具有不良作用的动物, 将在幸福评分表(welfare scoring sheet)

(附录) 上对受影响的动物进行评分。给药之后, 每天检查小鼠, 每周称重两次, 并且每周用卡尺进行肿瘤测量三次, 持续长达12周 (但预计对照组1和2仅约4周)。当体重减轻10%或更多时, 体重测量的频率将增加。将采取一些行动, 诸如提供捣碎的食物或凝胶食物。许可限制是体重减轻15%。如果肿瘤超过限制 (长度 $\times$ 宽度=144mm²), 则动物将在计划的研究结束之前被安乐死。虽然为了清楚和理解的目的已经对前述发明进行了一些详细的描述, 但是技术人员通过阅读本公开将明白, 在不脱离本发明的真实范围的情况下, 可以进行形式和细节的各种变化。例如, 上文所述的所有技术和装置可以呈各种组合的形式使用。本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和/或其他文献出于所有目的各自以引用的方式整体并入, 就如同每个单独的出版物、专利、专利申请和/或其他文献单独被指示为出于所有目的以引用的方式并入。

[1311] 实施例B-31. 使用¹⁷⁷Lu进行放射性标记

[1312] 将50 μ g测试物品 (D102) 用0.1M pH 5.5的乙酸铵缓冲液在500 μ L lo-bind Eppendorf管中稀释至100 μ L, 并且添加在3.2 μ L-3.5 μ L¹⁷⁷-氯化镧中的51MBq且使用移液管混合。将反应混合物于培养箱中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时, 并且在30min以及1h、2h和3h取出样品以进行iTLC分析。标记结果示于以下表16中, 并且指示用¹⁷⁷-镧的有效标记。

[1313]

表16				
测试品	在37 $^{\circ}$ C下的孵育时间			
D102	30 min	60 min	2 hr	3 hr
化合物4-2	99.0%	99.2%	99.2%	99.3%

[1314] 在PBS/抗坏血酸盐中稀释并在4 $^{\circ}$ C下储存之后, 通过如实施例22中的iTLC分析评估纯度。

[1315] 为了分析稳定性, 将50 μ L测试物品添加至200 μ L PBS/抗坏血酸盐中并在4 $^{\circ}$ C下储存。1-4h和18-24h之后通过iTLC和SEC-HPLC分析样品。结果示于以下表17中, 并且指示构建体的稳定性。

[1316]

表17		
测试品	孵育时间	
D102	1 hr	1 d
化合物4-2	98.8%	98.6%

[1317] 通过上文实施例23中所述的IRF测定来分析¹⁷⁷Lu缀合物, 并且结果显示在图17中。在此实施例中, 对照是未加载抗原的珠粒。

[1318] 实施例B-32. Bn-DOTA化合物的结合测定

[1319] 在一些情形下, 缀合可能对VHH-Fc与靶蛋白的结合产生负面影响。因此测试了VHH-Fc缀合物的结合。

[1320] 通过流式细胞术针对与一系列靶标阳性癌细胞系的结合来筛选ACC缀合物。除非另有说明, 否则所有细胞系均来源于ATCC, 并根据制造商的说明和推荐培养基进行培养。HER2阳性细胞系 (针对V001缀合物) 为BT474 (ATCC#HTB-20)。将SHP-77 (ATCC CR1-2195) 细胞用作DLL3阳性细胞系 (针对V002和V038缀合物)。HER2阴性细胞系为SHP-77。DLL3阴性细

胞系为BT-474。将以与ELISA相同的方式稀释的一抗添加到细胞中并在冰上孵育1小时。将细胞用1%在PBS中的FBS洗涤两次,以450G离心4分钟,并在冰上与2 μ g/mL AlexaFluor 647缀合的抗人IgG (Jackson, 目录号109-605-098) 或AlexaFluor 647缀合的抗小鼠IgG (Jackson, 目录号115-605-164) 与1:1000DAPI (Biolegend, 目录号422801) 一起孵育30分钟。在另外两次洗涤后,将细胞重悬并在iQue筛选平台 (Intellicyt) 上通过流式细胞术进行分析,并根据标准方案用Forecyt处理数据。

[1321] 实施例B-33. 体外血浆稳定性测定

[1322] 为了评价新型螯合因子-接头在其将在血流中循环时的稳定性,可以准备测试品的片段并对其进行本领域已知的质量引导的测定。

[1323] 可以根据Choi, T.A. 等人J. Pharm. Sci., 2015, 104, 1832-1838, 通过血浆稳定性测定来评价化合物。将小鼠和人血浆用PBS (pH 7.4, 100mL) 以1:1稀释。向该溶液中添加化合物并稀释30倍至最终浓度为15 μ M。以一式两份准备测试品。在所需时间点,将100 μ L等分试样的测试样品通过添加至2倍体积的冷冻乙腈 (其可能含有内标物) 中淬灭。通过以4000g离心或使用0.2 μ m膜离心过滤器过滤并以3000g离心10min来去除蛋白质。然后注射上清液以在LC-MS/MS上进行分析,从而分析剩余的母体化合物的量。通过使用可为每种所分析的化合物专门设计的方法比较标准峰面积来计算剩余%。可替代地,内标物可以用于更精确的测量。

[1324] 实施例B-34. 肝脏S9代谢稳定性测定

[1325] 为了评价在施用放射性缀合物的过程中可能释放的螯合因子-接头片段的代谢特性 (包括增加或降低的肝脏清除) 的任何变化,可以根据本领域从业人员已知的方法进行包括肝脏S9级分测定的代谢稳定性测定。

[1326] 肝脏S9代谢稳定性可以根据Richardson, S.J. 等人Drug Metabolism Letters, 2016, 10, 83-90进行。简言之,人肝脏S9级分 (混合性别) 是一种商业产品并且应采购。在dH₂O中制备含2mM MgCl₂的200nM tris溶液并用1M NaOH调节至pH 7.4。在DMSO中制备待分析化合物的储备溶液至50mM。在临用于dH₂O中之前将其稀释至0.3mM。在上述tris缓冲液中分别制备40、20和2mM的NADPH、UDPGA和GSH溶液。在上述tris缓冲液中制备2mg/mL的PAPS。在临用前,以1:1:1:1的比例混合在tris中的四种溶液。

[1327] 对于所述测定,在37 $^{\circ}$ C,在96孔板的孔中,将每种化合物与S9级分一起在pH 7.4的tris缓冲液中预孵育5min。接下来,添加上述新鲜制备并混合的辅因子溶液。在适当的时间点取出等分试样,将其通过添加两体积冰冷的50:50MeCN/H₂O淬灭。将板以4000g离心10min,以沉淀所沉淀出的蛋白质。注射化合物以在LC-MS/MS上进行分析,从而分析剩余的母体化合物的量。通过使用可为每种所分析的化合物专门设计的方法比较标准峰面积来计算剩余%。

[1328] 实施例B-35. CACO-2渗透性测定

[1329] 为了评价在施用放射性缀合物的过程中可能释放的螯合因子-接头片段的代谢特性 (包括增加或降低的细胞渗透性或通过清除器官的转运) 的任何变化,可以根据本领域从业人员已知的方法进行细胞渗透性测定。

[1330] CACO-2渗透性测定可以根据Richardson, S.J. 等人Drug Metabolism Letters, 2016, 10, 83-90进行。Caco-2细胞的极化培养物可在HTS Transwell板中的聚碳酸酯微孔过

过滤器上获得。这些培养物具有21天的细胞屏障。其他相似类型的位置可用于购买。

[1331] Hank's平衡盐溶液(HBSS)是用于渗透性研究的转运培养基。HBSS含有1.1mM MgCl_2 、1.3mM CaCl_2 和5mM D-葡萄糖。每次实验前,应使用温缓冲液洗涤单层细胞。使用荧光黄的10 μM 溶液检查所有孔的单层完整性,并在每次测定中使用三种对照化合物(阿替洛尔(atenolol)、普萘洛尔(propranolol)和长春碱(vinblastine))。将测试样品在HBSS缓冲液中稀释至最终浓度为10 μM 。将缓冲溶液添加到单层细胞的顶侧或基底侧,每种测试品以一式两份进行。将单层细胞在标准细胞培养箱(5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$)中孵育2h。孵育结束时,从单层细胞的每一侧取出样品并通过LC-MS/MS进行分析。

[1332] 实施例B-36.用 ^{225}Ac 的体内BioD

[1333] 给药动物并离体定量组织中的放射性是一种精确监测用放射性物质治疗期间生物体可能产生的辐射剂量的布置的方法。使用 ^{225}Ac 将提供临床治疗将如何工作的更准确模拟,包括影响螯合因子- ^{225}Ac 复合物的稳定性以及放射性子体离子的性质的因素。

[1334] 本研究将根据实施例B-15进行,其中时间点和计数因子不同,它们解释了测量 ^{225}Ac 及其子体的活性所需的技术。

[1335] 实施例B-37.比较用不同螯合因子-接头可达到的最大剂量的MTD研究

[1336] 该实验比较了用使用不同螯合因子-接头的缀合物可达到的MTD,以便观察新的排泄特性可达到的任何差异。

[1337] 实施例B-38.用异种移植模型以测试具有 ^{225}Ac 和 ^{177}Lu 的主要螯合因子-接头候选物的功效比较

[1338] 使用SHP77肺癌细胞系进行了抗DLL3 VHH-Fc(WT和不同变体)的功效研究。选择八十(80)只具有相似尺寸肿瘤的动物进行测试品注射。将研究动物分配到各组,并将在尾静脉中单次静脉内推注(IV) ^{225}Ac 标记的测试品。目标注射体积为150 μL /小鼠,为每种螯合因子-接头选择低于实施例B-17中确定的MTD的两个剂量水平,其中在与相同的DLL3靶向抗体缀合的4种候选螯合因子-接头之间进行比较。

[1339] 如果基于既往经验,则这两种测试品的活性剂量水平将为:a) ^{225}Ac :6kBq/小鼠(低),18.5kBq/小鼠(高);b) ^{177}Lu :350kBq(低),700kBq(高)。

[1340] 这两种测试品的质量剂量水平:基于活性剂量和比活。a)对于 ^{225}Ac 组:10 μg /小鼠(低),31 μg /小鼠(高);b)对于 ^{177}Lu 组:10 μg (低),20 μg (高)。

[1341] 在给药当天或其前一天对动物称重并测量肿瘤(参考数据)。每天监测所有动物的不良反应。对于具有不良反应的任何动物,在动物福利评分表上开始对受影响动物进行评分。给药后,每天检查小鼠,每周称重两次,并用卡尺每周三次测量肿瘤,持续直至12周(但预期对照组1和2仅持续至约4周)。当体重减轻达到10%或更多时,增加重量测量的频率。采取行动,诸如提供捣碎的食品或凝胶食品。许可限制为重量减轻15%。如果肿瘤超过限值(长 $\times$ 宽=144 mm^2),则在计划的研究结束前对动物实施安乐死。

[1342] 虽然在本文中已经显示和描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员而言将明显的是,此类实施方案仅通过举例的方式来提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应当理解,在实践本发明时,可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。

[1343] 本说明书中提到的所有出版物、专利申请、授权专利以及其他文献均通过引用并

入本文,如同每个单独的出版物、专利申请、授权专利或其他文献被具体和单独地指示通过引用以其整体并入。在与本公开中的定义相矛盾的程度,通过引用并入的文本中所含的定义被排除。

[1344] Fc1 (SEQ ID NO:1)

[1345] I253A

[1346] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1347] Fc2 (SEQ ID NO:2)

[1348] S254A

[1349] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1350] Fc3 (SEQ ID NO:3)

[1351] H310A

[1352] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1353] Fc4 (SEQ ID NO:4)

[1354] H435Q

[1355] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPG

[1356] Fc5 (SEQ ID NO:5)

[1357] Y436A

[1358] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHATQKSLSLSPG

[1359] Fc6 (SEQ ID NO:6)

[1360] H310A/H435Q

[1361] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPG

[1362] Fc7 (SEQ ID NO:7)

[1363] AEASS

[1364] APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1365] Fc8 (SEQ ID NO:8)

- [1366] AEASS/H310A
- [1367] APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1368] Fc9 (SEQ ID NO:9)
- [1369] AEASS/H435Q
- [1370] APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPG
- [1371] Fc野生型 (SEQ ID NO:10)
- [1372] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [1373] 2RS15d (SEQ ID NO:20)
- [1374] QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNSCGMWYRQSPGRERELVSRISGDGDTWHKESVKGRFT ISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAVYFCAVCYNLETY WGQGTQVTVSS
- [1375] 2RS15d CDR1 GYIFNSCG (SEQ ID NO:21)
- [1376] 2RS15d CDR2 ISGDGDT (SEQ ID NO:22)
- [1377] 2RS15d CDR3 AVCYNLETY (SEQ ID NO:23)
- [1378] hz10D9v7.251 (SEQ ID NO:30)
- [1379] EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLMSSSLRAEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGTLLVTVKP
- [1380] hz10D9v7.251 CDR1 GSIFSINA (SEQ ID NO:31)
- [1381] hz10D9v7.251 CDR2 FTGDTNT (SEQ ID NO:32)
- [1382] hz10D9v7.251 CDR3 AADVQLFSRDYEFY (SEQ ID NO:33)

