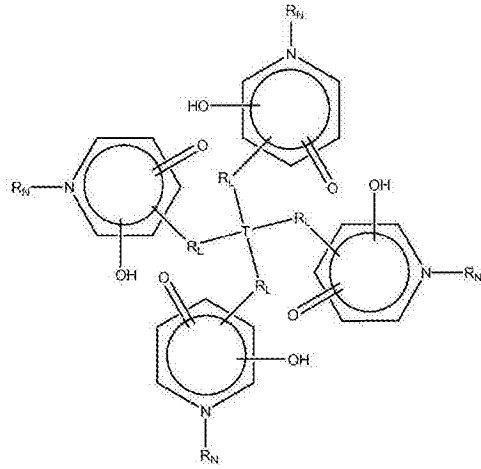
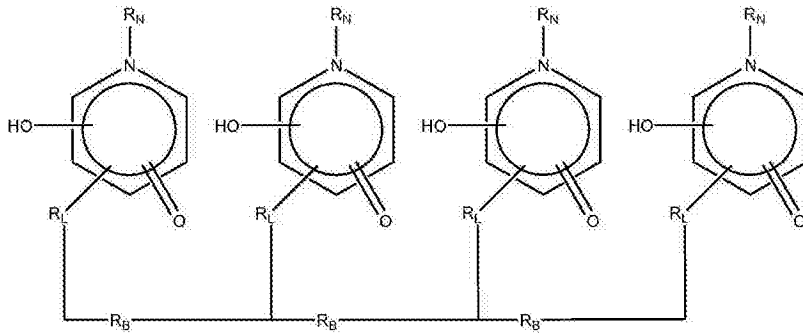




1. 组织-靶向的络合物,其包含
  - 组织-靶向部分,其中所述组织-靶向部分为抗体;
  - 式III或IV的含有羟基吡啶酮的八齿合配体



III

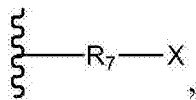


IV

其中R<sub>N</sub>是取代或未取代的C1至C8烷基,

其中R<sub>L</sub>是选自C1至C8烷基的连接基部分,其单独通过碳-碳键或通过任何适当强度的选自胺、酰胺、酯、醚、硫醚或二硫键的官能团连接,R<sub>B</sub>是选自任意地在一端或两端具有杂原子或官能部分的C1至C8烷基链的主链部分,和T是将4个螯合羟基吡啶酮部分彼此相连的选自碳原子、烷基链、脂族或芳族环或稠合的环体系的模板基团;

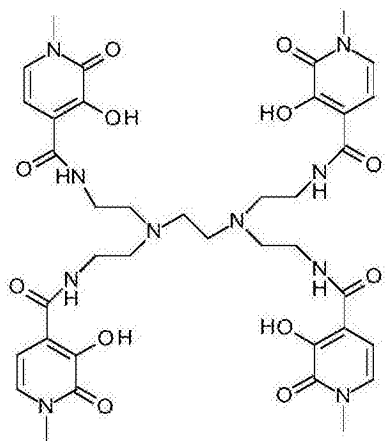
-使含有羟基吡啶酮的八齿合配体与靶向-部分相连的偶联部分,其具有以下结构:



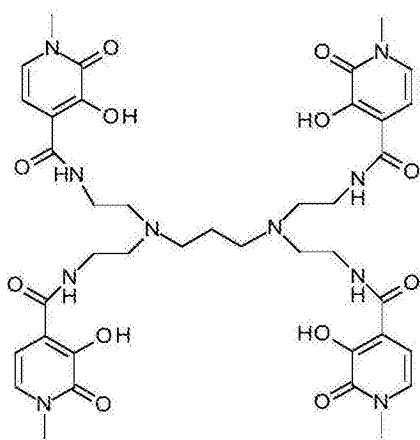
其中R<sub>7</sub>是选自取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基的桥接部分;X是靶向部分或反应性官能团;

-和α-放射性<sup>227</sup>-钷核素的4+离子。

2. 权利要求1中所述的络合物,其中所述含有羟基吡啶酮的八齿合配体选自式VI和VII:



VI



VII.

3. 权利要求1或2所定义的组织-靶向的络合物在制备用于治疗增生或肿瘤疾病的药物中的用途。

4. 权利要求3中所述的用途,其中所述疾病是癌瘤。

5. 权利要求3中所述的用途,其中所述疾病是肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤或混合类型的癌。

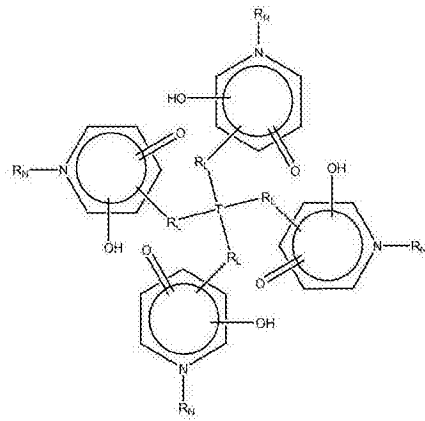
6. 权利要求1或2所定义的至少一种组织-靶向的络合物在制备用于治疗人类或非人类动物身体的增生或肿瘤疾病的药物中的用途。

7. 权利要求6中所述的用途,其中所述增生或肿瘤疾病为癌瘤。

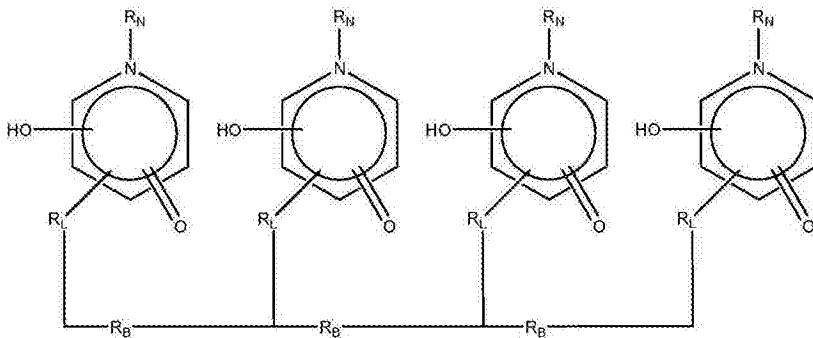
8. 权利要求6中所述的用途,其中所述增生或肿瘤疾病为肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤或混合类型的癌。

9. 药物组合物,其包含权利要求1或2所定义的组织-靶向的络合物,以及至少一种药物载体或赋形剂。

10. 试剂盒,其包括组织-靶向部分,其通过偶联部分与式III或IV的含有羟基吡啶酮的八齿合配体共轭,或者偶联部分与式III或IV的含有羟基吡啶酮的八齿合配体是可共轭的,



III

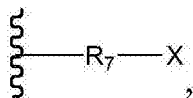


IV

其中RN选自C1至C8烷基,OH,0-烷基,SH和S-烷基,

其中RL是选自C1至C8烷基的连接基部分,其单独通过碳-碳键或通过任何适当强度的选自胺、酰胺、酯、醚、硫醚或二硫键的官能团连接,RB是选自任选地在-端或两端具有杂原子或官能部分的C1至C8烷基链的主链部分,和T是将4个螯合羟基吡啶酮部分彼此相连的选自碳原子、烷基链、脂族或芳族环或稠合的环体系的模板基团;

其中偶联部分具有以下结构:



其中R7是选自取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基的桥接部分;X是靶向部分或反应性官能团;和

包括α-放射性227-钷核素的4+离子,其中所述组织-靶向部分为抗体。

11. 用于治疗增生或肿瘤疾病的权利要求1或2所定义的组织-靶向的络合物。

12. 权利要求11中所述的组织-靶向的络合物,其中所述疾病是癌瘤。

13. 权利要求11中所述的组织-靶向的络合物,其中所述疾病是肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤或混合类型的癌。

## α-放射性络合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及钷同位素的络合物,特别是钷-227与某些八齿配体的络合物。本发明也涉及疾病的治疗,特别是肿瘤疾病的治疗,包括给药这样的络合物。

### 背景技术

[0002] 特异性细胞杀灭可能对于成功治疗哺乳动物受试者中的多种疾病非常关键。这种典型实例发生在治疗恶性疾病例如肉瘤和癌瘤中。但是,选择性消灭某些细胞类型在治疗其它疾病中也起到关键的作用,所述疾病特别是增生或肿瘤疾病。

[0003] 选择性治疗的最常用方法通常是外科手术、化学疗法和外束辐射。但是,靶向的放射性核素治疗是有前途和发展中的领域,其有潜力地可将高细胞毒性的辐射递送到不期望的细胞类型。目前授权用于人类的最常用形式的放射性药物使用β-放射性核素和/或γ-放射性核素。但是,对于在治疗中使用α-放射性核素存在一些兴趣,是由于它们潜在地用于较特异性的细胞杀灭。

[0004] 在生理学环境中典型的α放射体的辐射范围通常小于100微米,相当于仅几个细胞的直径。这使得这些来源非常适用于治疗肿瘤,包括微转移,因为如果它们是适当靶向的,那么极少的辐射能量将穿过靶向细胞。因此,可以最小化对周围健康组织的损伤(参见Feinendegen et al.,*Radiat Res*148:195-201(1997))。相比之下,β粒子在水中的范围为1mm或更多(参见Wilbur,*Antibody Immunocon Radiopharm* 4:85-96(1991))。

[0005] 与由β粒子、γ射线和X-射线携带的相比,α-粒子辐射的能量高,通常为5-8MeV,或为β粒子的5至10倍,和为γ射线的能量的20倍或更多。因此,当这种大量能量沉积于非常短的距离上时,与γ辐射和β辐射相比,给予α-辐射以异常高的线性能量转移(LET),高的相对生物学功效(relative biological efficacy, RBE)和低的氧增强比率(oxygen enhancement ratio, OER)(参见Hall, "Radiobiology for the radiologist", Fifth edition, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia PA, USA, 2000)。这解释了α放射性核素异常的细胞毒性,并且使得对于这种同位素的生物学靶向和α放射性核素分布的控制和研究水平的要求更加严格,这对于避免不可接受的副作用是必要的。

[0006] 以下表1显示目前在文献中广泛提出的可能具有治疗功效的α放射体的物理衰变性质。

[0007] 表1

[0008]

候选核素	T <sub>1/2</sub> *	临床测试用于
<sup>225</sup> Ac	10.0天	白血病
<sup>211</sup> At	7.2小时	成胶质细胞瘤
<sup>213</sup> Bi	46分钟	白血病
<sup>223</sup> Ra	11.4天	骨骼转移(skeletal metastases)
<sup>224</sup> Ra	3.66天	强直性脊椎炎(ankylosing spondylitis)

[0009] \*半衰期

[0010] 到目前为止,关于放射性免疫治疗的应用,主要的注意力集中在 $^{211}\text{At}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 和 $^{225}\text{Ac}$ ,而这三种核素已经在临床免疫疗法试验中研究。

[0011] 已经开发的几种放射性核素是短命的,即其半衰期小于12小时。这样的短半衰期使得难以按商业方式制备和分发基于这些放射性核素的放射性药物。给药短命的核素也会增加在到达靶向位点之前放射进身体的辐射的比例。

[0012]  $\alpha$ -放射的反冲能在很多情况下将导致从母体的衰变位置释放子核素。这种反冲能足以使很多子核从可以保持母体的化学环境中脱离,例如母体通过配体例如螯合剂络合的化学环境。这甚至在当子体与相同配体化学相容(即可通过相同配体络合)时也可以发生。相等地,当子核素是气体,特别是惰性气体例如氦,或者与配体化学不相容时,这种释放效应发生的程度更大。当子核素的半衰期多于几秒时,它们可以广泛扩散进血液系统,不受保持母体的配位剂的限制。这些游离的放射性子体可以引起不期望的全身毒性。

[0013] 在几年前已经提出了在其中控制 $^{223}\text{Ra}$ 子同位素的条件下使用钷-227 ( $T_{1/2}=18.7$ 天)(参见WO 01/60417和WO 02/05859)。这种情形出现在当使用允许子核素由封闭的环境保持的载体系统时。在一种情况下,放射性核素置于脂质体内,脂质体的实质大小(与反冲距离相比)帮助保持子核素在脂质体内。在第二种情况下,使用放射性核素的亲骨型络合物(bone-seeking complexes),其结合进骨基质中并因此限制子核素的释放。这些是潜在在高度有利的方法,但是给药脂质体在一些情况下并不期望,存在很多软组织疾病,其中放射性核素不能由矿化的基质包围使得保持子同位素。

[0014] 最近,已经确定,与从在相当的核上进行的现有测试预期的相比, $^{227}\text{Th}$ 衰变之后释放的 $^{223}\text{Ra}$ 子核的毒性在哺乳动物身体中可耐受的程度大得多。不存在保持以上讨论的钷-227的镭子体的特定方式时,关于镭毒性的公众可知的信息比较清楚地表明,不可以使用钷-227作为治疗试剂,因为从钷-227衰变所达到的治疗效果所需剂量将导致高毒性和可能致命剂量的来自镭子体的衰变的辐射,即不存在治疗窗。

[0015] WO 04/091668描述了预料不到的发现,治疗窗确实存在,其中治疗有效量的靶向的钷-227放射性核素可以给药于受试者(通常为哺乳动物),而不会产生足以引起不可接受的骨髓中毒性的量的镭-223。这因此可以用于在骨位点和软组织位点治疗和预防所有类型的疾病。

[0016] 考虑到以上进展,现在可以在体腔内放射性核素治疗中使用 $\alpha$ -放射性钷-227核,而不会导致源自产生的 $^{223}\text{Ra}$ 的致命骨髓中毒性。但是,治疗窗保持相对较窄,在所有情况下期望除绝对需要之外不再向受试者给药 $\alpha$ -放射性同位素。如果 $\alpha$ -放射性钷-227核能够以高度的可靠性络合和靶向,那么将因此极大地增强这种新治疗窗的有用开发。

[0017] 因为放射性核素持续衰变,在向受试者分离和给药之间处理材料所需的时间非常重要。如果 $\alpha$ -放射性钷核素能够以快速和方便制备的形式络合、靶向和/或给药,优选为仅需要极少步骤制备、短培养周期和/或不可逆地影响靶向实体性质的温度,那么也具有相当高的价值。

[0018] 本发明人现在已经出乎意料地确定,使用通过连接于靶向部分的八齿羟基吡啶酮(HOPO)-类型配体络合的4+钷-227离子可提供对钷-227离子的显著的控制程度。而且,这样的络合物可以使用本申请描述的方法相对快速和/或容易地制备。

## 发明内容

[0019] 一方面,本发明因此提供包含组织-靶向部分、含有羟基吡啶酮的八齿配体和 $\alpha$ -放射性钍核素的离子的组织-靶向的络合物。特别优选的方面是包含多肽组织-靶向部分的这种组织-靶向的络合物,所述多肽组织-靶向部分共价键接于包含至少一个3,2-羟基吡啶酮部分的八齿配体,所述配体络合于 $4+$ 离子和 $\alpha$ -放射性钍核素例如 $^{227}\text{Th}$ 。

[0020] 另一方面,本发明提供包含组织-靶向部分、含有羟基吡啶酮的八齿配体和 $\alpha$ -放射性钍核素的离子的组织-靶向的络合物(包括本申请描述的任何这种络合物)在制造用于治疗增生或肿瘤疾病的药物的用途,所述疾病包括本申请描述的任何这样的疾病。

[0021] 在相应方面,本发明提供治疗人类或非人类动物(特别是有此需要的那些)的方法,其包括给药至少一种组织-靶向的络合物(包括本申请描述的任何这样的络合物),该络合物包含组织-靶向部分,含有羟基吡啶酮的八齿配体和 $\alpha$ -放射性钍核素的离子。这样的方法优选地用于治疗增生或肿瘤疾病,包括本申请描述的任何这样的疾病。

[0022] 再在其它方面,本发明提供药物组合物,其包含组织-靶向的络合物(包括本申请描述的任何这样的络合物)以及至少一种药物载体或赋形剂,所述组织-靶向的络合物包含组织-靶向部分、含有羟基吡啶酮的八齿配体和 $\alpha$ -放射性钍核素的离子。

[0023] 为与天然存在丰度最高的钍同位素,即钍-232(半衰期 $10^{10}$ 年并且有效地为非放射性的)的钍络合物区别,应该理解的是,本申请要求保护的钍络合物及其组合物包含以大于天然相对丰度例如大至少20%的丰度存在的 $\alpha$ -放射性钍放射性同位素(即半衰期小于 $10^3$ 年的钍的至少一种同位素,例如钍-227)。这不需要影响本发明方法的定义,其中治疗有效量的放射性钍,例如钍-227是明确需要的,但是在所有方面为优选的情况。

[0024] 再在其它方面,本发明也提供用于根据本发明方法的试剂盒,所述试剂盒包含组织-靶向部分,其与或可与含有羟基吡啶酮的八齿配体缀合。所有的结合部分和配体优选为本申请描述的那些。这样的试剂盒将任选地和优选地包含 $\alpha$ -放射性钍核素,例如 $^{227}\text{Th}$ 。

[0025] 发明详述

[0026] 在本发明的上下文中,本申请使用的“组织-靶向”表示所讨论的物质(特别是当呈现与钍络合物缀合的形式时)用于使其本身优选地定位(特别是使任何缀合的钍络合物定位)于至少一个需要其存在的组织位点(例如用于递送放射性衰变)。靶向-部分可以,例如,结合于细胞表面标记物(例如受体,运输蛋白,细胞粘着分子等),这些标记物存在于受疾病影响的细胞上或邻近于受疾病影响的细胞的细胞上。这样的细胞表面标记物包含在患病细胞表面上比在健康细胞表面上更强烈表达的蛋白质,或者在处于生长或复制周期的细胞表面上比在处于休眠期的细胞表面上更强烈表达的蛋白质。靶向细胞或组织附近存在或与其有关的组分也可以在根据本发明的任何方面的治疗靶点处使用。例如,存在于或释放进靶向细胞或组织周围基质中的组分可以用于靶向,如果其存在、形式或浓度允许该区域与健康组织区分。这样的组分的实例是基质抗原例如生腱蛋白,这与脑肿瘤有关但是在细胞间的基质中表达。这样的基质抗原可以由本申请讨论的单个或复合靶向-部分来靶向。

[0027] 组织-靶向部分也可以包括两种或更多种共同具有使钍络合物靶向至所需组织的效应的组分。这可以是,例如,其中一种组分首先给药并结合于特定组织、肿瘤或细胞-类型(组织-结合剂),同时给药(优选为随后给药)体内结合于组织-结合剂的第二和/或其它组

分(连接剂(linking agent))。连接剂将直接或间接缀合于络合的 $\alpha$ -放射性钍,因此组织-结合剂和连接剂将共同形成组织-靶向部分。适用于提供具有相互亲和力的组织-结合剂和连接剂的适宜的特异性结合对是本领域熟知的(例如具有抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的生物素)。

[0028] 如本申请描述的本发明的各方面涉及疾病的治疗,特别是针对患病组织的选择性靶向,以及涉及用于这些方法的络合物、缀合物、药物、制剂、试剂盒等。在所有方面,患病组织可以停留在身体中的单个位点(例如在定位的实体肿瘤的情况下)或可以停留在多个位点(例如其中在关节炎中几个关节受影响,或在分散性或转移性癌症的情况下)。

[0029] 有待靶向的患病组织可以是在软组织位点,在钙化的组织位点或多个位点,所述多个位点可以全部在软组织中、全部在钙化组织中或可以包括至少一个软组织位点和/或至少一个钙化的组织位点。在一种实施方式中,至少一个软组织位点被靶向。靶向的位点和疾病起源的位点可以相同,但是或者可以不同。当涉及多于一个位点时,这可以包括起源位点或可以是多个二级位点。

[0030] 本申请使用的术语“软组织”表示不具有“硬的”矿化基质的组织。特别地,如本申请使用的软组织可以为不是骨组织的任何组织。相应地,如本申请使用,“软组织疾病”表示发生在如本申请使用的“软组织”中的疾病。本发明特别适用于癌症的治疗,“软组织疾病”因此包括出现在任何“软”(即非矿化)组织中的肿瘤、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤或混合类型的癌,以及这些组织的其它非癌疾病。癌的“软组织疾病”包括出现在软组织中的实体肿瘤以及转移和微转移的肿瘤。实际上,软组织疾病可以包括软组织的主要实体肿瘤和在相同病人中的软组织至少一种转移肿瘤。或者,“软组织疾病”可以仅由实体肿瘤组成或仅由其中主要肿瘤是骨疾病的转移组成。

[0031] 最近的关键发现是,某些 $\alpha$ -放射性钍同位素(例如 $^{227}\text{Th}$ )可以按既是治疗有效的也不产生无法忍受的骨髓中毒性的量给药。如本申请使用,术语“可接受的非骨髓中毒性的”用于表示,最重要地,由给药的钍-227放射性同位素的衰变产生的镭-223的量通常不足以直接对受试者致命。但是,技术人员应明白,将为这种治疗的可接受副作用的骨髓损伤的量(和致命反应的可能性)将根据以下显著变化:待治疗疾病的类型,治疗方案的目的,和受试者的预后。尽管本发明优选的受试者是人,但是其它哺乳动物、特别是狗将受益于本发明的使用,可接受骨髓损伤的水平也可以反映受试者的类别。可接受骨髓损伤的水平在恶性疾病中通常比在非恶性疾病中大。骨髓中毒性的水平的一种熟知量度是中性粒细胞计数,在本发明中, $^{223}\text{Ra}$ 的可接受的非骨髓中毒性量通常将为受控量,使得在其最低点(最底点)的中性粒细胞分率不少于治疗前计数的10%。优选地, $^{223}\text{Ra}$ 的可接受的非骨髓中毒性量将为使得最底点中性粒细胞分率为至少20%,更优选为至少30%的量。最优选的是,最底点中性粒细胞分率为至少40%。

[0032] 而且,包含放射性钍(例如 $^{227}\text{Th}$ )的化合物可以用于高剂量治疗方案,其中产生的镭(例如 $^{223}\text{Ra}$ )的骨髓中毒性通常是无法忍受的,当包括干细胞支持或相当的痊愈方法时。在这样的情况下,中性粒细胞计数可以减少至低于10%的最底点,特别是减少至5%,或者如果需要则低于5%,条件是采取适当的预防措施并给出之后的干细胞支持。这样的技术是本领域熟知的。