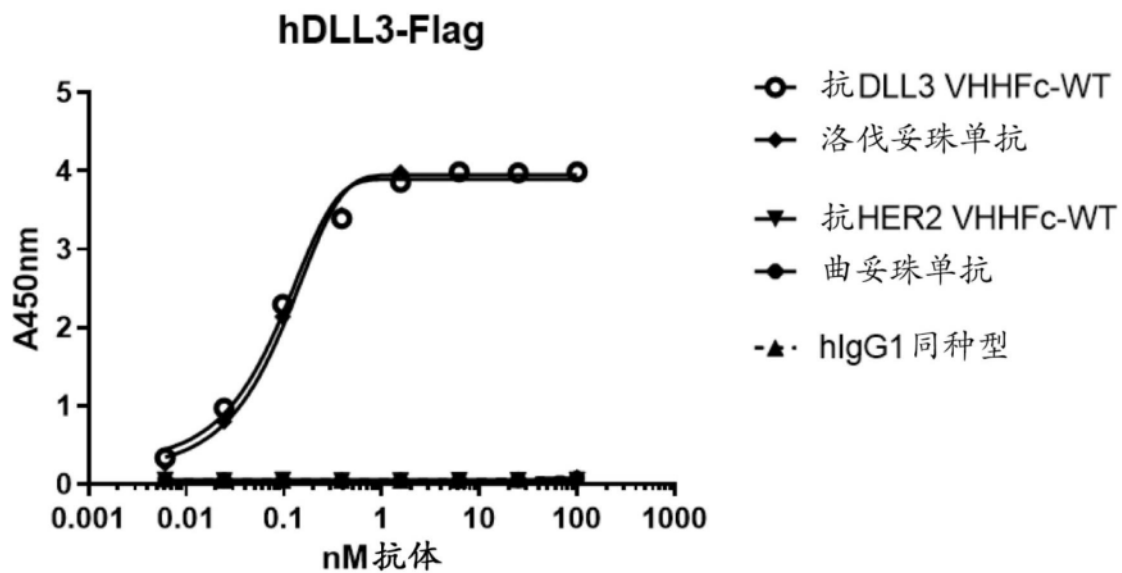


图1A

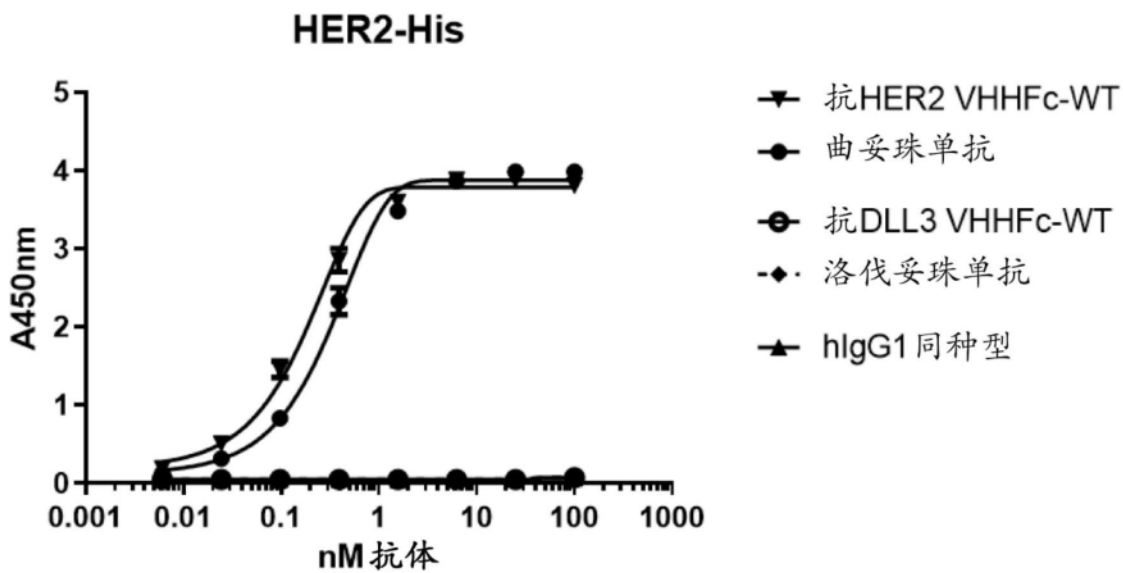


图1B

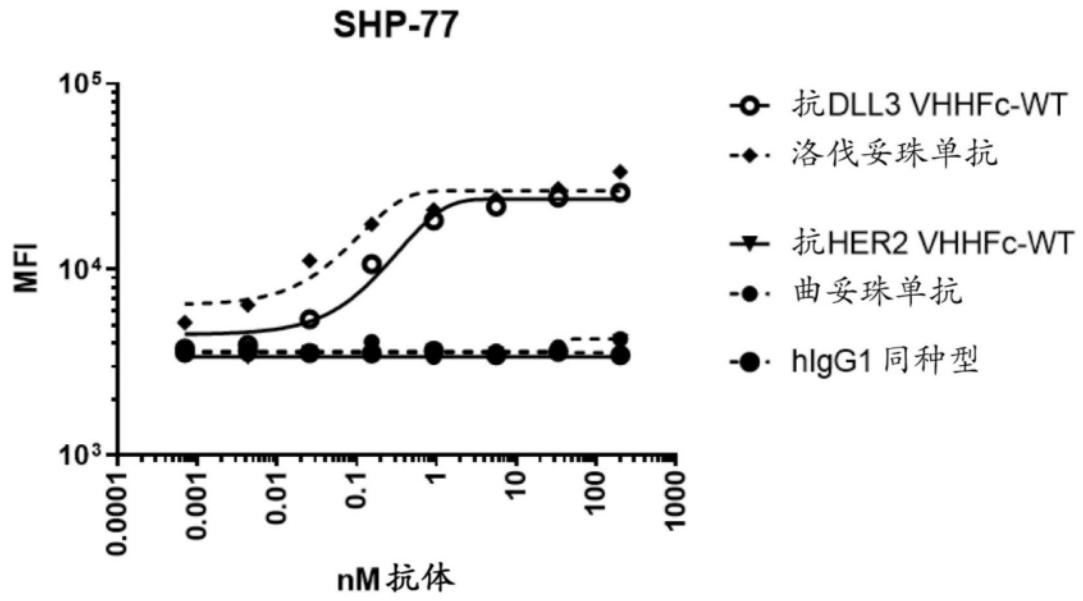


图2A

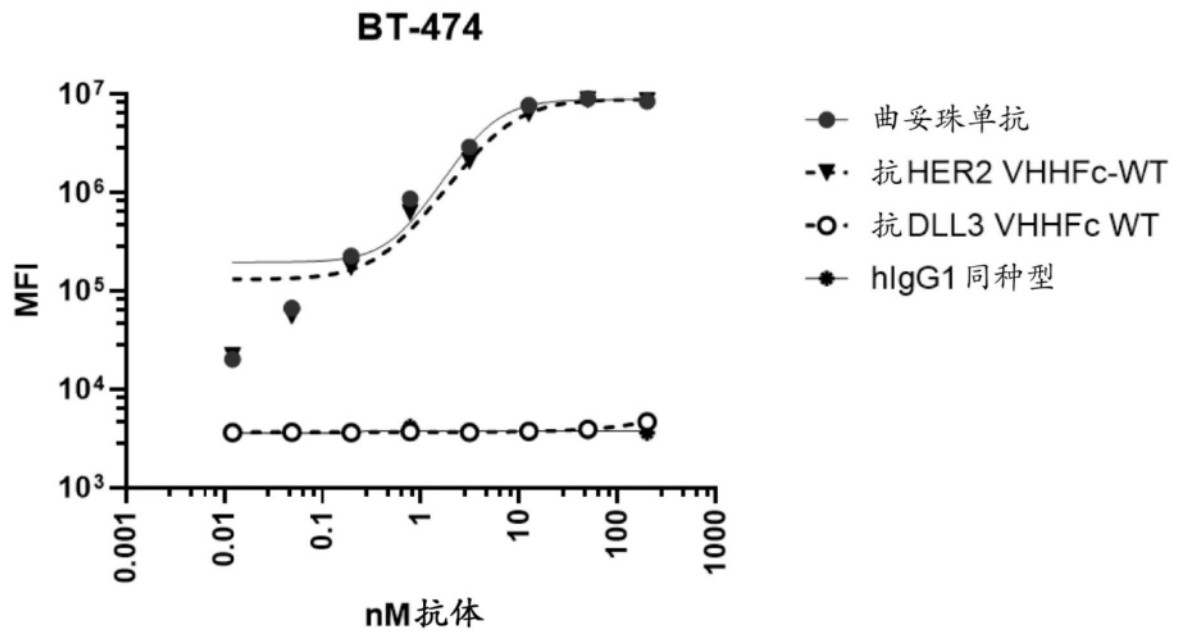


图2B

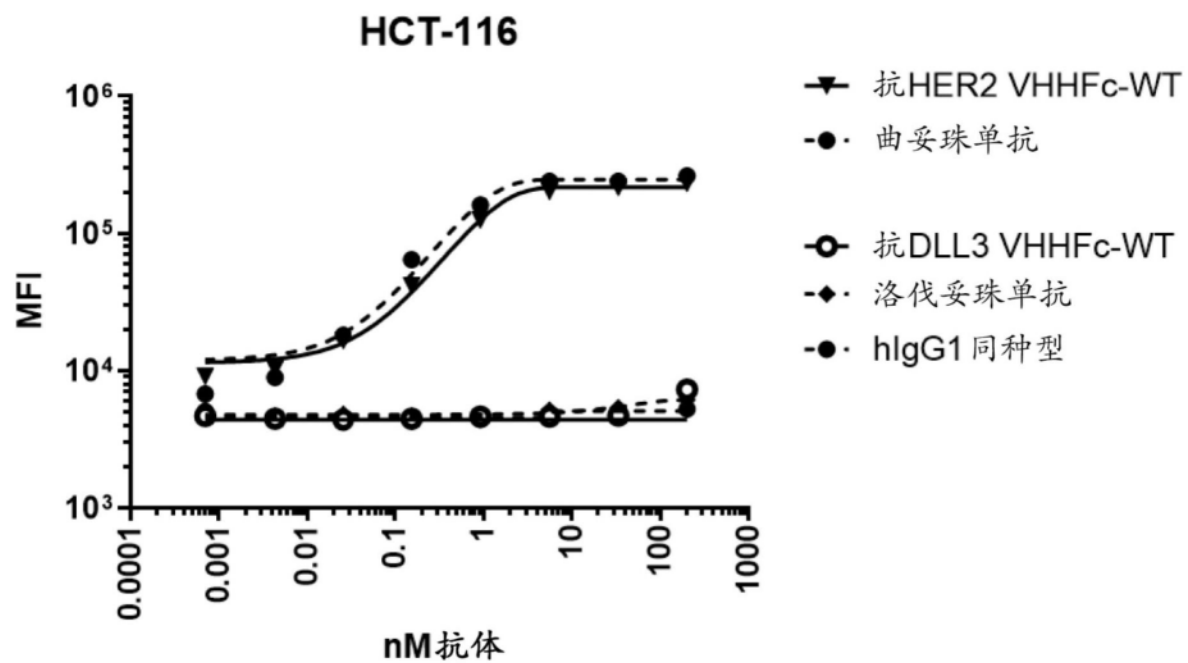


图2C

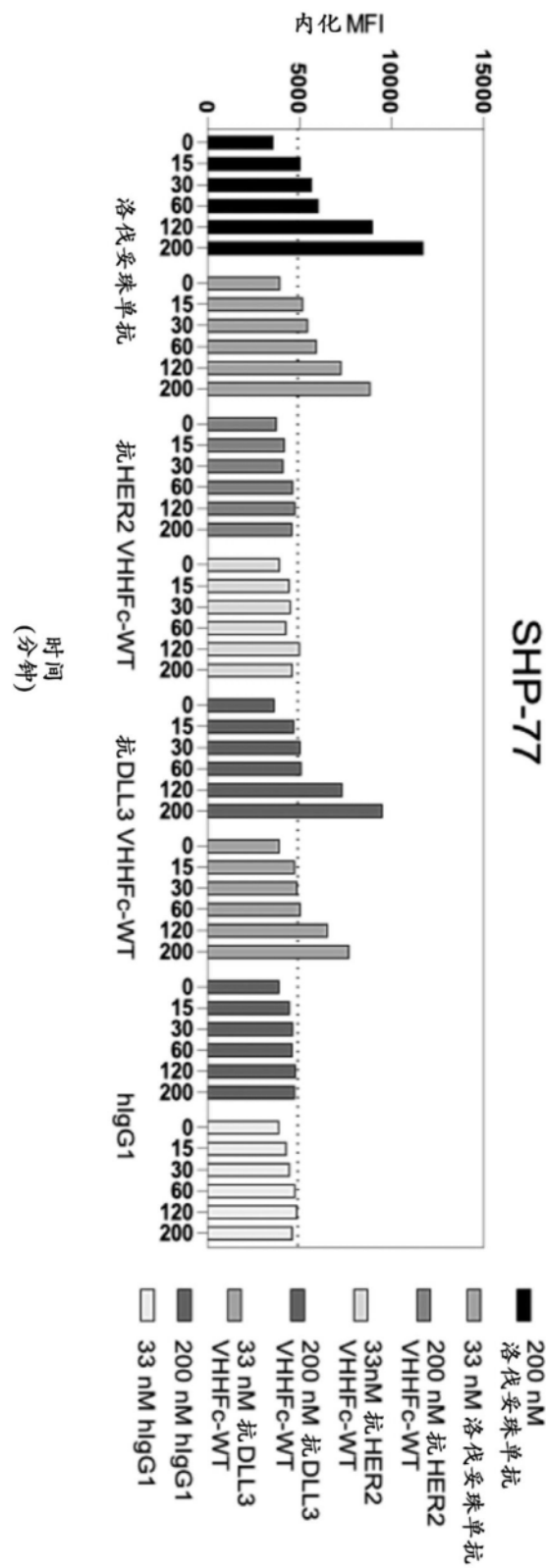


图3A

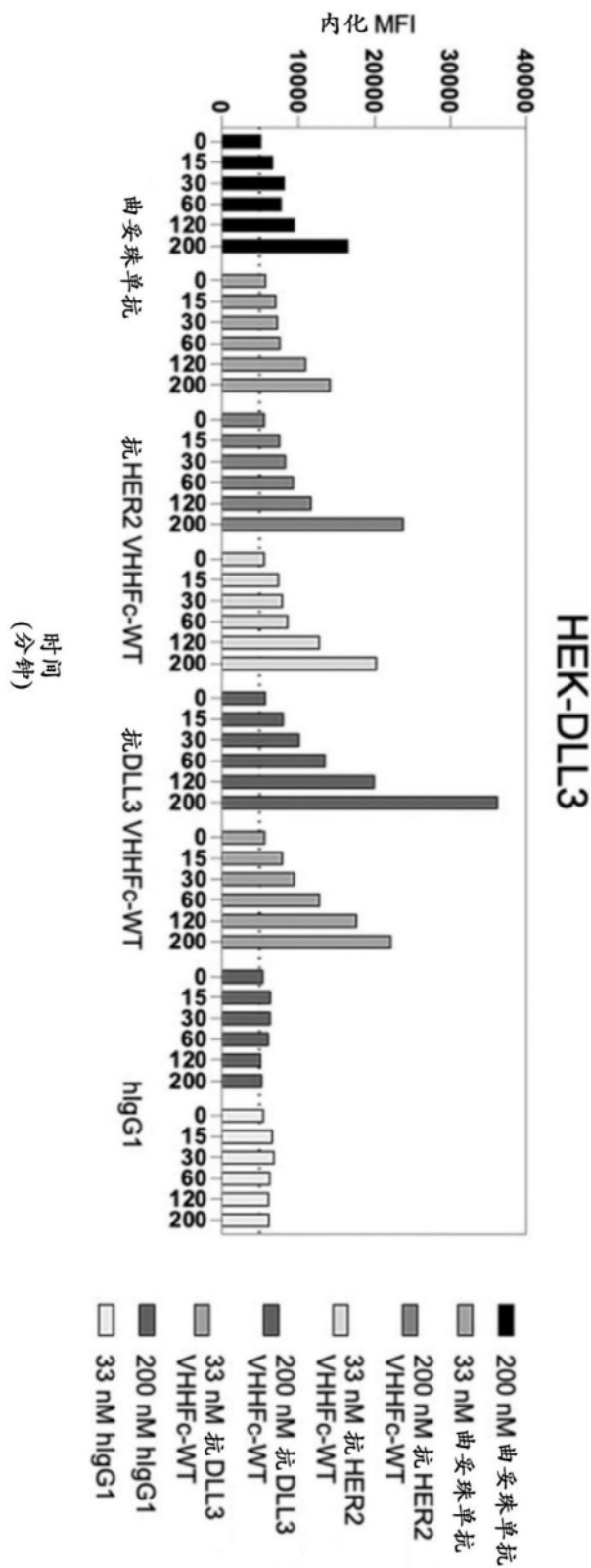


图3B

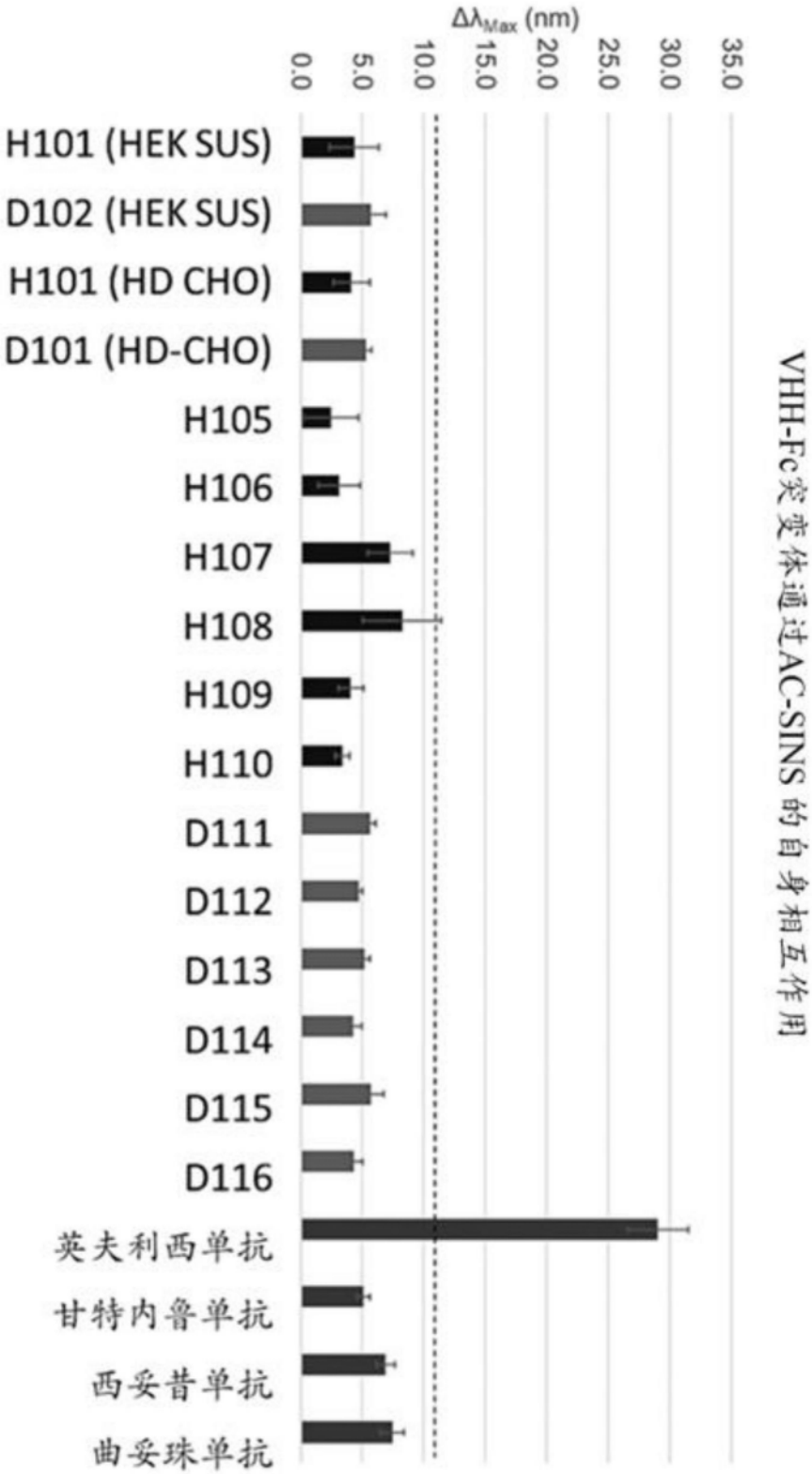


图4

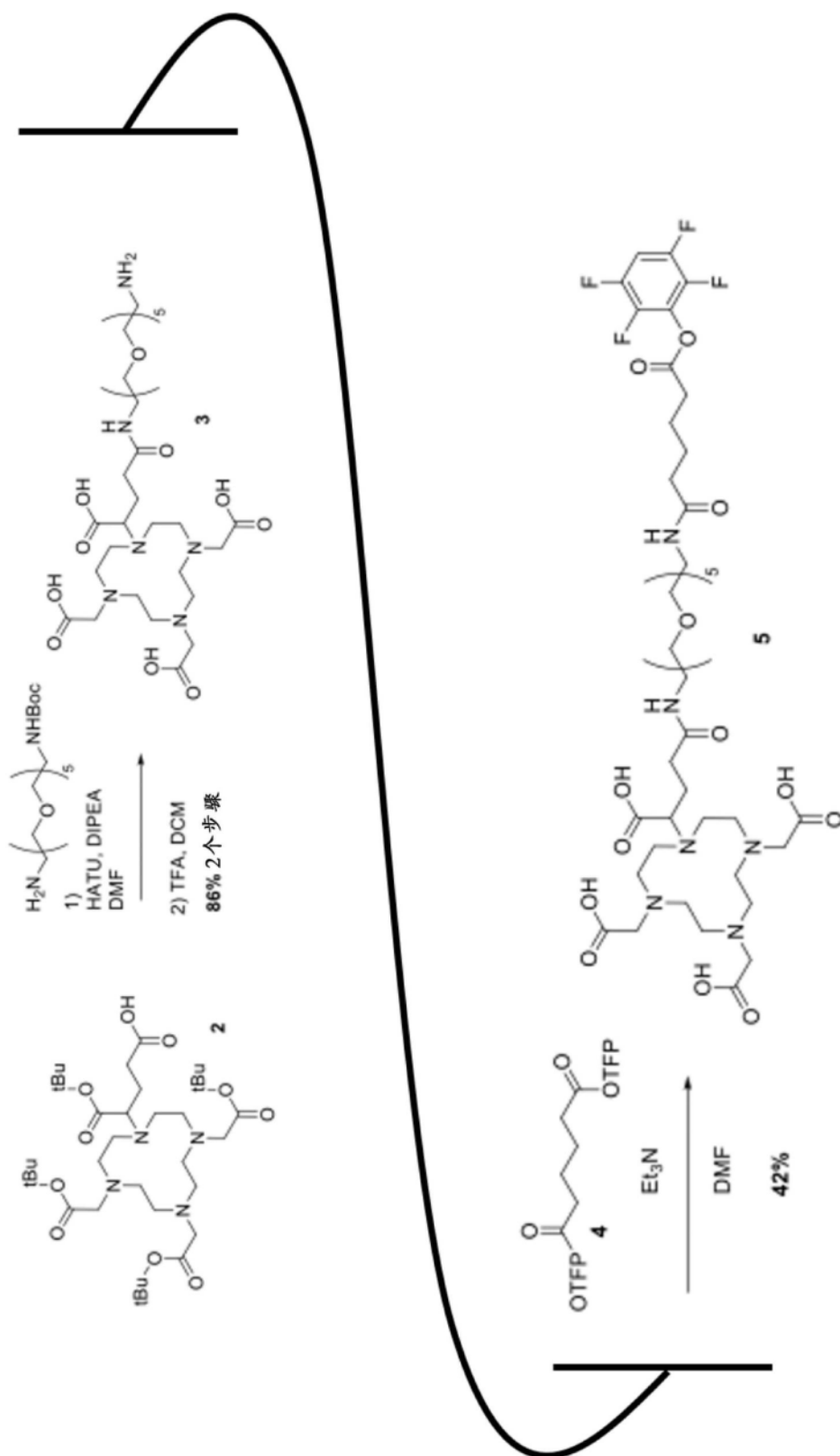