[0033] 本发明特别感兴趣的钍同位素是钍-227,在本申请所有提及钍之处,钍-227是优

选的。钷-227相对容易制备并且可以间接由中子照射的<sup>226</sup>Ra制备,其将包含母体核素<sup>227</sup>Th,即<sup>227</sup>Ac (T<sub>1/2</sub>=22年)。镭-227可以相当容易地与<sup>226</sup>Ra靶点分离并且用作<sup>227</sup>Th的发生剂。如果需要,该方法可以放大到工业规模,因此可以避免使用大多数其它α-放射体(被认为是分子靶向的放射疗法的候选者)可见的供应问题。

[0034] 钷-227经镭-223衰变。在该情况下,主要子体的半衰期为11.4天。从纯的<sup>227</sup>Th源,在最初几天中仅产生适当量的镭。但是,<sup>223</sup>Ra的潜在毒性高于<sup>227</sup>Th的潜在毒性,因为在从<sup>223</sup>Ra释放α粒子几分钟后,从短命子体释放三个其它α粒子(参见以下表2,其陈述了钷-227的衰变系列)。

[0035] 表2

[0036]

核素	衰变模式	中值粒子能量 (MeV)	半衰期
<sup>227</sup> Th	α	6.02	18.72天
<sup>223</sup> Ra	α	5.78	11.43天
<sup>219</sup> Rn	α	6.88	3.96秒
<sup>215</sup> Po	α	7.53	1.78毫秒
<sup>211</sup> Pb	β	0.45	36.1分钟
<sup>211</sup> Bi	α	6.67	2.17分钟
<sup>207</sup> Tl	β	1.42	4.77分钟
<sup>207</sup> Pb			稳定的

[0037] 部分因为其产生潜在有害的衰变产物,钷-227 (T<sub>1/2</sub>=18.7天)并未广泛地被考虑用于α粒子治疗。

[0038] 钷-227可以以足以提供所需治疗效果而又不会产生如此多的镭-223以致于引起无法忍受的骨髓抑制的量给药。期望在靶向区域保持子同位素,由此进一步的治疗效果可以源自它们的衰变。但是,为了具有有用的治疗效果而不会诱导不可接受的骨髓中毒性而保持控制钷衰变产物,这不是必要的。

[0039] 假设肿瘤细胞杀灭效应将主要来自钷-227而不是来自其子体,该同位素的可能治疗剂量可以通过与其它α发射体比较而确定。例如,对于碲-211,动物中的治疗剂量已经通常为2-10MBq/kg。通过纠正半衰期和能量,钷-227的相应剂量将为至少36-200kBq/kg体重。这可对<sup>227</sup>Th的量设定下限,该<sup>227</sup>Th的量在期望治疗效果中可有用地给药。该计算假设了碲和钷相当的保持力。但是明显地,钷的18.7天半衰期将最可能导致该同位素在其衰变之前的较大消除。该计算的剂量因此通常应该被认为是最小有效量。由术语“完全保留的<sup>227</sup>Th”(即未从身体消除的<sup>227</sup>Th)表示的治疗剂量通常为至少18或25kBq/kg,优选为至少36kBq/kg,更优选为至少75kBq/kg,例如100kBq/kg或更多。预期较大量的钷将具有较大的治疗效果,但是如果结果是出现无法忍受的副作用则无法给药。同样,如果钷以具有短的生物学半衰期(即在体内消除之前仍携带钷的半衰期)的形式给药,那么较大量的放射性同位素对于治疗效果是必需的,因为大量钷将在其衰变之前消除。但是,产生的镭-223的量将相应降低。当同位素完全保留时,待给药的钷-227的以上量可容易与具有较短的生物学半衰期的等同剂量相关。这样的计算是本领域熟知的并且在WO 04/091668(例如在实施例1和2中的内容中)中给出。

[0040] 如果放射标记的化合物释放子核素,那么重要的是知道任何放射性子核素(如果可适用)的命运。使用 $^{227}\text{Th}$ 时,主要的子体产物是 $^{223}\text{Ra}$ ,其由于它的骨亲和性(bone seeking)性质而处于临床评价中。镭-223非常快速地清扫血液并且在骨骼中富集或经肠道和肾途径排泄(参见Larsen, *J Nucl Med* 43 (5, Supplement):160P (2002))。体内从 $^{227}\text{Th}$ 释放的镭-223因此可以影响健康软组织的程度不大。在Müller在*Int. J. Radiat. Biol.* 20: 233-243 (1971)对 $^{227}\text{Th}$ 作为溶解的柠檬酸盐的分布的研究中,已经发现从软组织中的 $^{227}\text{Th}$ 产生的 $^{223}\text{Ra}$ 容易重新分配至骨或者排泄。 $\alpha$ -放射性镭的已知毒性,特别是对于骨髓的毒性,因此是与钍剂量有关的问题。

[0041] 在WO 04/091668中首次确定的是,事实上,至少200kBq/kg的 $^{223}\text{Ra}$ 的剂量可以给药并且在人类受试者中可以忍受。这些数据是上述公开文献中展示的。因此,现在可以非常出乎意料地看到,治疗窗确实存在,其中治疗有效量的 $^{227}\text{Th}$ (例如大于36kBq/kg)可以给药于哺乳动物受试者而不会预料这样的受试者将遭受不可接受的严重危险或甚至是致命的骨髓中毒性。但是,极其重要的是该治疗窗的最好用途,因此关键的是放射性钍可快速和有效地络合,并以非常高的亲和力保持,由此以最大可能比例的剂量递送给靶向位点。

[0042] 从 $^{227}\text{Th}$ 药物产生的 $^{223}\text{Ra}$ 的量将取决于放射标记化合物的生物学半衰期。理想情形是使用具有快速肿瘤吸收的络合物,包括内在化进入肿瘤细胞,在正常组织中强肿瘤保持力和短生物学半衰期。但是可以使用具有小于理想生物学半衰期的络合物,只要 $^{223}\text{Ra}$ 的剂量保持在可忍受的水平内。体内产生的镭-223的量是钍的给药量和钍络合物的生物学保留时间的因素。在任何特定情况下产生的镭-223的量可以由本领域普通技术人员容易地计算。 $^{227}\text{Th}$ 的最大可给药量将由镭的体内产生量确定并且必须小于将会产生无法忍受水平的副作用(特别是骨髓中毒性)的量。该量通常小于300kBq/kg,特别是小于200kBq/kg,更优选为小于170kBq/kg(如小于130kBq/kg)。最小有效剂量将由以下因素确定:钍的细胞毒性,患病组织对产生的 $\alpha$ 辐射的易感性以及钍通过靶向络合物有效地组合、保留和递送的程度(在该情况下是配体和靶向一部分的组合)。

[0043] 在本发明的方法中,钍络合物的给药量期望地为,钍-227剂量为18至400kBq/kg体重,优选为36至200kBq/kg,(例如50至200kBq/kg),更优选为75至170kBq/kg,特别为100至130kBq/kg。相应地,单一剂量直至可以包含约这些范围的任一种乘以适当的体重,例如30至150Kg,优选为40至100Kg(例如540kBq/剂至4000kBq/剂的范围等)。而且,钍剂量、络合剂和给药途径将期望地为,使得体内产生的镭-223剂量小于300kBq/kg,更优选为小于200kBq/kg,再更优选为小于150kBq/kg,特别是小于100kBq/kg。同样,这将提供对 $^{223}\text{Ra}$ 的暴露,其通过使这些范围乘以指出的任何体重而指示。上述剂量水平优选为 $^{227}\text{Th}$ 的完全保留剂量,但是可以是考虑到一些 $^{227}\text{Th}$ 在其衰变之前将从身体清除的给药物量。

[0044] 当 $^{227}\text{Th}$ 络合物的生物学半衰期比物理半衰期短(例如少于7天,特别是少于3天)时,可能需要显著较大给药物量以提供同等的保持剂量。因此,例如,150kBq/kg的完全保留剂量等同于以711kBq/kg的剂量给药的具有5天半衰期的络合物。任何适当保留剂量的等价给药物量可以使用本领域熟知的方法从络合物的生物学清除率计算。

[0045] 由于一个 $^{227}\text{Th}$ 核的衰变提供一个 $^{223}\text{Ra}$ 原子, $^{227}\text{Th}$ 的保留和治疗活性将直接关系到病人承受的 $^{223}\text{Ra}$ 剂量。在任何特定环境下产生的 $^{223}\text{Ra}$ 的量可以使用熟知方法计算。

[0046] 在优选的实施方式中,本发明因此提供治疗哺乳动物受试者(如本申请描述)中疾

病的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的缀合物,该缀合物包含组织-靶向部分、八齿配体(特别是本申请描述的任一者)和放射性钍同位素(例如钍-227)。

[0047] 显然期望<sup>223</sup>Ra子同位素最少地暴露于受试者,除非该子同位素的性质是非常有用的。特别地,体内产生的镭-223的量通常大于40kBq/kg,例如大于60kBq/Kg。在一些情况下,体内产生的镭<sup>223</sup>Ra必须大于80kBq/kg,例如大于100或115kBq/kg。

[0048] 在适当载体溶液中的钍-227标记的缀合物可以静脉、腔内(例如腹膜内)、皮下、口服或局部给药,作为单次施药或分步的施药方案。优选地,缀合于靶向部分的络合物可通过肠胃外(例如经皮)途径作为溶液给药,特别是静脉给药或通过腔内途径给药。优选地,对于肠胃外给药,本发明的组合物将以灭菌的溶液配制。

[0049] 本发明方法和产品中的钍-227可以单独使用或与其它治疗形态组合使用,所述治疗形态包括外科手术、外束辐射治疗、化学疗法、其它放射性核素、或组织温度调节等。这形成本发明方法的其它优选的实施方式,制剂/药物可以相应地包含至少一种另外的治疗活性剂例如另一种放射性试剂或化疗试剂。

[0050] 在一种特别优选的实施方式中,受试者也经受干细胞治疗和/或其它支持性治疗以降低镭-223诱导的骨髓中毒性的作用。

[0051] 根据本发明,<sup>227</sup>Th可以通过靶向络合剂络合。典型地,靶向部分的分子量为100g/mol至几百万g/mol(特别是100g/mol至1百万g/mol),并且优选地具有对于疾病相关受体的亲和力:或者是直接的结合,和/或将包含适当的预给药结合剂(例如生物素或抗生物素蛋白),其结合于已经靶向于事先给药<sup>227</sup>Th的疾病的分子。适当的靶向部分包括多聚肽或低聚肽,蛋白质,DNA和RNA片段,适体等,优选为蛋白质,例如抗生物素蛋白,链霉抗生物素蛋白,多克隆或单克隆抗体(包括IgG和IgM类型抗体),或蛋白质或片段或蛋白质构建体(constructs)的混合物。抗体,抗体构建体,抗体的片段(例如FAB片段或包含至少一个抗原结合区的任何片段),片段的构建体(例如单链抗体)或其混合物是特别优选的。

[0052] 也适用于本发明的是络合的<sup>227</sup>Th与以下物质的治疗缀合物:肽,氨基酸,类固醇或非类固醇激素,叶酸,雌激素,睾丸激素,生物素,或分子量通常低于10000g/mol的其它特异性结合化合物。

[0053] 通常,八齿配体直接或间接(例如经连接基部分)缀合于靶向-部分。这种类型的通用构建体,即活性的(例如治疗或诊断活性的)金属-络合部分-任选的连接基部分-靶向部分,是靶向的放射性药品和靶向的成像剂领域熟知的。但是,极少或没有工作可用于评价各种配体特异性用于钍4+离子的适宜性。关于这一点,可以参考例如“Handbook of Targeted Delivery of Imaging Agents”,Ed.Torchilin,CRC Press,1995。