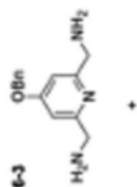
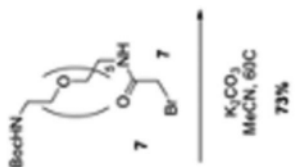
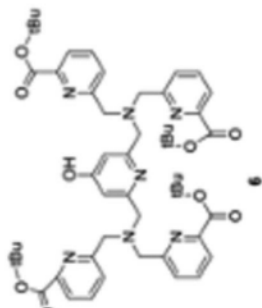


图5

Proteomorphous objects from abiotic backbones
 通过: Delaun, Nicolas; Leger, Jean-Michel; Massip, Stephanie; Huac, Ivan
 Angewandte Chemie, 国际版 (2007), 46(1+2), 214-217

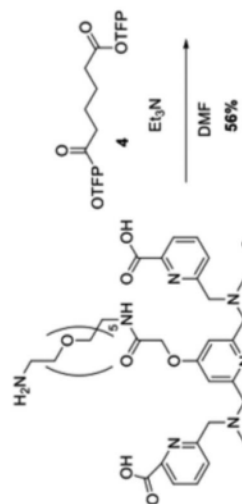
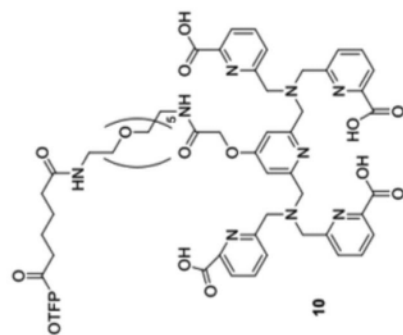
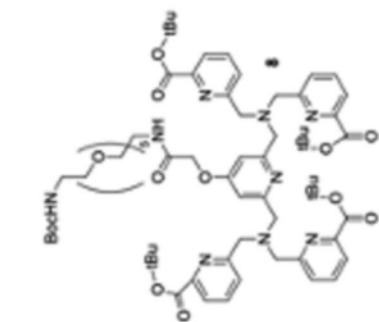