[0054] 钍的之前已知的螯合剂包括多氨基多酸螯合剂,其包含具有在主链氮连接的酸性(例如羧基烷基)基团的直链、环状或支链的聚氮杂烷烃主链。这种螯合剂的实例包括DOTA衍生物例如对异硫氰酸基苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(p-SCN-Bz-DOTA)和DTPA衍生物例如对异硫氰酸基苄基-二亚乙基三胺五乙酸(p-SCN-Bz-DTPA),前者为环状螯合剂,后者为直链螯合剂。

[0055] 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸的衍生物之前已经举例,但是标准方法无法容易地用于使钍与DOTA衍生物螯合。加热具有金属的DOTA衍生物有效地提供螯合物,但是通常收率较低。存在这样的趋势,即至少一部分配体在过程中不可逆地变性。而且,

由于其对不可逆变性的相对高的敏感性,通常必须避免靶向-部分的连接,直至所有的加热步骤完成。这增加了额外的化学步骤(伴随全部必需的后处理和分离),这必须在 $\alpha$ -放射性钍同位素的衰变寿命之中进行。显然,以这种方式处理 $\alpha$ -放射性物质或者产生相应废物达到比所需的高的程度并不优选的。而且,制备缀合物花费的所有时间浪费一部分钍,这一部分钍将在该制备期间衰变。

[0056] 优选的是,在本发明的所有方面, $\alpha$ -放射性钍和八齿配体的络合物在不高于 $60^{\circ}\text{C}$ 加热(例如在不高于 $50^{\circ}\text{C}$ 加热)的情况下,优选地在不高于 $38^{\circ}\text{C}$ 加热和最优选地在不高于 $25^{\circ}\text{C}$ 加热的情况下形成,或可在所述情况下形成。

[0057] 另外优选的是,靶向-部分和八齿配体的缀合物在添加 $\alpha$ -放射性钍同位素(例如 $^{227}\text{Th}^{4+}$ 离子)之前制备。本发明的产物因此优选通过或可以通过 $\alpha$ -放射性钍同位素(例如 $^{227}\text{Th}^{4+}$ 离子)与八齿配体和组织-靶向部分的缀合物的络合而形成。

[0058] 螯合剂可以是非膦酸盐分子,在本发明的一种实施方式中, $^{227}\text{Th}$ 将不会连接于任何膦酸盐或其它骨-靶向基团,也不会与这样的物质一起给药。

[0059] 靶向化合物的类型是可以经八齿螯合剂(包含如本申请描述的偶联部分)连接于钍(例如钍-227)。靶向-部分可以选自己知的靶向基团,其包括单克隆或多克隆抗体,生长因子,肽,激素和激素类似物,叶酸和叶酸衍生物,生物素,抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白或其类似物。其它可能的载体可以是RNA,DNA,或其片段,寡聚核苷酸,碳水化合物,脂质或通过蛋白质存在下或不存在下合并这样的基团等制备的化合物。

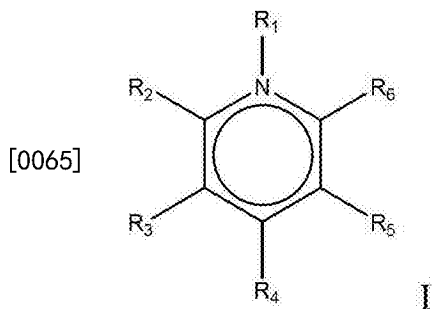
[0060] 在一种实施方式中,组织-靶向部分可以不包括亲骨物质,脂质体和与叶酸缀合的抗体或抗体片段。或者,可以包含这样的部分。

[0061] 本发明的钍(例如钍-227)标记的分子可以通过靶向疾病有关的受体而用于治疗癌症或非癌症疾病。通常, $^{227}\text{Th}$ 的这种医疗用途通过放射性免疫疗法用于治疗癌症或非癌症疾病,该疗法基于通过螯合剂将 $^{227}\text{Th}$ 连接于抗体,抗体片段,或抗体或抗体片段的构建体。 $^{227}\text{Th}$ 在根据本发明的方法和医药品中的用途特别适用于治疗任何形式的癌症,包括癌瘤,肉瘤,淋巴瘤和白血病,特别是肺、胸部、前列腺、膀胱、肾、胃、胰腺、食管、脑、卵巢、子宫的癌症,口腔癌,结肠直肠癌,黑素瘤,多发性骨髓瘤和非霍奇金氏淋巴瘤。

[0062] 如果携带 $^{227}\text{Th}$ 的分子在体内具有短生物学保留半衰期,那么 $^{223}\text{Ra}$ 的释放量可减少,因为放射性核素主要在高比例的 $^{227}\text{Th}$ 已经衰变成 $^{223}\text{Ra}$ 之前消除。但是, $^{227}\text{Th}$ 的量必须增加,以便于保持治疗有效性,根据本发明。如果选择络合剂,以便于将 $^{227}\text{Th}$ 递送到靶向的细胞内部,这将进一步提高特异性细胞毒性并降低放射性子体的全身毒性效应,由于子同位素至少部分保留在肿瘤位点。这些特征都加宽 $^{227}\text{Th}$ 治疗窗并因此形成本发明的优选实施方式。

[0063] 在本发明的其它实施方式中,通过患有软组织和骨骼疾病的病人可以通过 $^{227}\text{Th}$ 和通过由给药的钍体内产生的 $^{223}\text{Ra}$ 两者治疗。在该特别有利的方面,治疗的额外治疗组通过靶向骨骼疾病源自可接受的非-骨髓中毒性量的 $^{223}\text{Ra}$ 。在该治疗方法中, $^{227}\text{Th}$ 通常用于通过适当地靶向其而治疗软组织原发性癌症和/或转移性癌症,且由 $^{227}\text{Th}$ 衰变产生的 $^{223}\text{Ra}$ 用于治疗相同受试者中的有关骨骼疾病。该骨骼疾病可能源于原发性软组织癌症而转移至骨骼,或者可以是原发性疾病,其中软组织治疗是对于转移的癌症进行。有时候,软组织和骨骼疾病可以是不相关的(例如患有风湿性软组织疾病的病人体内骨骼疾病的另外治疗)。

[0064] 本发明在所有方面的关键方面是使用八齿配体,特别是含有羟基吡啶酮的八齿配体。这样的配体将通常包含至少一个螯合基团,该螯合基团为以下结构(I)的取代的吡啶:



[0066] 其中R<sub>1</sub>是任选的N-取代基,并且因此可以不存在或可以选自烷基,OH, O-烷基, SH和S-烷基,其中烷基部分的任一或各自独立地选自短烷基,例如C1至C8烷基,包括C1至C8烷基、烯基或炔基,或者可以是OH或O-烷基。R<sub>1</sub>也可以包含如以下指出的连接基部分,和/或也可以包含如以下指出的偶联部分。

[0067] 在式I中,基团R<sub>2</sub>至R<sub>6</sub>可以各自独立地选自H, OH, =O, 短烷基(如本申请描述), 连接基部分(如本申请描述)和/或偶联部分(如本申请描述)。通常,基团R<sub>1</sub>至R<sub>6</sub>中的至少一个将为OH。通常,基团R<sub>2</sub>至R<sub>6</sub>中的至少一个将为=O。通常,基团R<sub>1</sub>至R<sub>6</sub>中的至少一个将为连接基部分(如本申请描述)。优选地,确切地基团R<sub>2</sub>至R<sub>6</sub>中的一个将为=O。优选地,确切地基团R<sub>1</sub>至R<sub>6</sub>中的一个将为OH。优选地,确切地基团R<sub>1</sub>至R<sub>6</sub>中的一个将为连接基部分(如本申请描述)。剩余基团R<sub>1</sub>至R<sub>6</sub>可以是本申请指出的任何部分,但是优选为H。当连接于连接基部分的连接基部分或任何另外的连接基、模板或螯合基团不包含偶联部分时,那么基团R<sub>1</sub>至R<sub>6</sub>中的一个优选为偶联部分(如本申请描述)。

[0068] 在优选的实施方式中,基团R<sub>1</sub>至R<sub>6</sub>中的一个将为OH, R<sub>2</sub>至R<sub>6</sub>中的一个将为=O, OH和=O基团将位于环的邻近原子上。因此,在优选的实施方式中,OH和=O可以分别在原子1, 2; 2, 3; 3, 2; 3, 4; 或4, 3上(从氮开始按照预期的编号)。具有至少一个螯合部分的八齿配体(其中OH和=O基团分别存在于位置3和2)是高度优选的。八齿配体可以具有2、3或4个这样的螯合基团,其中2或4个这样的基团是高度优选的。

[0069] 适宜的螯合部分可以通过本领域已知的方法形成,包括描述于US5,624,901(例如实施例1和2)和WO2008/063721的方法(都通过参考并入本申请)。

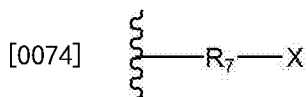
[0070] 如本申请使用,术语“连接基部分”(式II中的R<sub>L</sub>)用于表示用于连接八齿配体中至少两个螯合基团的化学实体,它形成本发明各方面的关键部分。通常,各螯合基团(例如以上式I和/或以下式II的那些)将为二齿的,因此四个螯合基团(其中至少一个为式I)将通常存在于配体中。这样的螯合基团通过它们的连接基部分彼此连接。因此,连接基部分(例如以下基团R<sub>L</sub>)可以在多于一个的具有式I和/或II的螯合基团之间共享。连接基部分也可以用作八齿配体和靶向一部分的络合部分之间的连接点。在这样的情况下,至少一个连接基部分将连接于偶联部分(R<sub>C</sub>)。适当的连接基部分包括短烷基,例如C1至C12烷基,包括C1至C12烷基、烯基或炔基,包括所有拓扑学的甲基、乙基、丙基、丁基、戊基和/或己基。

[0071] 连接基部分也可以是或包含任何其它适当强度的化学连接基,包括酯、醚、胺和/或酰胺基团。连接两个螯合部分的原子的总数(如果存在多于一个路径,通过最短路径计算)将通常受限,由此将螯合部分限制在络合物形成的适当排列中。因此,通常选择连接基

部分以在螯合部分之间提供不多于15个原子,优选地在螯合部分之间提供1至12个原子,更优选为1至10个原子。当连接基部分直接连接两个螯合部分时,连接基的长度通常为1至12个原子,优选为2至10(例如乙基,丙基,正丁基等)。当连接基部分连接于中心模板(参见以下)时,那么各连接基可以较短,其中两个单独的连接基连接螯合部分。在该情况下,1至8个原子、优选为1至6个原子的连接基长度可以是优选的(甲基,乙基和丙基是适宜的,因为它们例如在一端或两端具有酯、醚或酰胺连接基的)。

[0072] 除连接基部分(其主要用于将八齿配体的各种螯合基团彼此相连和/或连接于中心模板)之外,八齿配体优选地还包含“偶联部分”(R<sub>c</sub>)。偶联部分的功能是使八齿配体与靶向-部分相连。这可以通过共价连接或非共价连接(例如通过特异性结合对,例如生物素/抗生物素蛋白(链霉抗生物素蛋白)实现。优选地,偶联部分共价连接于螯合基团,所述连接或通过直接共价连接于螯合基团之一或更典型地通过连接于连接基部分或模板。假如使用两个或更多个偶联部分,那么它们各自可以连接于任何可用位点,例如在任何模板、连接基或螯合基团上。

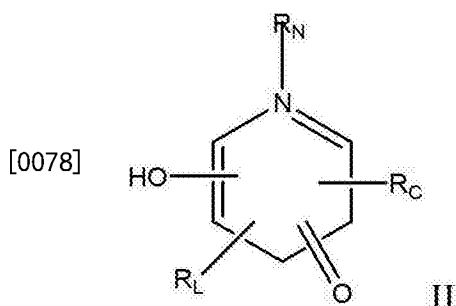
[0073] 在一种实施方式中,偶联部分可以具有结构:



[0075] 其中R<sub>7</sub>是桥接部分,其选自取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基;X是靶向部分或反应性官能团。优选的桥接部分包括本申请指出的适宜用作连接基部分的所有那些基团。优选的靶向部分包括本申请描述的所有那些,优选的反应性X基团包括与靶向部分形成的共价连接的任何基团,包括,例如,COOH、OH、SH、NHR和COH基团,其中NHR的R可以是H或任何本申请描述的短烃基。连接在靶向-部分上的高度优选的基团包括赖氨酸残基的ε-胺和半胱氨酸残基的硫醇基团。适宜的反应性X基团的非限制性实例包括N-羟基琥珀酰亚胺基酯,亚氨酸酯,酰基卤,N-马来酰亚胺,α-卤代乙酰基和异硫氰酸酯,其中后三个适用于与硫醇基团的反应。

[0076] 偶联部分优选地连接,由此所得的偶联的八齿配体将能够稳定金属离子络合物。偶联部分因此优选地连接于连接基、模板或螯合部分,连接位点在不会显著影响络合的地方。这样的位点优选地在连接基或模板上,更优选地在远离结合于靶的表面的位置。

[0077] 优选的螯合基团包括具有以下式II的那些:



[0079] 在以上式II中,=O部分表示连接于吡啶环的任何碳的酮基团,-OH表示连接于吡啶环的任何原子的羟基部分,-R<sub>L</sub>表示将羟基吡啶酮部分连接于其它络合部分由此形成整个八齿配体的连接基部分。本申请描述的任何连接基部分适宜用作R<sub>L</sub>,包括短烃基,例如C1至

C8烷基,包括C1至C8烷基、烯基或炔基,包括所有拓扑学的甲基、乙基、丙基、丁基、戊基和/或己基。 $R_L$ 可以在吡啶环的任何原子连接式II的环,例如碳原子或氮原子。 $R_L$ 基团然后可以由此直接结合于另一个螯合部分、结合于另一个连接基基团和/或连接于中心原子或基团(例如环)或其它模板(如本申请描述)。选择连接基、螯合基团和任选的模板部分,由此形成适当的八齿配体。

[0080] 在一个优选的实施方式中,式II的-OH和=O部分位于吡啶环的邻近原子上,使得1,2-;2,3-,3,2-;4,3-;和3,4-羟基吡啶酮衍生物全部是高度适宜的。

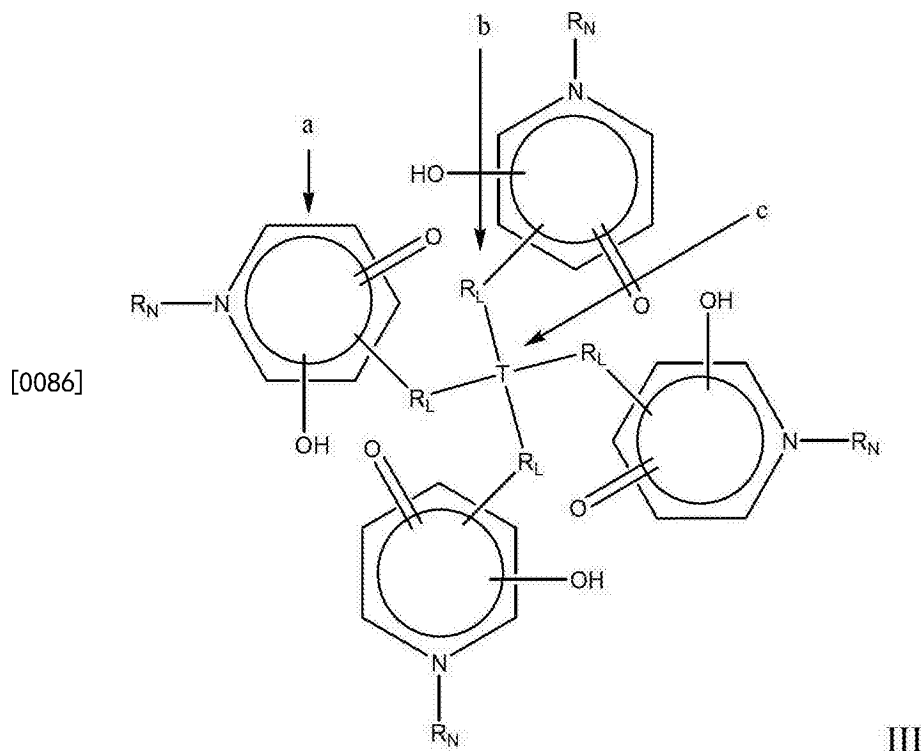
[0081] 当OH基团或连接基部分 $R_L$ 位于吡啶环的氮上时,基团 $R_N$ 通常不存在。但是,当存在时, $R_N$ 可以是任何适宜的部分,包括取代或未取代的烷基,特别是本申请指出的短烷基。

[0082] 在一个优选的实施方式中,至少一个3,2-羟基吡啶酮部分存在于八齿配体结构中。这明显可以由本申请指出的各种取代基部分中的任一者取代。

[0083] 由于式II的各部分具有两个潜在的配位氧,本发明的一种实施方式提供八齿配体,其包含至少2个、优选为至少3个和最优选为至少4个式I的独立选择的部分。式II的各部分可以具有独立的取代方式,但是在一个优选的实施方式中,至少一个部分是3,2-羟基吡啶酮部分。配体可以包括2,3或4个3,2-羟基吡啶酮部分(适当地取代,如本申请描述)。

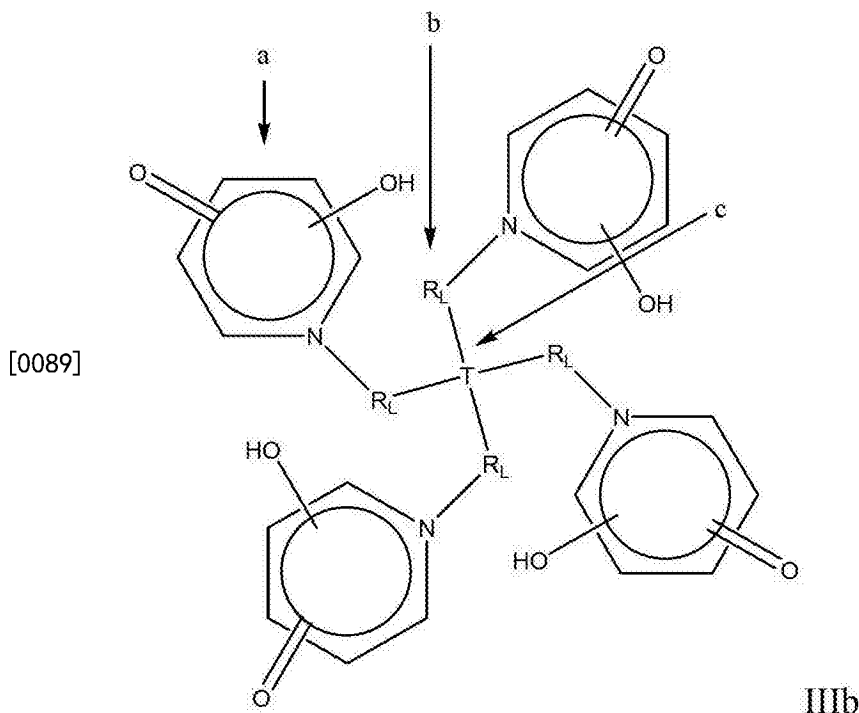
[0084] 八齿配体中式I或II的各部分可以通过本申请讨论的任何适当的连接基和以任何适当的拓扑学连接于配体的剩余部分。例如,式I的四个基团可以通过它们的连接基连接于主链,由此形成直链配体,或可以通过连接基桥接以形成可以是直链或环状的“低聚物”类型结构。或者,式I和/或II的配体部分能够以“交叉”或“星型”形态连接于中心原子或基团,各自通过连接基(例如“ $R_L$ ”部分)连接。连接基( $R_L$ )部分可以单独通过碳-碳键、或可以彼此附接地连接于其它螯合基团、主链、模板、偶联部分,或通过任何适当强度的官能团连接于其它连接基,这些官能团包括胺、酰胺、酯、醚、硫醚或二硫键。

[0085] “星型”排列在以下式III中指出:



[0087] 其中所有基团和位置如以上指出，“T”另外是中心原子或模板基团，例如碳原子，烃基链（例如本申请以上描述的任一者），脂族或芳族环（包括杂环）或稠合的环体系。最基础的模板是单个碳，其然后通过它们的链接基团附接于各整合部分。具有两个附接于模板各端的整合部分的较长的链，例如乙基或丙基，是同等可行的。明显地，任何适当强度的连接基可以用于连接模板和连接基部分，包括碳-碳键、酯、醚、胺、酰胺、硫醚或二硫键。

[0088] 在式III的结构中，基团 $R_N$ 和 $R_L$ 可以是相同基团，使得整合部分通过吡啶环的氮原子连接于模板T。这提供了以下类型IIIb的结构：

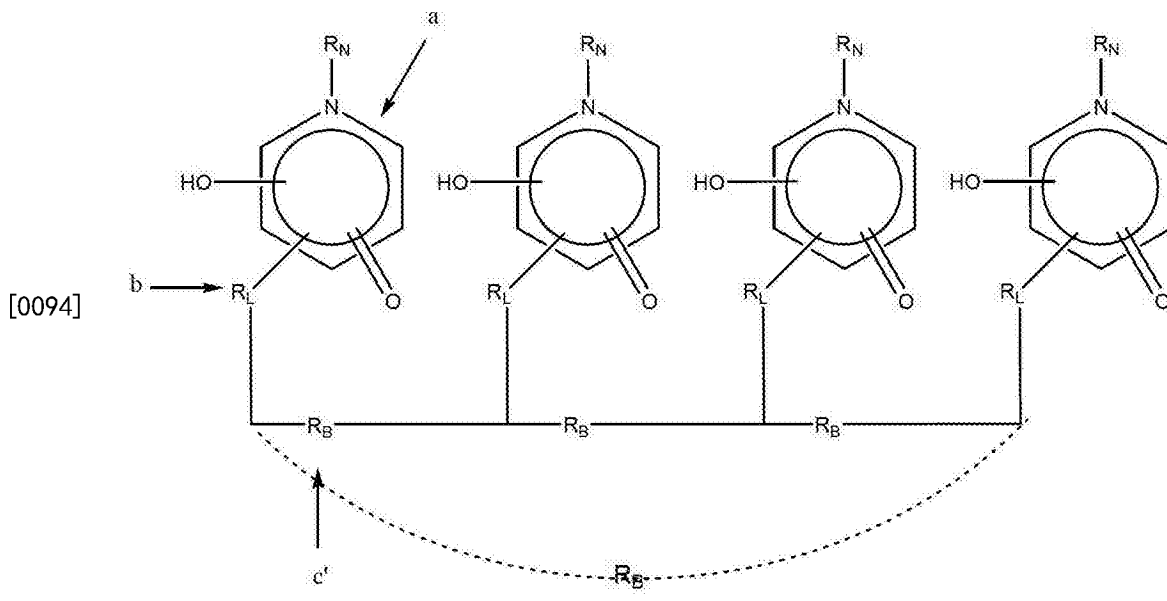


[0090] 显然，在式II、III、IIIb、IV和IVb的结构中，当适当时，并没有被另外取代（例如被连接基或偶联部分取代）的吡啶环位置上可以携带针对式I中的 $R_1$ 至 $R_5$ 描述的取代基。特别地，小的烷基取代基，例如甲基、乙基或丙基可以在任何位置存在。