1) 与 DIPEA 组合,
 回流 16 h



K₂CO₃
 MeCN, 60°C

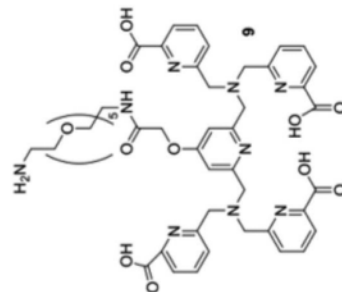
73%



Et₃N

DMF

56%



TFA
 DCM, 18 h
 64%

图6

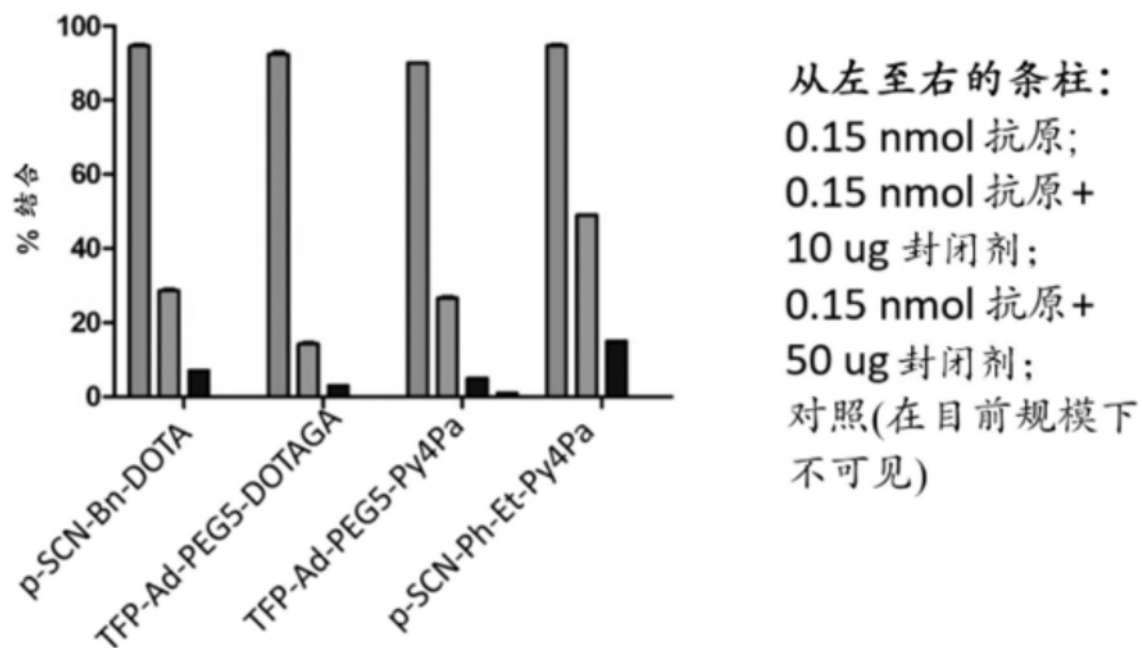


图7A

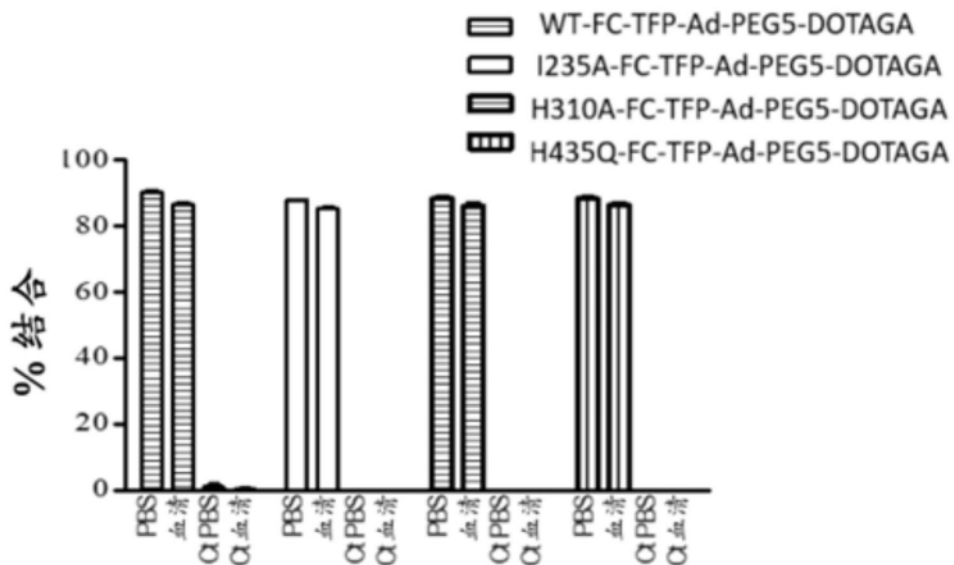


图7B

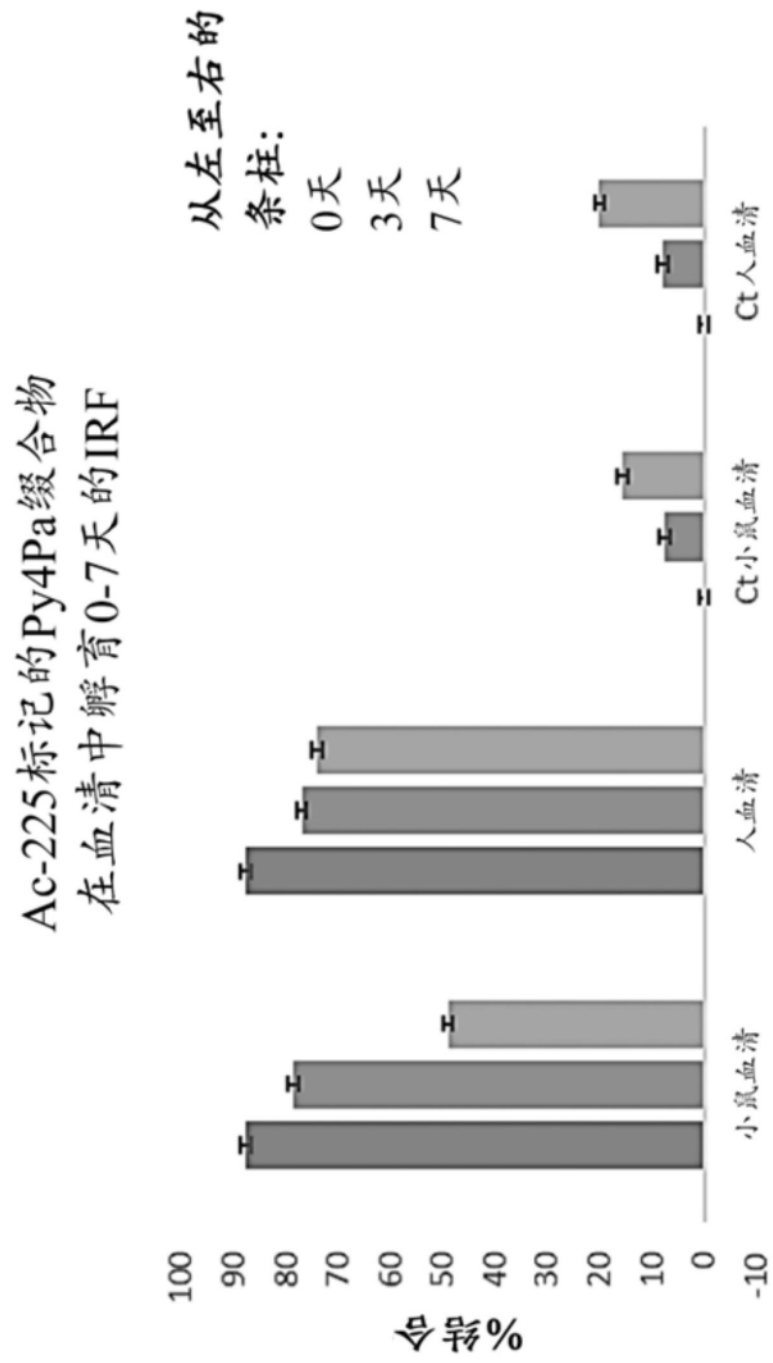


图7C

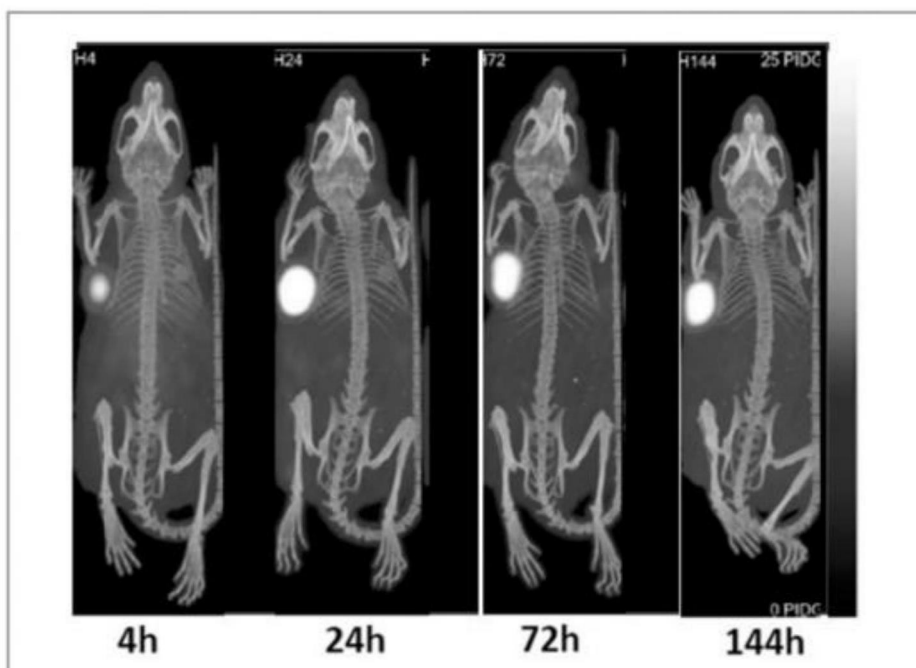
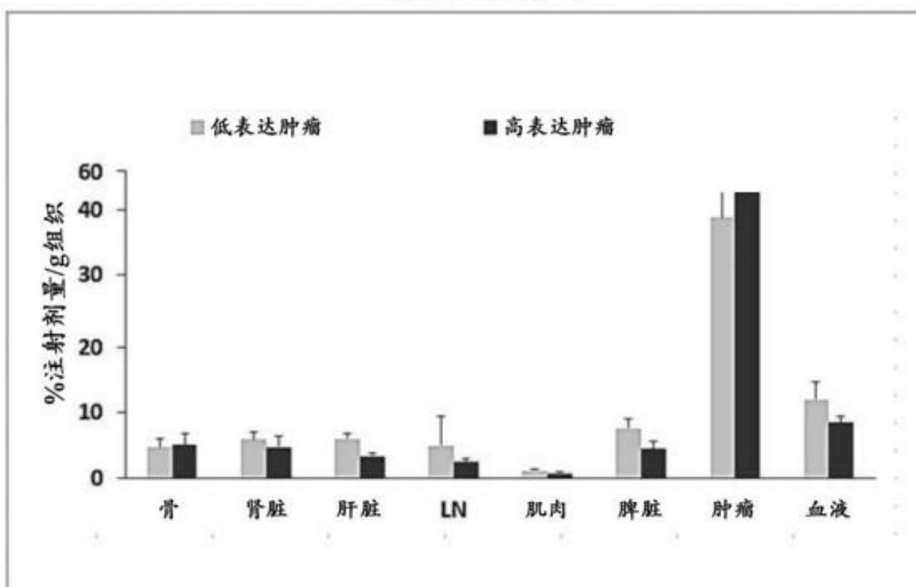
^{111}In SPECT 成像 ^{225}Ac 生物分布

图8

^{111}In -H101-SL的%ID/g

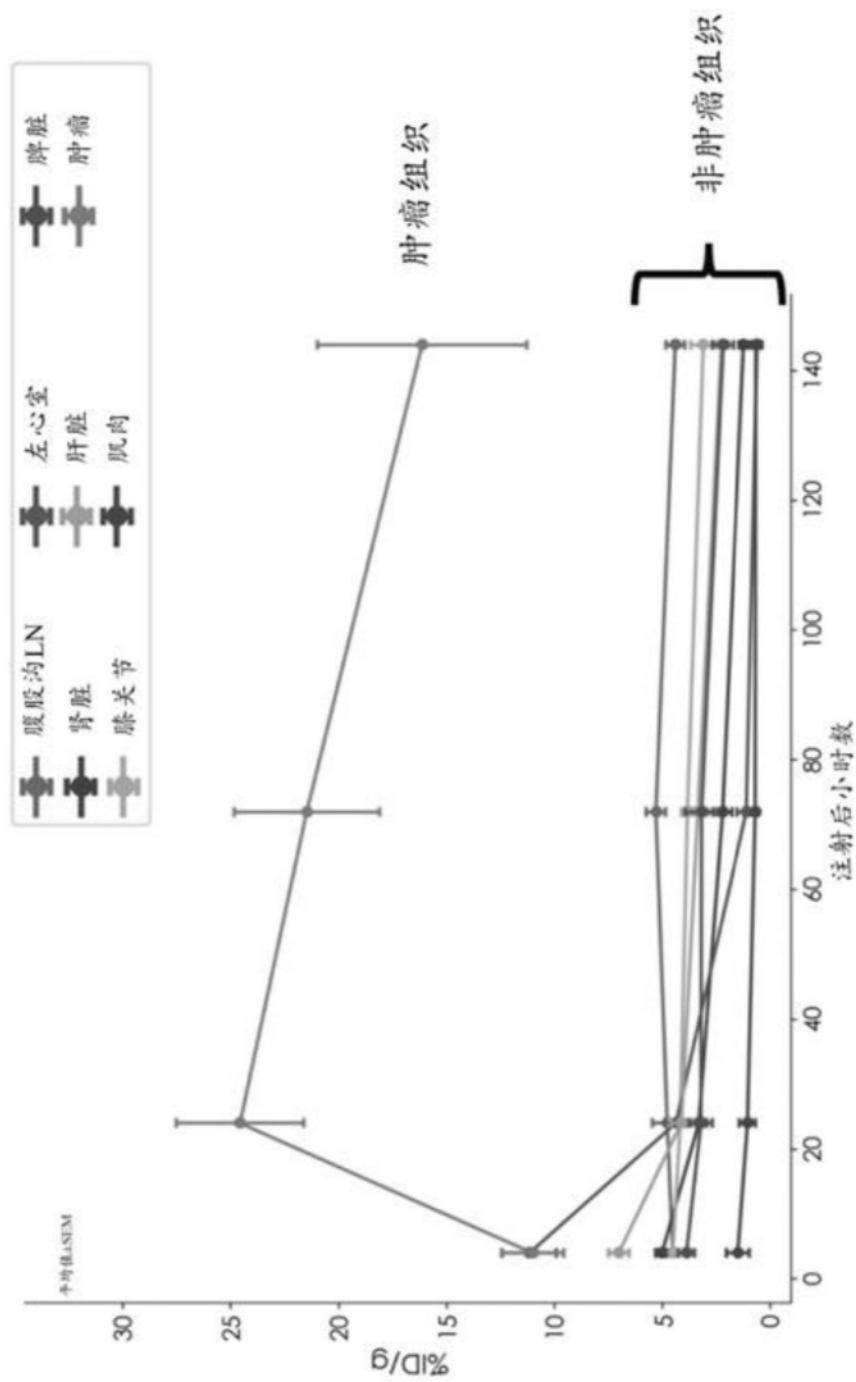


图9A

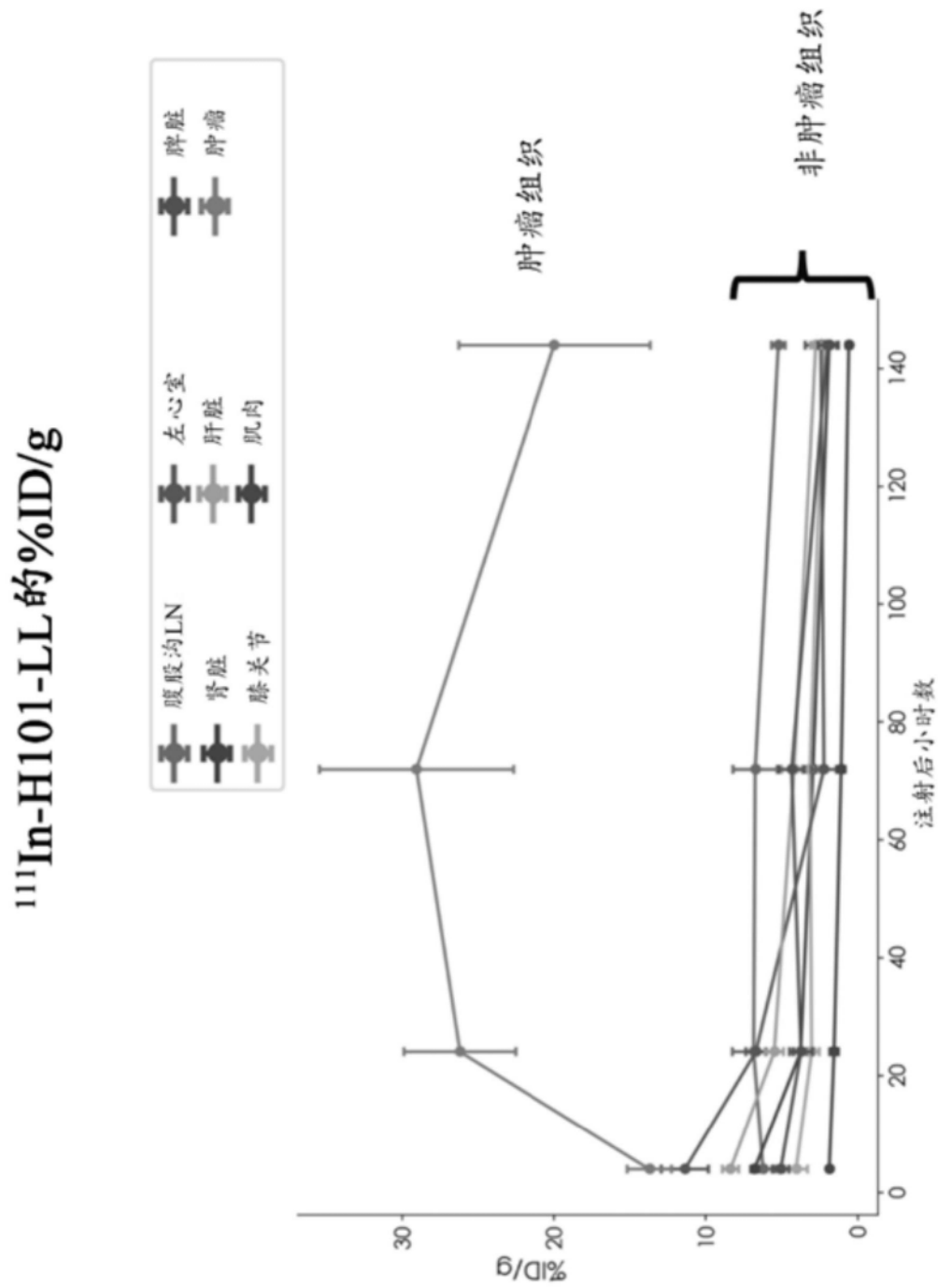


图9B

^{111}In -H108-LL的%ID/g

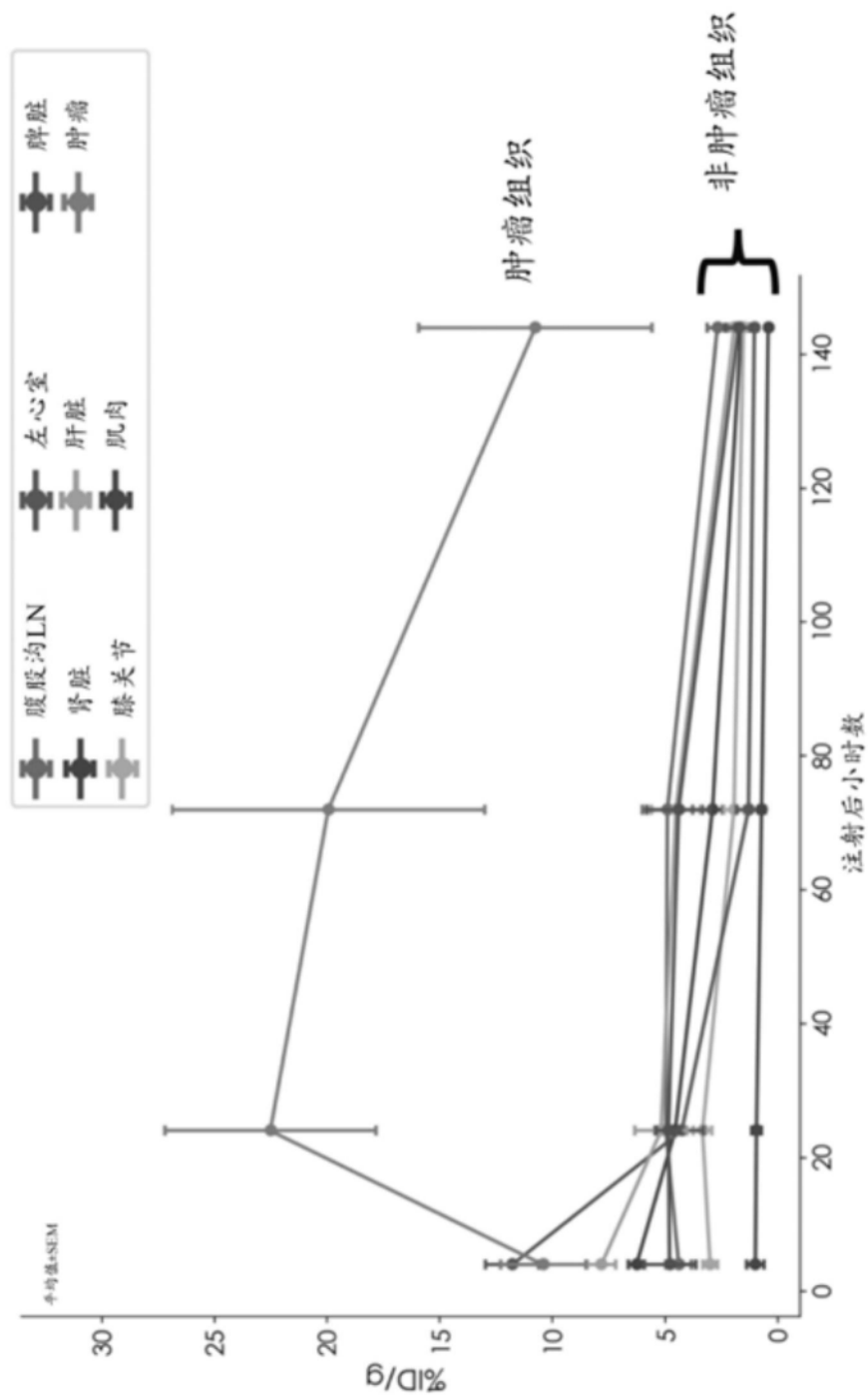


图9C

111In-D102-LL的%ID/g

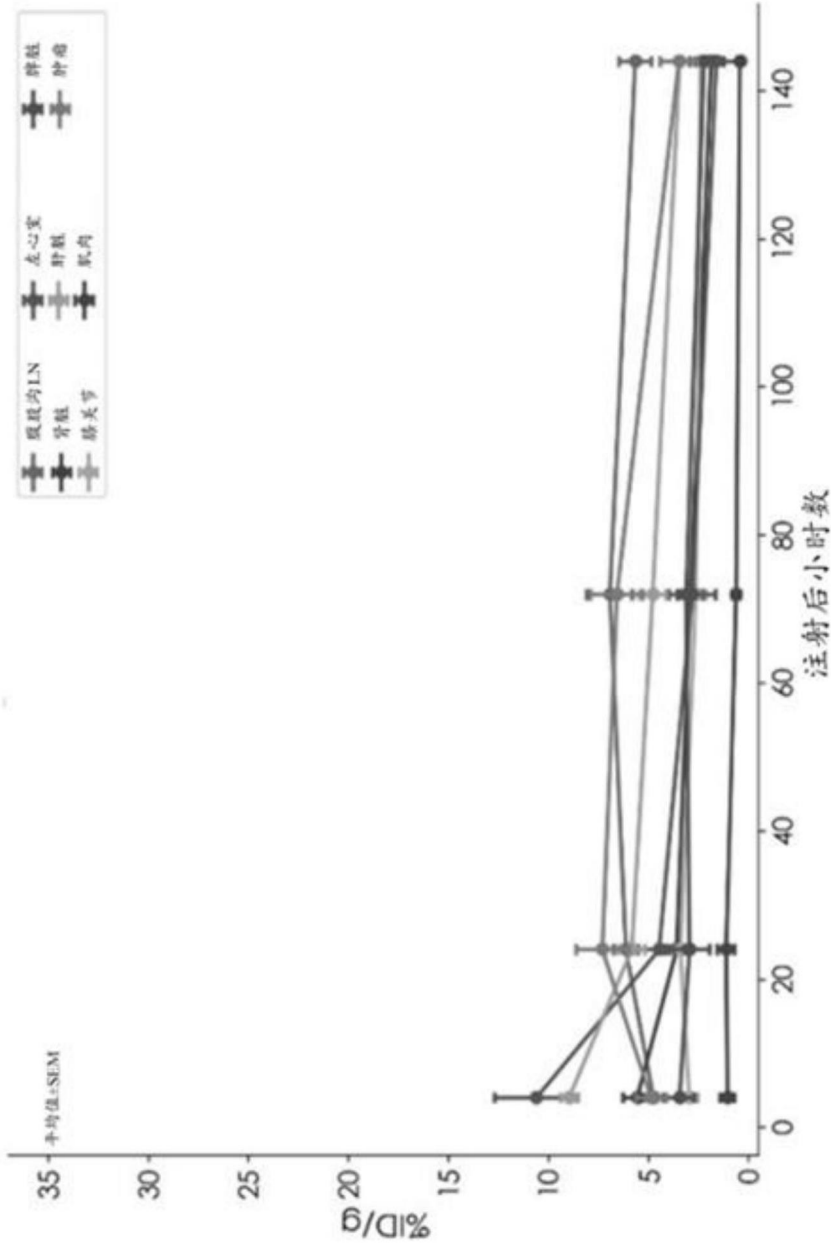


图9D

^{111}In -H101-SL 肿瘤：组织比率
从左至右，条柱表示4、24、72和144小时