[0091] 八齿配体通常另外地包含至少一个如上所述的偶联部分。这可以是任何适宜的结构，包括本申请指出的那些并且将终止于靶向一部分、特异性结合剂或能够连接于这样的靶向部分或特异性结合剂的官能团。

[0092] 偶联部分可以附接于连接基、模板或整合部分的任何适当的点，例如在式III中指出的点a)、b)和/或c)。偶联部分的附接可以通过任何适当强度的连接基进行，例如碳-碳键、酯、醚、胺、酰胺、硫醚或二硫键。类似地，能够形成与靶向一部分连接的任何这种连接基的基团适用于偶联部分的官能末端，并且当附接于靶向一部分时该部分将终止于这样的基团。

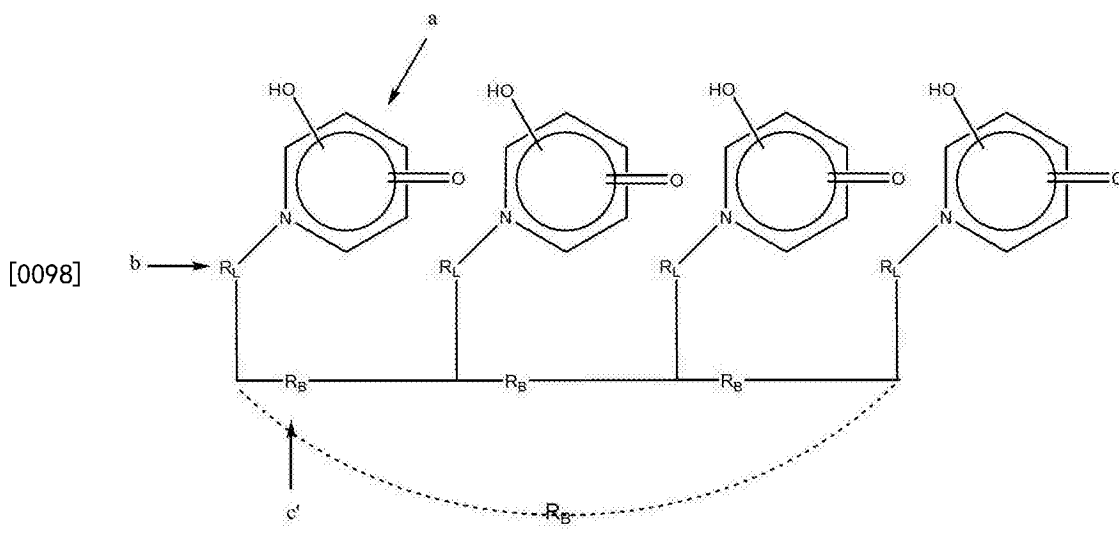
[0093] 可替换的“主链”类型结构在以下式IV指出



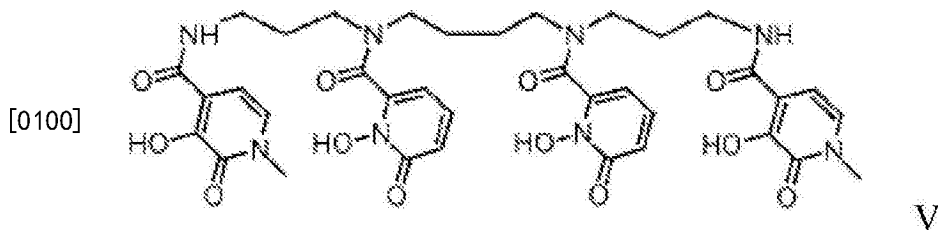
[0095] 其中所有的基团和位置如以上指出,另外,"R<sub>B</sub>"是主链部分,其通常与本申请指出的任何连接基部分具有类似的结构和功能,因此可以将连接基部分的任何定义应用于上下文允许处的主链部分。适宜的主链部分将形成支架,在其之上螯合部分通过它们的连接基附接。通常需要三个或四个主链部分。通常,对于直链主链将需要3个,或者如果主链是环状的则需要4个。特别优选的主链部分包括短烃链(例如本申请描述的那些),其任选地在一端或两端具有杂原子或官能部分。在这方面,胺和酰胺基团特别适用。

[0096] 偶联部分可以附接于连接基、主链或螯合部分的任何适当的点,例如在式IV中指出的点a)、b)和/或c')。偶联部分的附接可以通过任何适当强度的连接基进行,例如碳-碳键、酯、醚、胺、酰胺、硫醚或二硫键。类似地,能够形成与靶向一部分连接的任何这种连接基的基团适用于偶联部分的官能末端,并且当附接于靶向部分时该部分将终止于这样的基团。

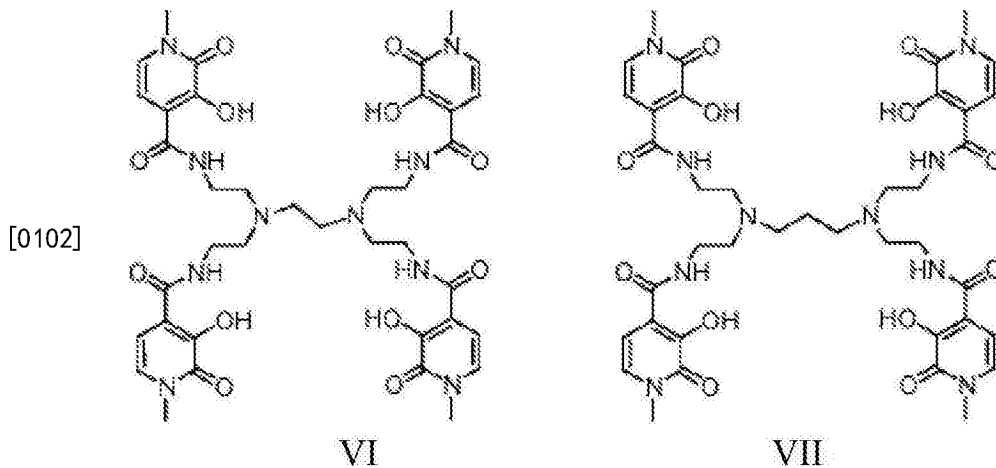
[0097] 关于式III,在式IV的结构中,基团R<sub>N</sub>和R<sub>L</sub>可以是相同基团,使得螯合部分通过吡啶环的氮原子附接于主链R<sub>B</sub>。这提供以下类型IVb的结构:



[0099] 具有通过酰胺连接基附接于主链的两个1,2-HOPO螯合部分和两个3,2-HOPO螯合部分的"主链"类型八齿配体的实例为如下的式V:

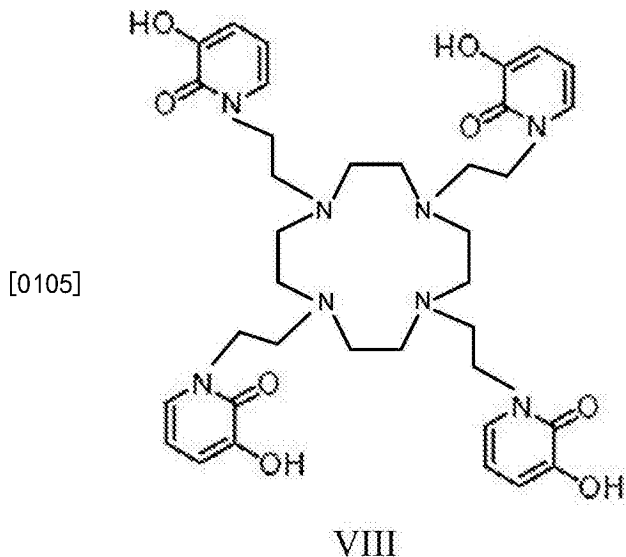


[0101] 示例性的“模板化的 (templated)”八齿配体为如下式VI和VII,它们各自具有四个3,2-HOPO螯合部分,所述螯合部分通过乙酰胺基团分别连接于乙二胺和丙二胺:

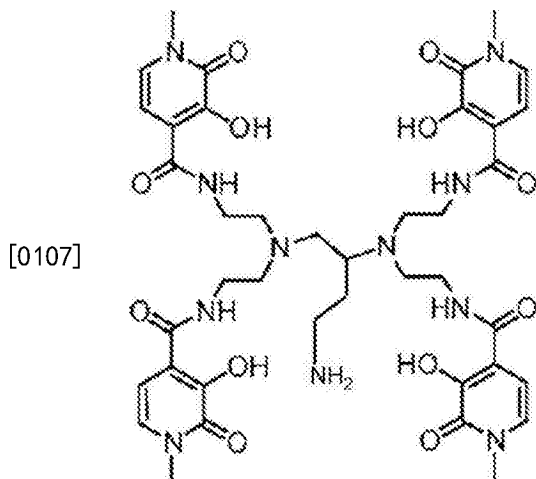


[0103] 应注意,在上式中,3,2-HOPO部分的游离氮取代有甲基,且例如甲基或乙基等小烷基在该位置是优选的(式I中的R<sub>1</sub>或式II中的R<sub>N</sub>)。

[0104] 示例性的“模板化的”八齿配体为如下式的VIII,它具有四个3,2-HOPO螯合部分,所述螯合部分通过HOPO环中的氮连接于胺环烷烃:



[0106] 如上指出,八齿配体通常包括可以在任何点连接于配体的其余部分的偶联部分。根据该实施方式,具有终止偶联部分的官能化部分的示例性化合物是以下结构IX:



## IX

[0108] 本申请涉及的所有文献通过参考并入本申请,包括Gordon AEV et al, Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. Chem. Rev. 2003, 103, 4207-4282, PCT专利申请W0 2008/063721A2和 T.N.Lambert et al., Tetrahedron Letters 43 (2002) 7379-7383。

[0109] 本发明通过附图进一步说明,其中:

[0110] 图1-显示 $^{232}\text{Th}^{4+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) 和1mg/mL ALG-DD-NCS在DMSO中的反应混合物(理论比2:3)在室温保持15分钟之后的色谱。存在显著量的络合物 $^{232}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS ( $t_{\text{R}}=5.74$ 分钟;  $m/z$  1328.5), 不存在痕量的游离ALG-DD-NCS配体 ( $t_{\text{R}}=5.36$ )。

[0111] 图2-显示 $^{232}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS络合物的质谱 ( $m/z$  1328.3949)。