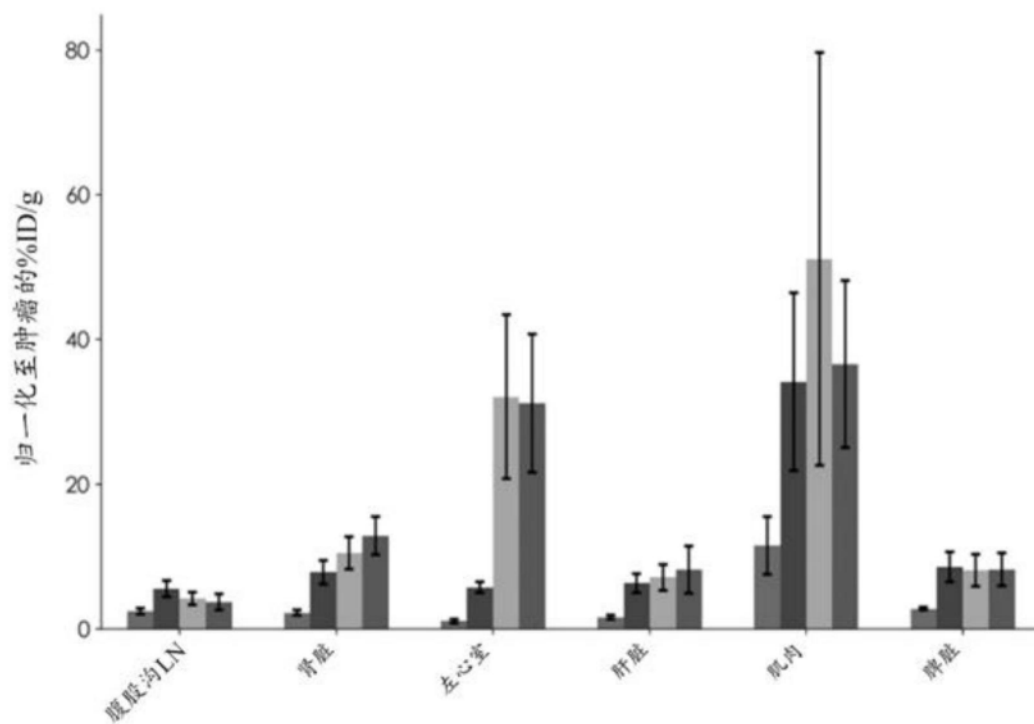


图10A

^{111}In -H101-LL 肿瘤：组织比率
从左至右，条柱表示4、24、72和144小时

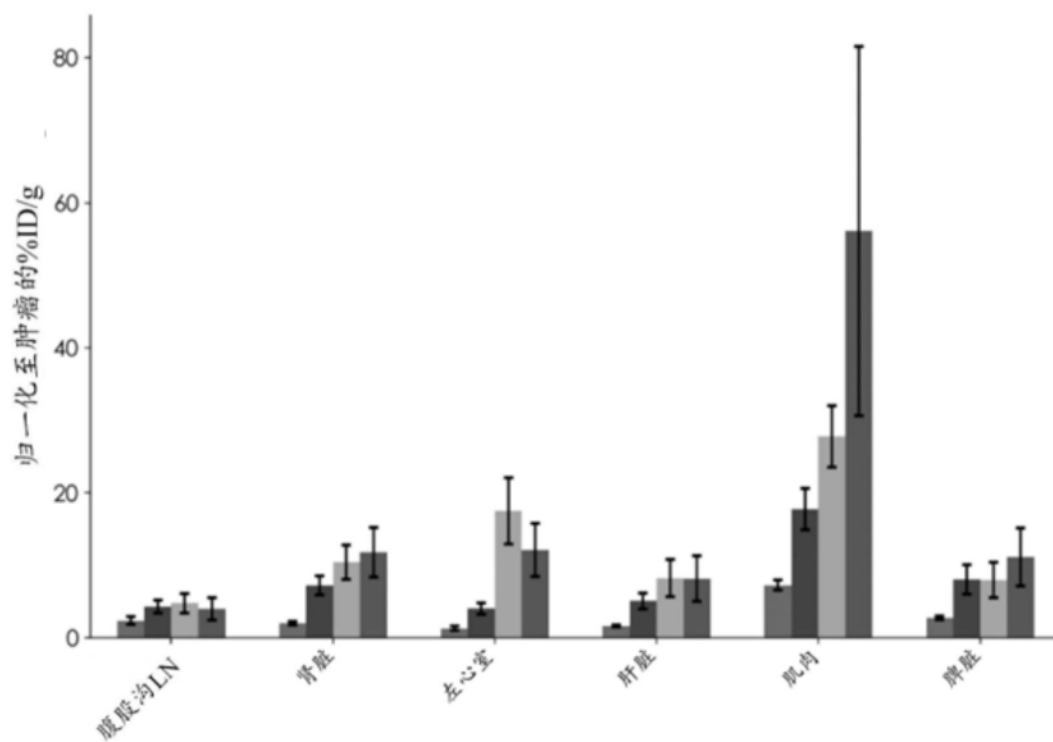


图10B

^{111}In -H108-LL 肿瘤：组织比率
从左至右，条柱表示4、24、72和144小时

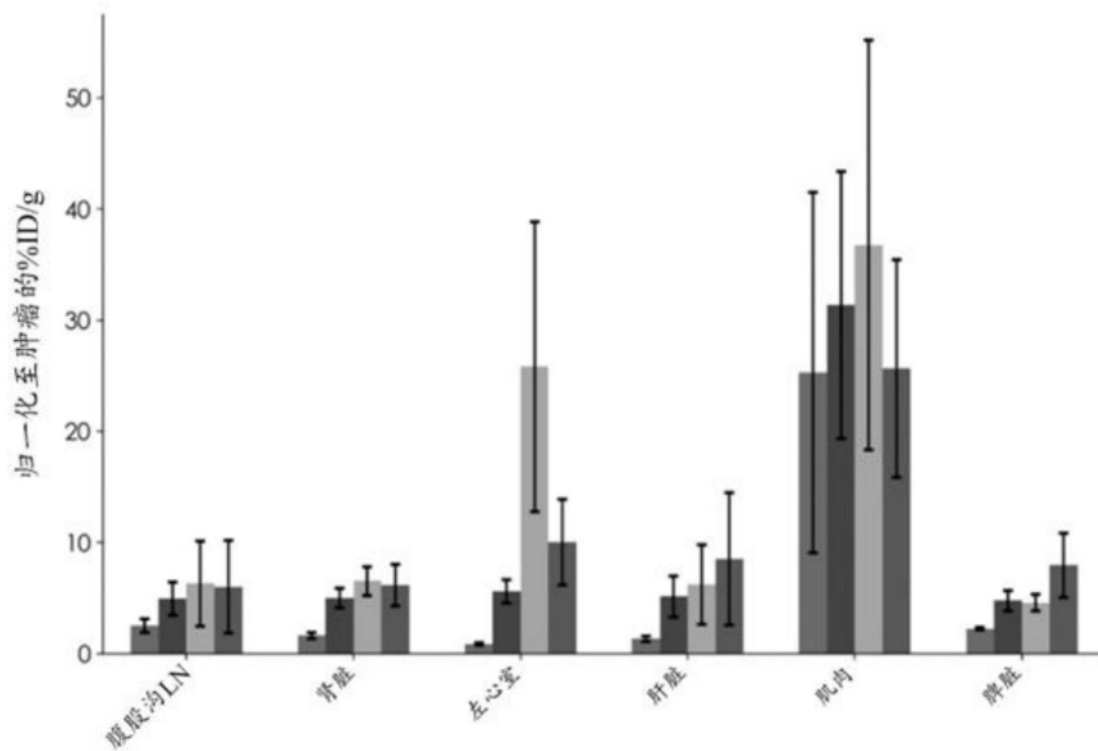


图10C

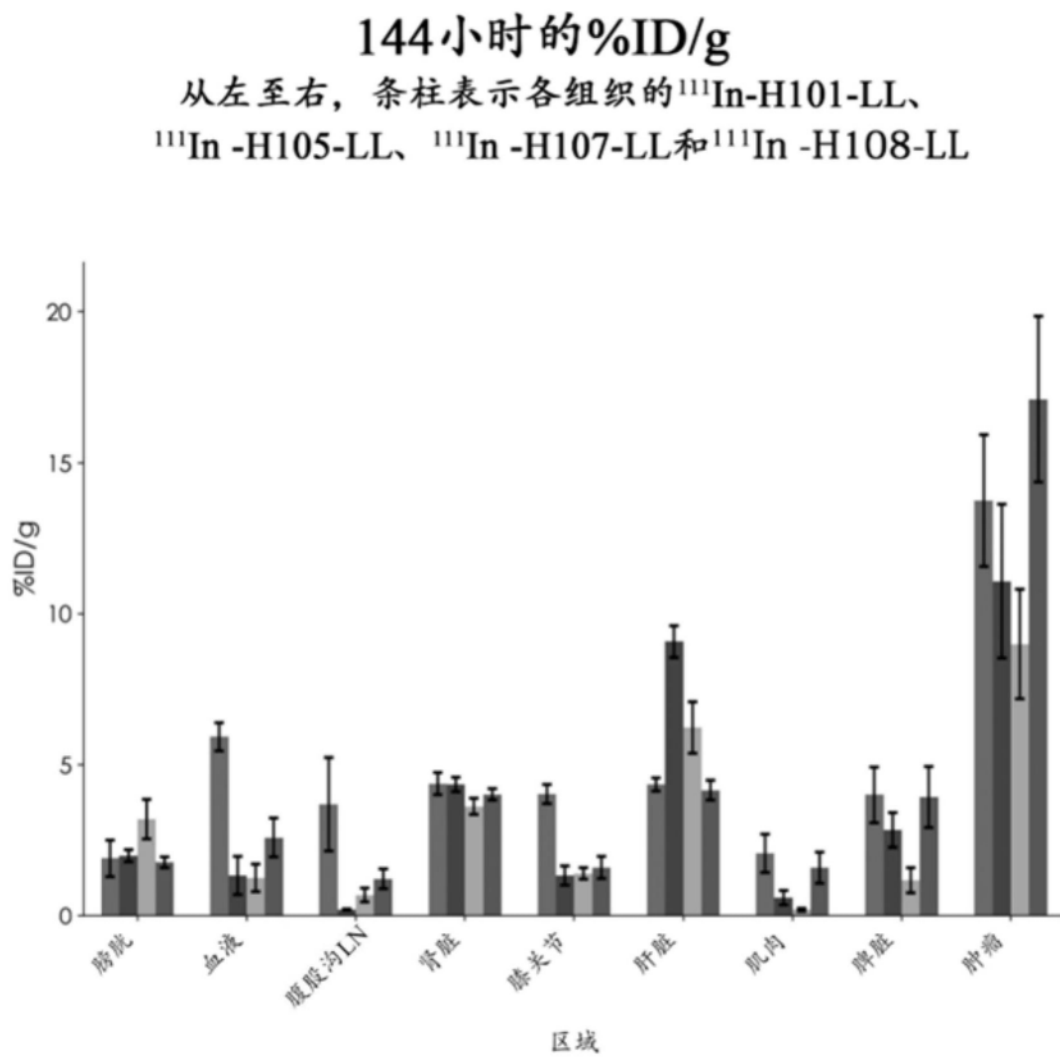


图11

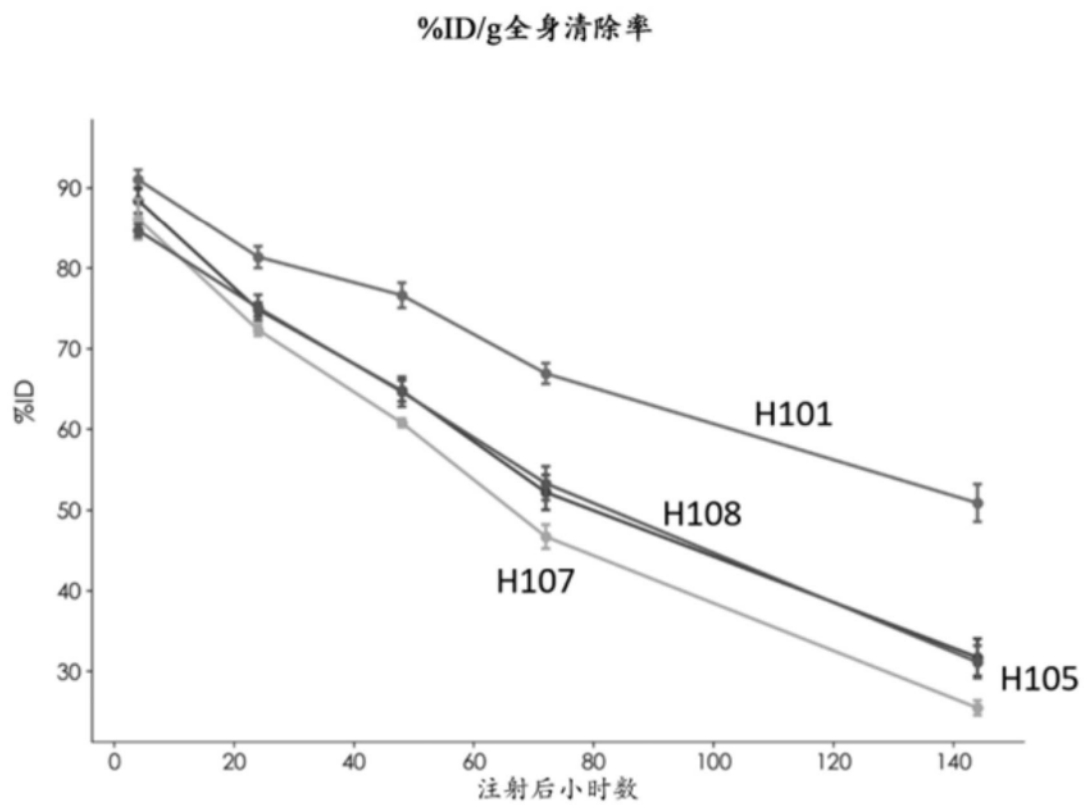


图12

^{111}In -D102-LL肿瘤：组织比率

从左至右，条柱表示4、24、72和144小时

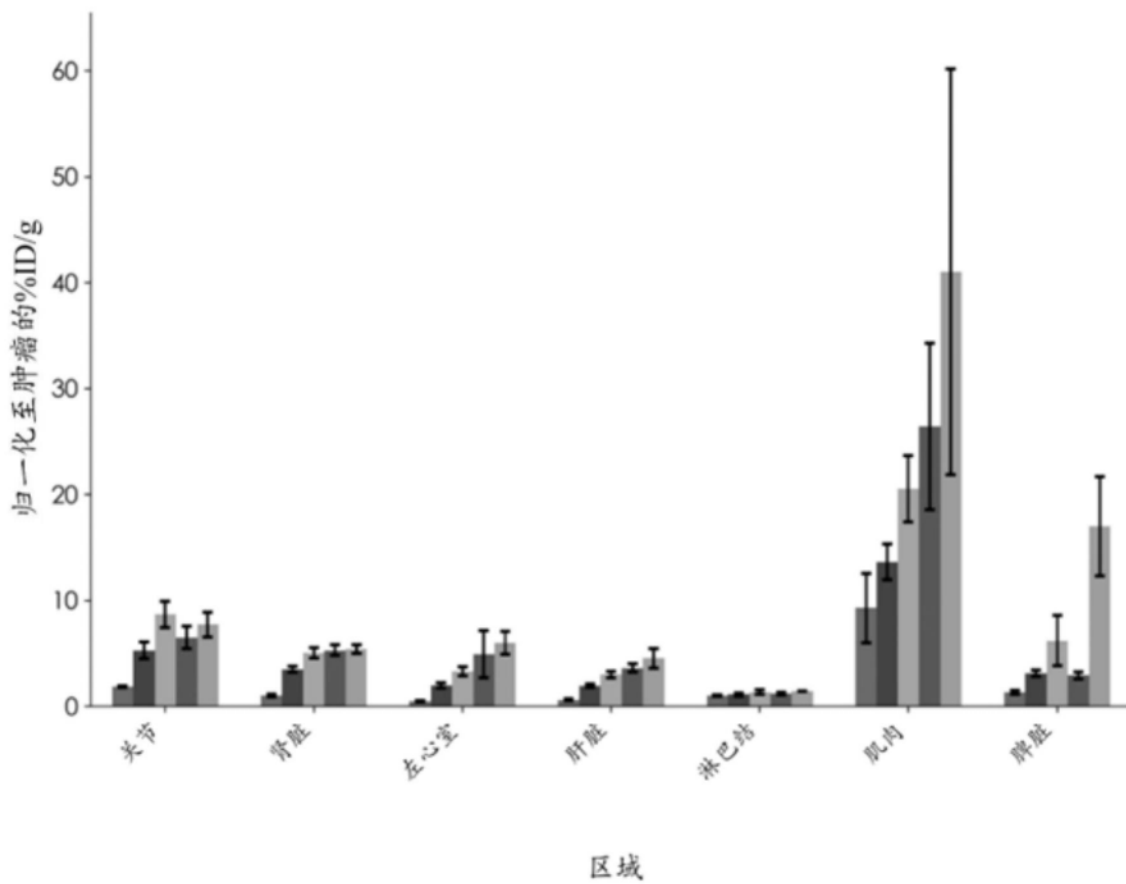


图13

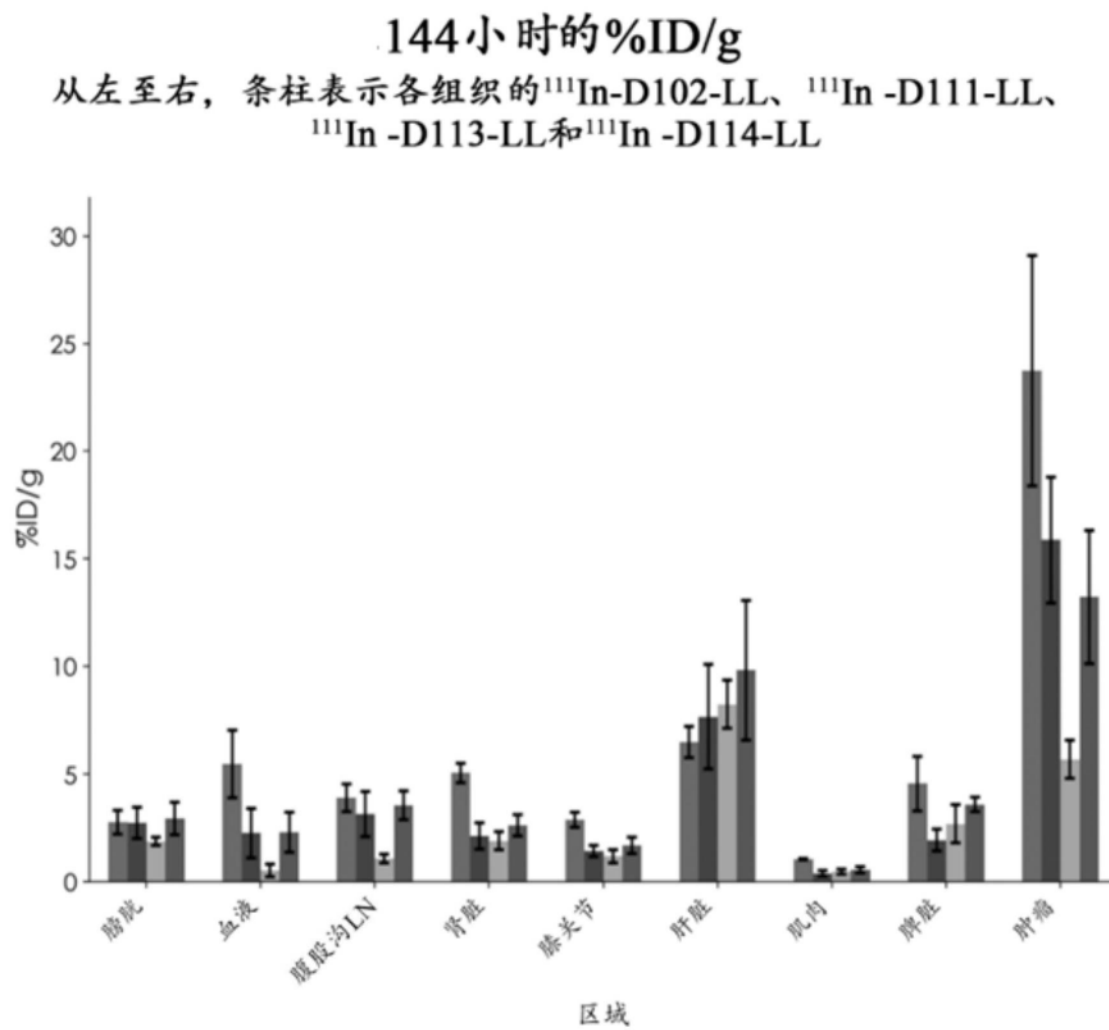


图14

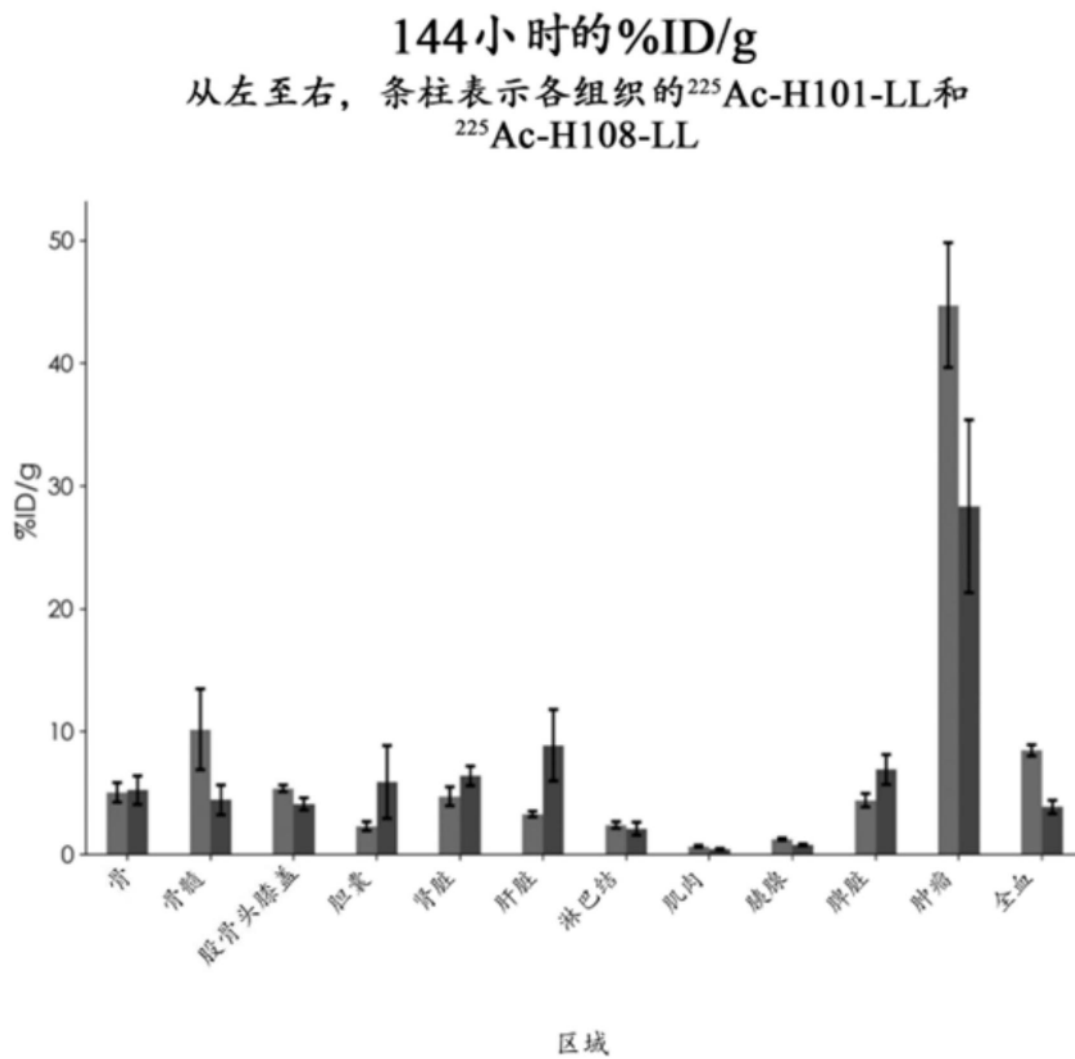


图15A

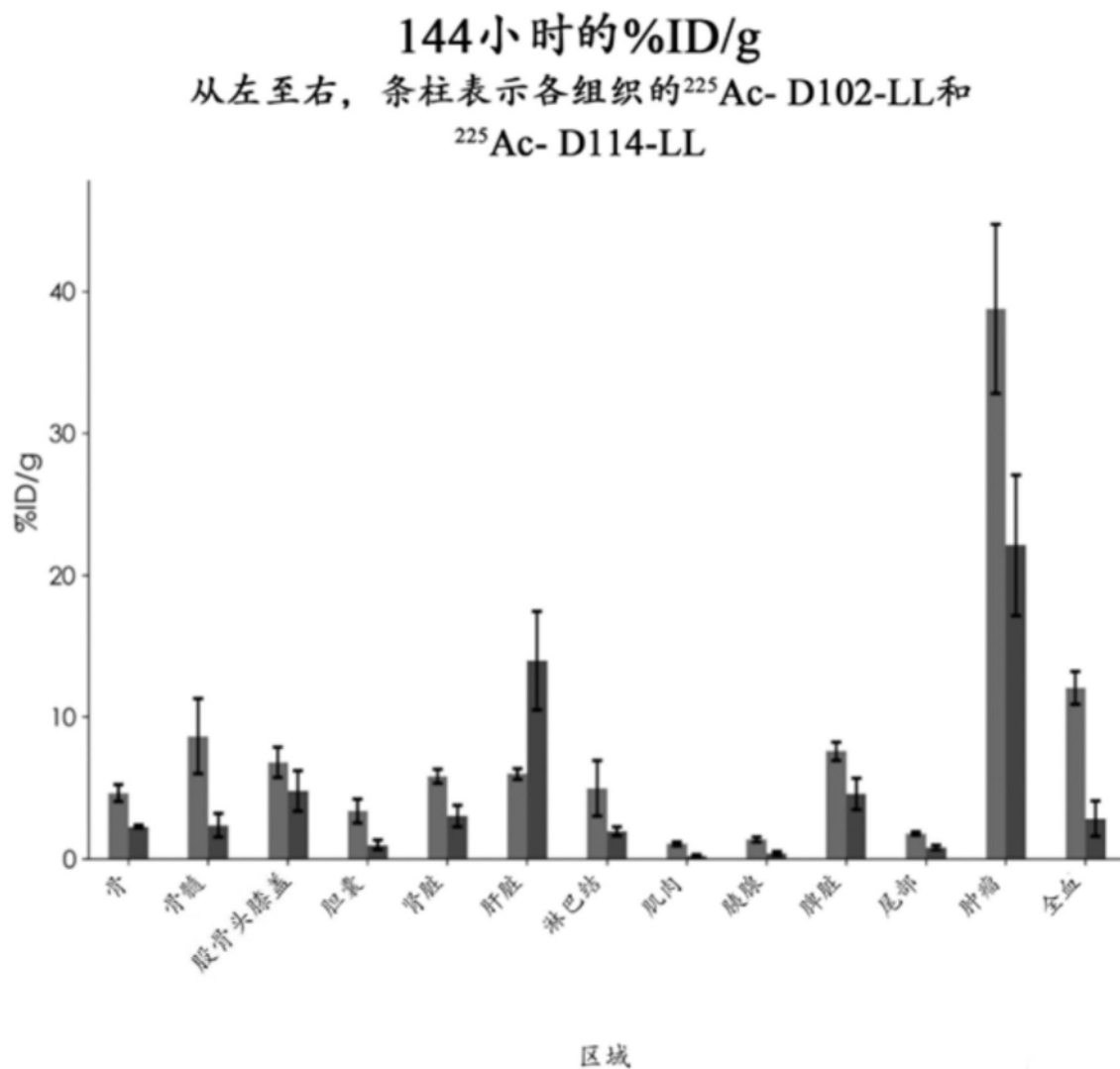


图15B

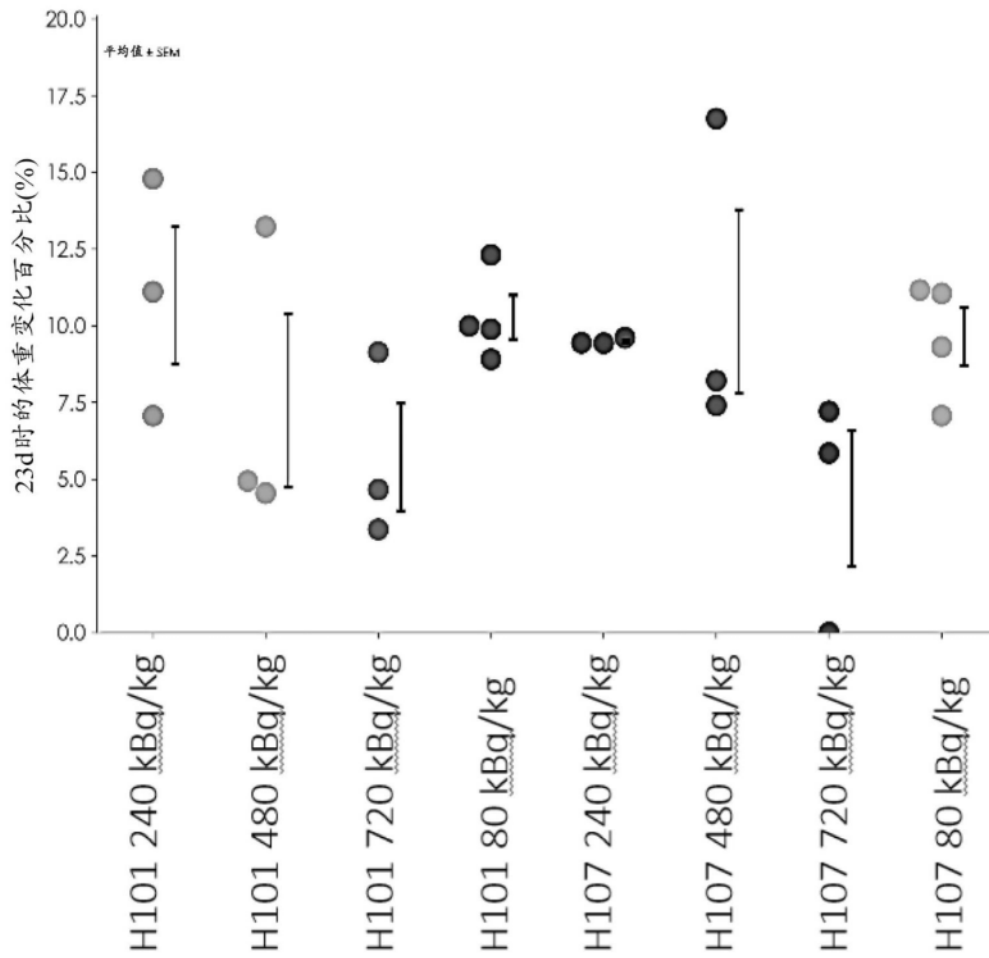