[0112] 图3-显示 $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) 和1mg/mL ALG-DD-NCS在DMSO中的反应混合物(理论比2:3)在室温保持15分钟之后的色谱。存在显著量的络合物 $\text{Fe}$ -ALG-DD-NCS ( $t_{\text{R}}=5.81$ 分钟;  $m/z$  1153.5), 不存在痕量的游离ALG-DD-NCS配体 ( $t_{\text{R}}=5.36$ 分钟)。

[0113] 图4-显示 $\text{Fe}$ -ALG-DD-NCS络合物的质谱 ( $m/z$  1153.3002)。

[0114] 图5-显示 $\text{In}^{3+}$  ( $\text{HCl}$ ) 和1mg/mL ALG-DD-NCS在DMSO中的反应混合物(理论比2:3)在室温保持15分钟之后的色谱。存在显著量的络合物 $\text{In}$ -ALG-DD-NCS ( $t_{\text{R}}=5.95$ 分钟;  $m/z$  1212.5), 不存在痕量的游离ALG-DD-NCS配体 ( $t_{\text{R}}=5.36$ 分钟)。

[0115] 图6-显示 $\text{In}$ -ALG-DD-NCS络合物的质谱 ( $m/z$  1212.2666)。

[0116] 图7-显示 $^{232}\text{Th}^{4+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) 和1mg/mL ALG1005-38在乙酸盐-缓冲液 (pH 5.5) 中的反应混合物(理论比1:3)在室温保持10分钟之后的色谱。存在显著量的络合物 $^{232}\text{Th}$ -ALG1005-38 ( $t_{\text{R}}=3.56$ ;  $m/z$  1184.5), 其余为游离ALG1005-38配体 ( $t_{\text{R}}=3.20$ )。

[0117] 图8-显示 $^{232}\text{Th}$ -ALG1005-38络合物的质谱 ( $m/z$  1184.4662)。

[0118] 图9-显示 $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{HNO}_3$ ) 和1mg/mL ALG1005-38在乙酸盐-缓冲液 (pH 5.5) 中的反应混合物(理论比1:3)在室温保持10分钟之后的色谱。存在显著量的络合物 $\text{Fe}$ -ALG1005-38 ( $t_{\text{R}}=3.70$ ;  $m/z$  1009.5), 其余为游离ALG1005-38配体 ( $t_{\text{R}}=3.22$ )。

[0119] 图10-显示 $\text{Fe}$ -ALG1005-38络合物的质谱 ( $m/z$  1009.3727)。

[0120] 图11-显示 $\text{In}^{3+}$  ( $\text{HCl}$ ) 和1mg/mL ALG1005-38在乙酸盐-缓冲液 (pH 5.5) 中的反应混合物(理论比1:3)在室温保持10分钟之后的色谱。存在显著量的络合物 $\text{In}$ -ALG1005-38 ( $t_{\text{R}}=3.72$ ;  $m/z$  1068.5), 仅存在痕量的游离ALG1005-38配体 ( $t_{\text{R}}=3.21$ )。

[0121] 图12-显示In-ALG1005-38络合物的质谱(m/z 1068.3485)。

[0122] 图13-显示Ga<sup>3+</sup>(HCl)和1mg/mL ALG1005-38在乙酸盐-缓冲液(pH 5.5)中的反应混合物(理论比1:3)在室温保持10分钟之后的色谱。存在显著量的络合物Ga-ALG1005-38( $t_R=3.65$ ;m/z 1022.5),其余为游离ALG1005-38配体( $t_R=3.21$ )。

[0123] 图14-显示Ga-ALG1005-38络合物的质谱(m/z 1022.3571)。

[0124] 图15-显示<sup>232</sup>Th<sup>4+</sup>(HCl)和1mg/mL Bb-1-HOPO-1-DEBN的反应混合物(理论比2:3)在室温保持15分钟之后的色谱。存在显著量的络合物<sup>232</sup>Th-Bb-1-HOPO-1-DEBN( $t_R=3.52$ )。痕量上限:m/z 1222.5的质谱。痕量下限:UV,在330nm。

[0125] 图16-显示<sup>232</sup>Th-Bb-1-HOPO-1-DEBN络合物的质谱(m/z 1222.5)。

[0126] 图17-显示在第0-7天<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(trastuzumab)和结合于SK-OV-3细胞沉淀物(cell pellets)的游离<sup>227</sup>Th的计算量,显示为衰变校正的<sup>227</sup>Th-活性(cpm)。

[0127] 图18-显示用以下物质处理的SK-OV-3细胞的标准发光值:(1)常规培养基(对照);(2)20μg/mL曲妥珠单抗;(3)20kBq/mL <sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(10166Bq/μg);和(4)20kBq/mL游离<sup>227</sup>Th。

[0128] 图19-显示用以下物质处理的1000个SK-OV-3单细胞的克隆形成测定(clonogenic assay):(1)常规培养基(对照);(2)曲妥珠单抗;(3)游离<sup>227</sup>Th;和(4)<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(10166Bq/μg)。(平均值±SD;n=3)

[0129] 图20-显示用以下物质处理的3000个SK-OV-3单细胞的克隆形成测定:(1)常规培养基(对照);(2)曲妥珠单抗;(3)游离<sup>227</sup>Th;和(4)<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(10166Bq/μg)。(平均值±SD;n=3)

[0130] 图21-显示在生物分布24小时和4天之后,<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(2700Bq/μg)在具有SK-OV-3异种移植的Ba1b/c裸鼠中的器官分布。(平均值±SD;n=5)

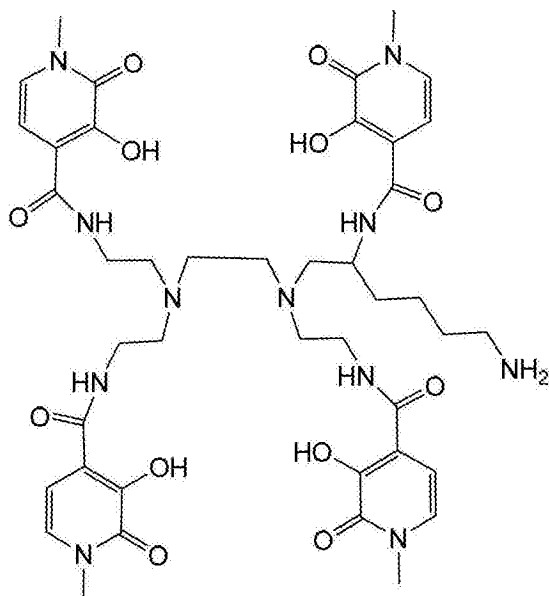
[0131] 本发明现在通过以下非限制性实施例说明。实施例中示例的所有化合物形成本发明的优选实施方式(包括优选的中间体和前体)并且可以在上下文允许之处的任何方面单独或以组合形式使用。因此,例如,实施例2的化合物2至4、实施例3的化合物10和实施例4的化合物7中的各自和全部形成它们各自类型的优选实施方式。

[0132] 实施例1-分离纯钷-227

[0133] 钷-227从铷-227母牛中分离。铷-227通过镭-226的热中子辐射然后由镭-227( $t_{1/2}=42.2m$ )衰变为铷-227而产生。通过阴离子交换色谱,从铷-227衰变混合物在8M HNO<sub>3</sub>中的溶液中选择性地保留钷-227。使用内径2mm、长30mm的柱,其包含70mg的AG<sup>®</sup>1-X8树脂(200-400目,硝酸盐形式)。在铷-227之后,镭-223和子体从柱洗脱,使用12M HCl从柱中提取钷-227。将包含钷-227的洗脱液蒸发至干燥,残余物重新悬浮在0.01M HCl中。

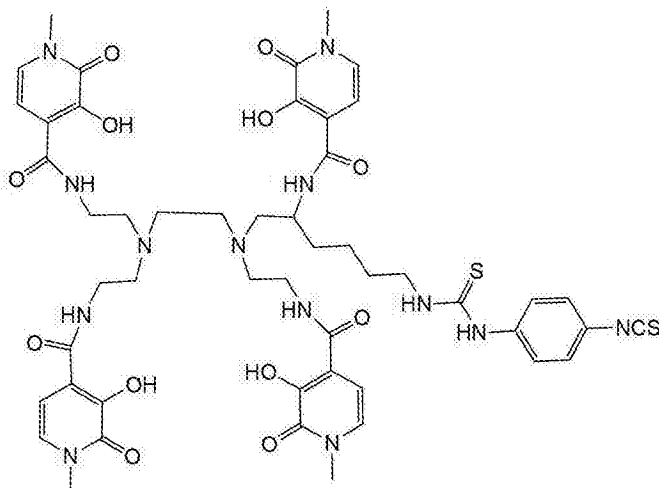
[0134] 实施例2-合成ALG-DD-NCS





3

[0136]



4

[0137] 将3-苄氧基-1-甲基-4-(2-硫代噻唑烷-1-基)羰基-2(1H)-吡啶酮(根据Raymond, K.; Xu, J., .US 5,624,901合成)(2.22mmol, 0.8g)、三乙胺(0.31mL, 2.22mmol)和DMAP(5mg)添加到[5-氨基-6-((2-氨基-乙基)-{2-[双-(2-氨基-乙基)-氨基]-乙基}-氨基)-己基]-氨基甲酸叔丁酯(BocLys-H(2,2)胺)(根据Raymond, K.; Corneillie, T.M.; Xu, J. WO 2008/063721A2合成)(0.204g, 0.505mmol)在二氯甲烷(80mL)中的溶液中。将该混合物在室温搅拌过夜然后蒸发至干燥。将剩余物溶解于二氯甲烷并填装在快速硅胶柱上,用2-8%甲醇的二氯甲烷溶液的梯度洗脱。收集适当的级分并蒸发至干燥,得到浅米色稠油状的ALG-001(1)(~0.4g)。

[0138] MS(ESI<sup>+</sup>):m/z 1369 [M+H]<sup>+</sup>,m/z 1391 [M+Na]<sup>+</sup>

[0139] 将ALG-001(1)(280mg, 0.205mmol)溶解于冰乙酸(20mL),添加20%Pd(OH)<sub>2</sub>和炭催化剂(60mg),在40-45psi下在室温使混合物氢化过夜。过滤然后旋转蒸发,得到酒红色稠油状的ALG-DEBN(2)(~260mg,具有痕量的乙酸)。

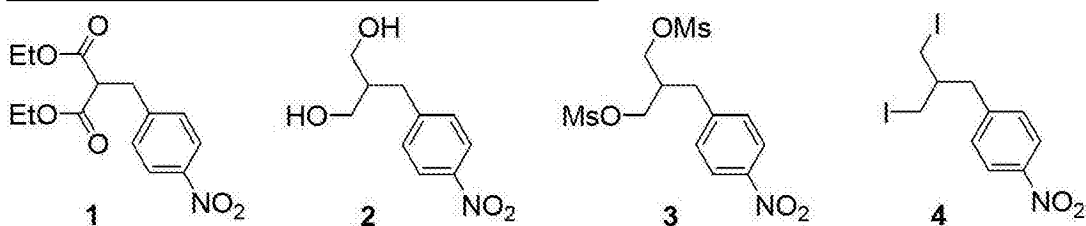
[0140] MS(ESI<sup>+</sup>):m/z 1007 [M+H]<sup>+</sup>,m/z 1029 [M+Na]<sup>+</sup>