图16A

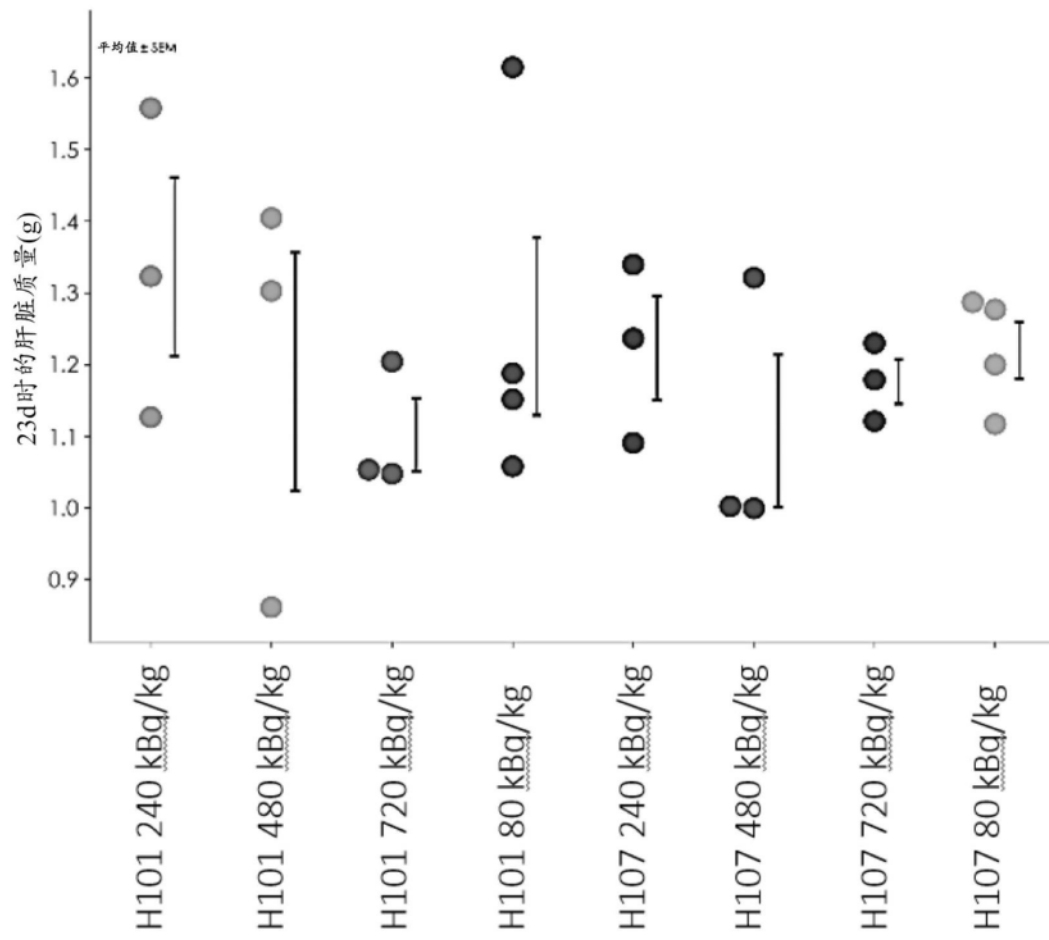


图16B

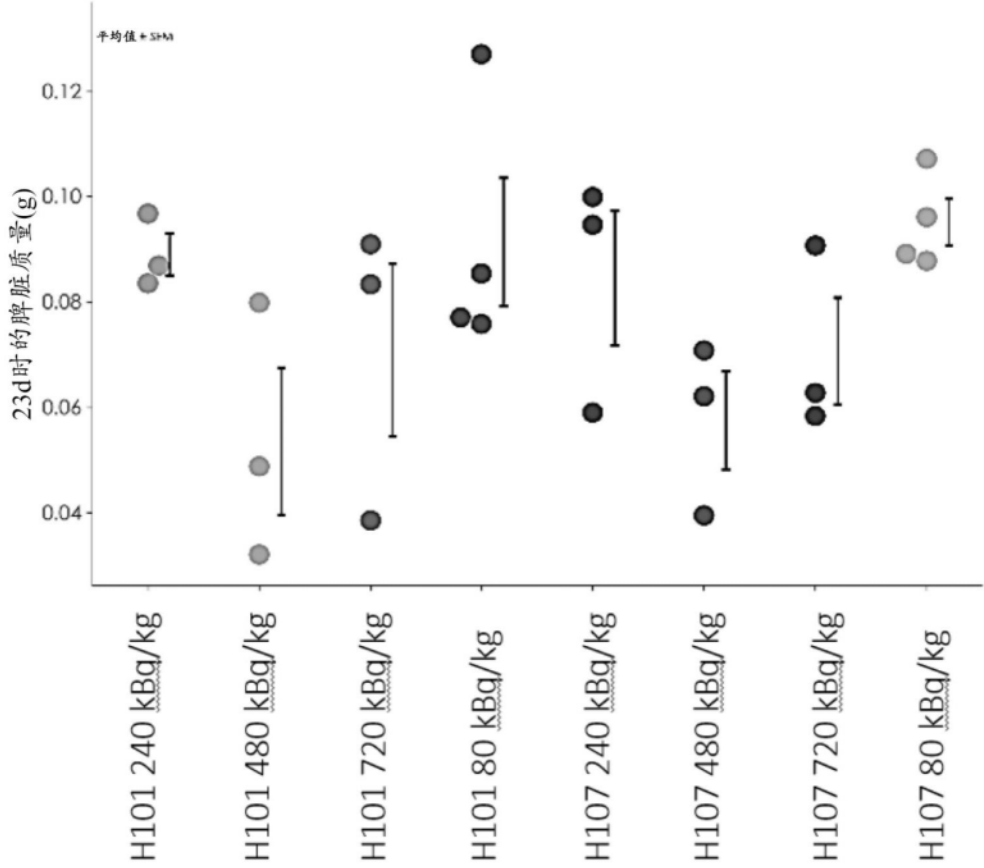


图16C

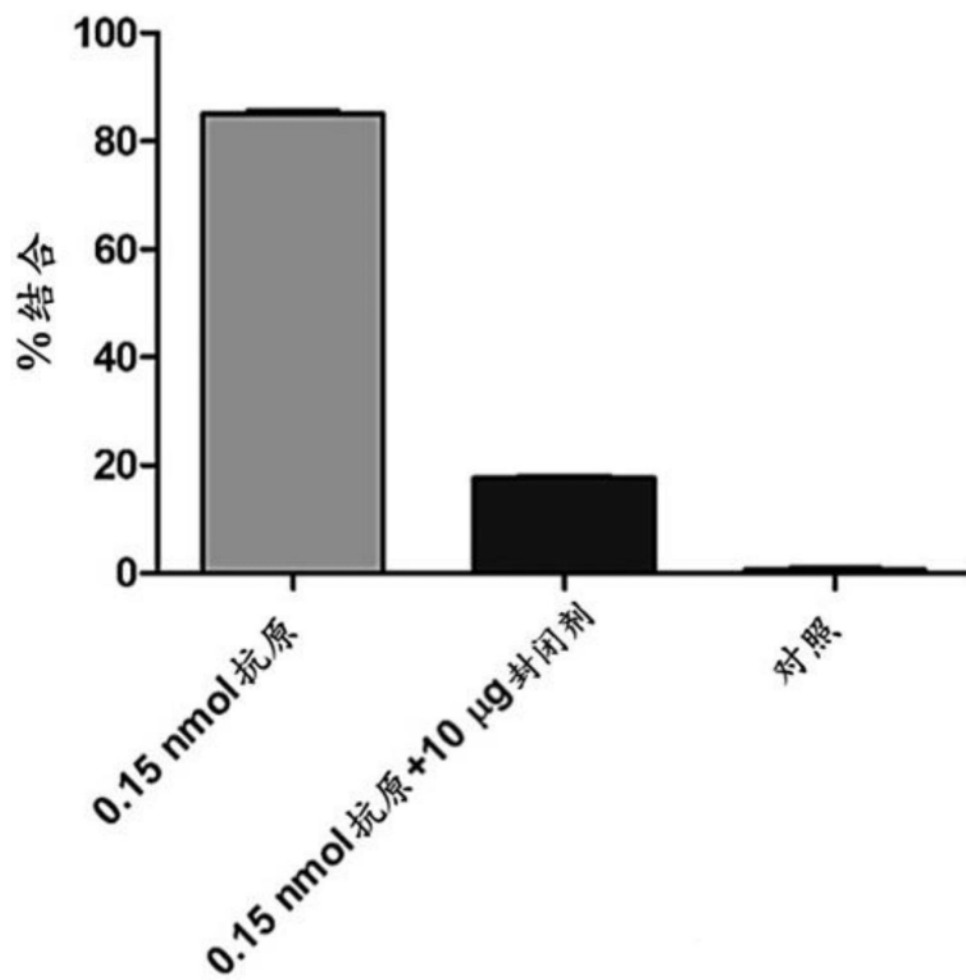


图17

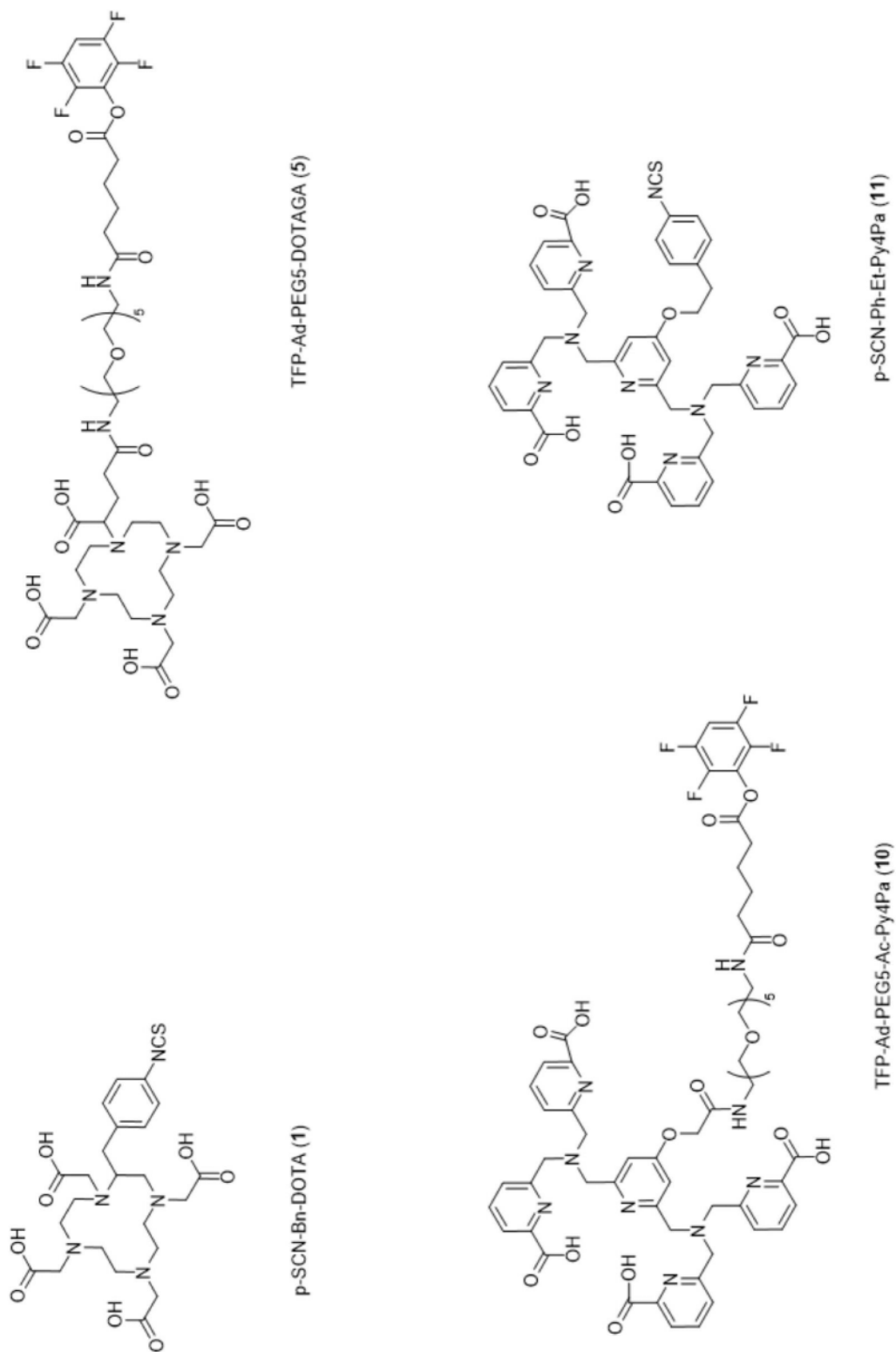


图18

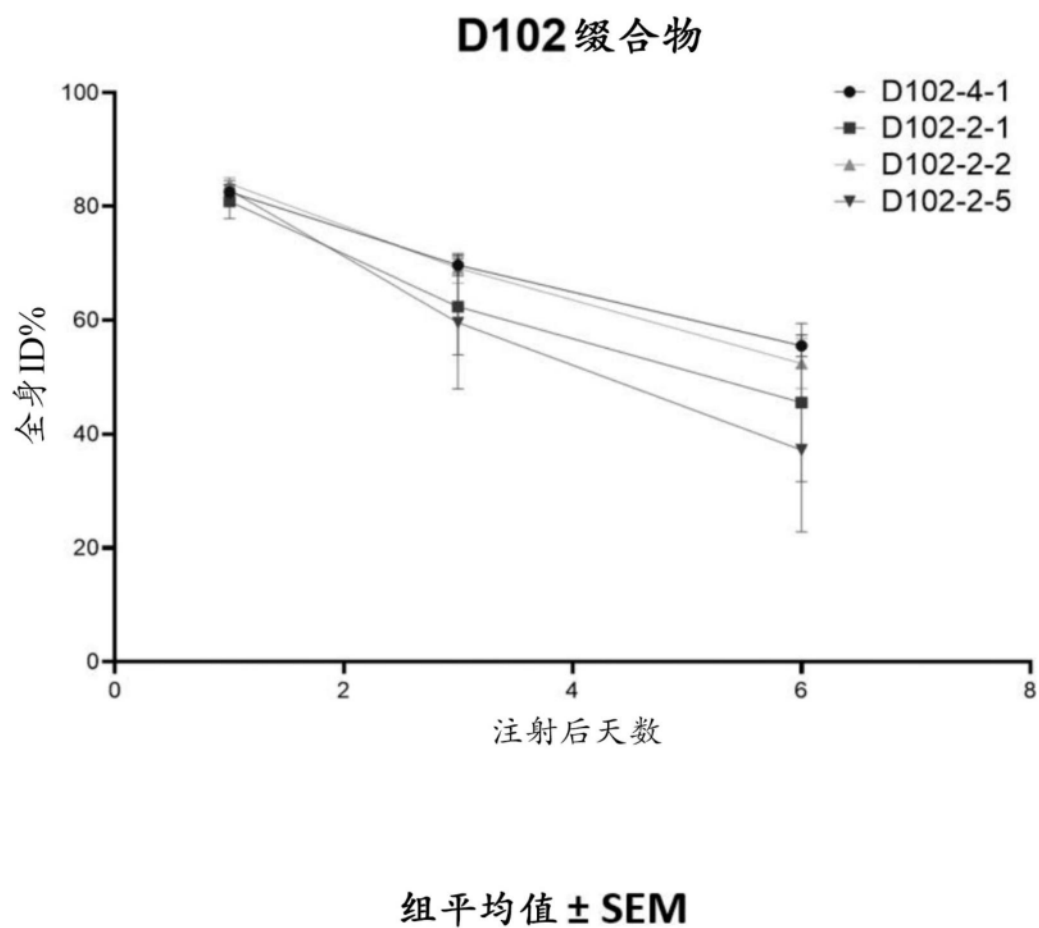
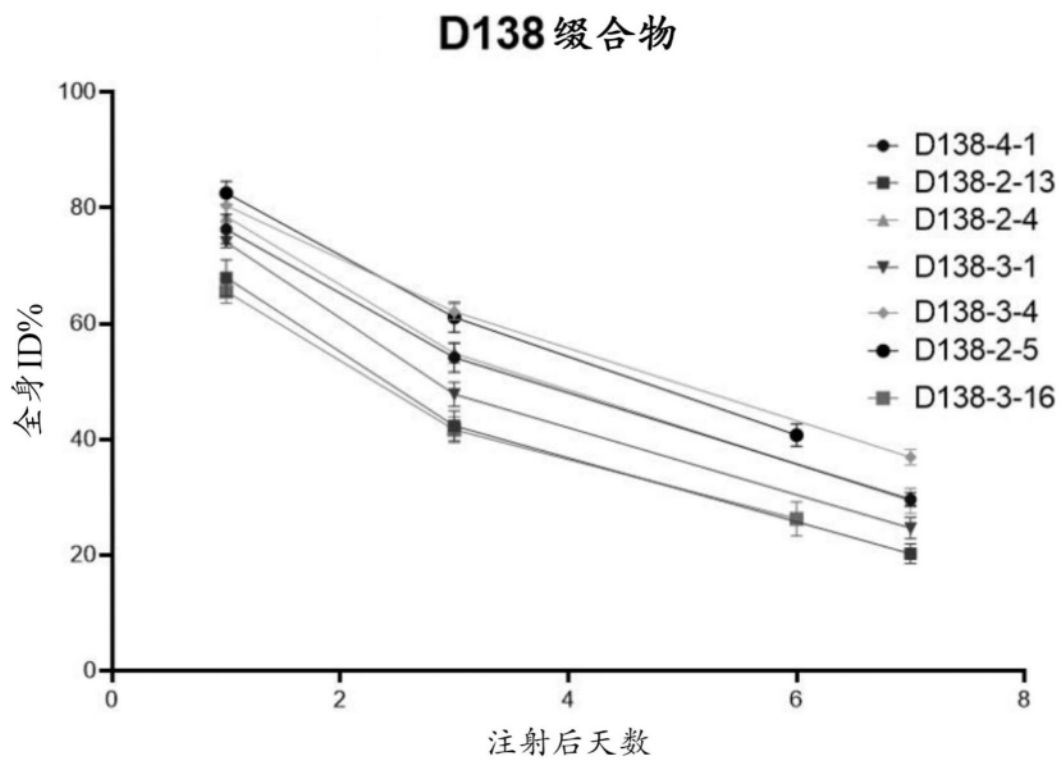


图19A



组平均值 $\pm$ SEM

图19B