[0141] 将ALG-DEBN (2) (70mg) 在环境温度溶解于2:1MeOH/二氯甲烷 (15mL)。然后,添加0.5g净化的Amberlyst-15树脂,将混合物温和地搅拌过夜。然后通过过滤分离树脂并依次用己烷 (10mL)、四氢呋喃 (10mL)、和甲醇 (10mL) 洗涤。将该胺-结合的树脂转移至4M氨的甲醇溶液 (20mL) 并温和搅拌50分钟。添加四氢呋喃 (10mL),从而溶解所有脱保护的产物。树脂然后通过过滤移除,蒸发溶液,得到ALG-DEBN-DEBOC (3) (37mg)。

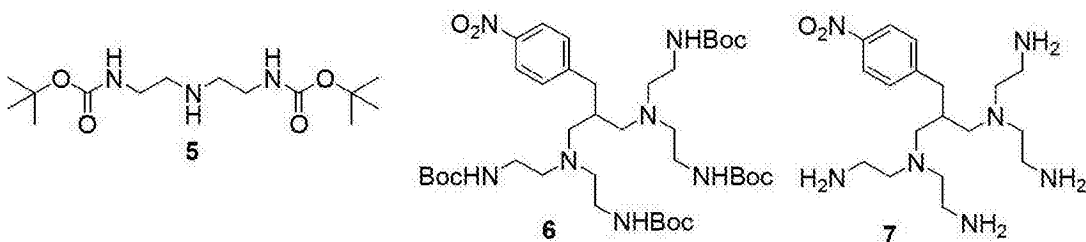
[0142] MS (ESI<sup>+</sup>): m/z 909 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 931 [M+Na]<sup>+</sup>

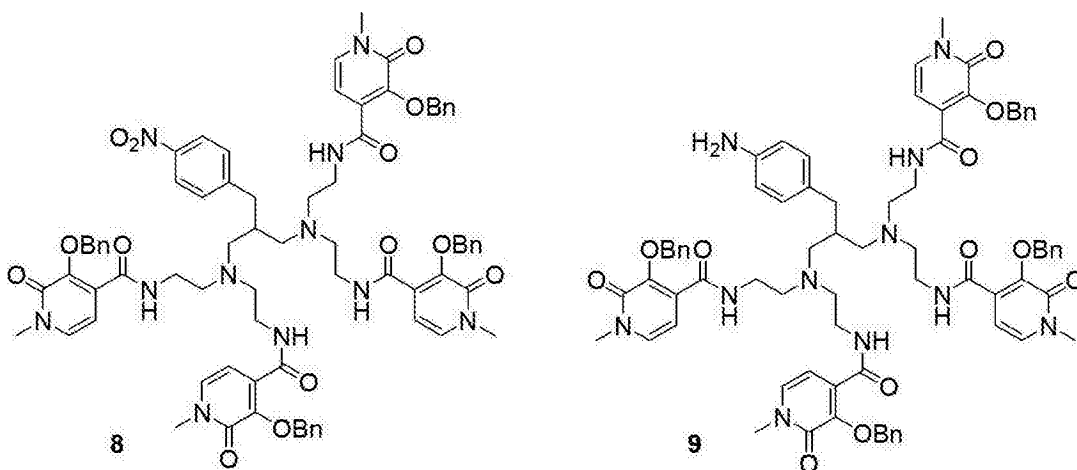
[0143] 使40mg ALG-DEBN-DEBOC (3) 在6:1异丙醇-水 (v/v, 7mL) 中的悬浮液与1,4-亚苯基二异硫氰酸酯 (4.1当量) 在氯仿 (2.5mL) 中的溶液反应。当抽取样品用于MS分析时,将反应物在室温搅拌30分钟。观察到对应于预期质量 (1100) 的峰。在真空下移除挥发性物质之后,分离出约95mg浅棕色固体。使浅棕色固体悬浮在乙腈中,将混合物加热回流15分钟。使混合物冷却至室温,然后通过过滤分离出26mg棕色固体的ALG-DD-NCS (4)。

[0144] 实施例3-合成对称的含3,2-HOPO的整合剂。

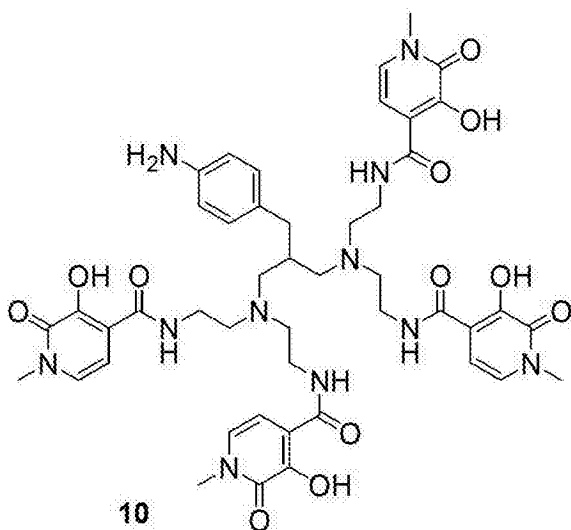


[0145]





[0146]



[0147] 将氢氧化钠(60.1g作为在矿物油中的60%分散体,1.5mol,5当量)装入烧瓶中并添加四氢呋喃(1L)。在1.5小时的期间内逐滴添加丙二酸二甲酯(172mL,1.5mol,5当量);反应混合物的温度保持低于+10°C。然后用四氢呋喃(400mL)稀释反应混合物。在剧烈震荡下,在30分钟期间内将4-硝基苄基溴(65.0g,0.3mol,1当量)在四氢呋喃(170mL)中的溶液缓慢添加到以上制备的混合物中。在0°C搅拌30分钟之后,将反应混合物倒入盐水(1L饱和NaCl溶液)中并在环境温度继续搅拌过夜,得到白色沉淀物。然后用甲基叔丁基醚稀释混合物,过滤出沉淀物并溶解在热乙醇中。过滤乙醇混合物,将滤液浓缩成小体积,由其沉淀出白色结晶固体的24.8g(31%)的(4-硝基苄基)丙二酸二甲酯(1)。

[0148] LC纯度:>90%(254nm)

[0149] MS(APCI<sup>+</sup>) m/z 285.1 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

[0150] 将化合物1(24.8g,92.7mmol)溶解于四氢呋喃(230mL)并添加硼烷-二甲基硫醚络合物(28.5mL,301mmol,3.3当量)。使反应混合物回流24h,然后使其在环境温度静置过夜。在0°C添加甲醇(250mL),倒入盐水(600mL)中并用乙酸乙酯萃取。合并的有机萃取物用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并真空浓缩。剩余物用甲醇共蒸发。粗产物通过快速色谱法纯化,得到14.5g(74%)黄色油状的2-(4-硝基苄基)丙烷-1,3-二醇(2)。

[0151] LC纯度:>92%(254nm)

[0152] 将化合物2 (10.0g, 47.3mmol) 溶解在二氯甲烷 (100mL) 中并添加三乙胺 (14.5mL, 104mmol, 2当量)。反应混合物在冰浴中冷却, 逐份添加甲磺酰氯 (8.0mL, 104mmol, 2当量)。使最终混合物过夜以达到环境温度。然后添加另外的三乙胺 (1.5mL) 和甲磺酰氯 (0.8mL), 继续搅拌30分钟。然后反应混合物用二氯甲烷稀释, 过滤出形成的沉淀物。二氯甲烷滤液用饱和的NaHCO<sub>3</sub>水溶液、0.5M HCl水溶液和盐水洗涤, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并真空浓缩, 得到14.5g (83%) 橙色油状的二甲磺酸2-(4-硝基苄基) 丙烷-1,3-二基酯 (3), 其无需另外纯化而用于下一步骤。

[0153] LC纯度:>87% (254nm)

[0154] MS (APCI<sup>+</sup>) m/z 385.3 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

[0155] 将化合物3 (14.5g, 39.5mmol) 溶解在甲基乙基酮 (100mL) 中, 添加碘化钠 (16.0g, 107mmol, 2.7当量), 将混合物在95°C加热1h。过滤出所得白色沉淀物并用甲基乙基酮洗涤, 将滤液真空浓缩。粗产物从甲基叔丁基醚研磨并通过快速色谱法纯化, 得到10.6g (63%) 的作为黄色固体的1-[3-碘-2-(碘甲基) 丙基]-4-硝基苯 (4)。

[0156] LC纯度:>90% (254nm)

[0157] MS (APCI<sup>+</sup>) m/z 431.1 [M+H]<sup>+</sup>

[0158] 将二亚乙基三胺 (10.8mL, 100mmol) 和三乙胺 (42mL, 300mmol, 3当量) 溶解于四氢呋喃 (500mL) 并在冰浴中冷却。然后在2.5小时的期间内逐滴添加Boc-ON (49.5g, 200mmol, 2当量) 在四氢呋喃 (190mL) 中的溶液。在使混合物过夜达到环境温度之前, 在0°C搅拌反应混合物另外1h。然后真空浓缩反应混合物。将剩余物溶解于二氯甲烷并用1M NaOH水溶液洗涤。将有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并真空浓缩。粗产物通过快速色谱法纯化, 得到20.0g (66%) 黄色粘性油的(亚氨基二乙烷-2,1-二基) 双氨基甲酸二叔丁酯 (5)。

[0159] MS (APCI<sup>+</sup>) m/z 304.3 [M+H]<sup>+</sup>

[0160] 将化合物5 (26.0g, 86mmol, 4当量) 溶解于无水甲苯 (40mL) 并添加N-乙基吗啉 (5.4mL, 42mmol, 2当量)。使化合物4 (9.2g, 21mmol) 溶解于无水甲苯 (35mL) 并添加到反应混合物中。将混合物在105°C在压力反应器中培养5天。然后使反应混合物冷却至环境温度, 用乙酸乙酯稀释并用饱和的NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤。合并的有机萃取物用水和盐水洗涤, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并真空浓缩。粗产物通过快速色谱法纯化, 得到11.4g (70%) 的作为黄色固体泡沫的化合物6。

[0161] LC纯度:>96% (210nm)

[0162] MS (APCI<sup>+</sup>) m/z 782.8, [M+H]<sup>+</sup>; 682.7 [M+H-Boc]<sup>+</sup>; 582.6 [M+H-2Boc]<sup>+</sup>; 382.1 [M+H-4Boc]<sup>+</sup>

[0163] 将化合物6 (2.0g, 2.6mmol) 溶解于二噁烷 (16mL), 添加9M的HCl在二噁烷 (22mL) 中的溶液。反应混合物在环境温度搅拌过夜, 然后真空浓缩至干燥, 得到1.9g作为米色固体的化合物7的HCl盐。

[0164] MS (APCI<sup>+</sup>) m/z 382.5 [M+H]<sup>+</sup>

[0165] 将化合物7 (1.9g, 2.6mmol) 添加到DMPU (1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮) (9.5mL) 和3-(苄氧基)-1-甲基-4[(2-硫代-1,3-噻唑烷-3-基) 羰基] 吡啶-2-(1H)-酮 (3.7g, 10.3mmol, 4当量) 中。然后在40分钟的期间内缓慢添加DBU (2.3mL, 15.5mmol, 6当量) 在DMPU (4.7mL) 中的溶液。在环境温度继续搅拌过夜。然后反应混合物用二氯甲烷稀释并用

饱和的NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤。合并的有机萃取物用水和半饱和的盐水洗涤,然后用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并真空浓缩。粗产物通过快速色谱法纯化,得到4.0g作为黄色油状的化合物8,其无需另外的纯化而用于下一步骤。

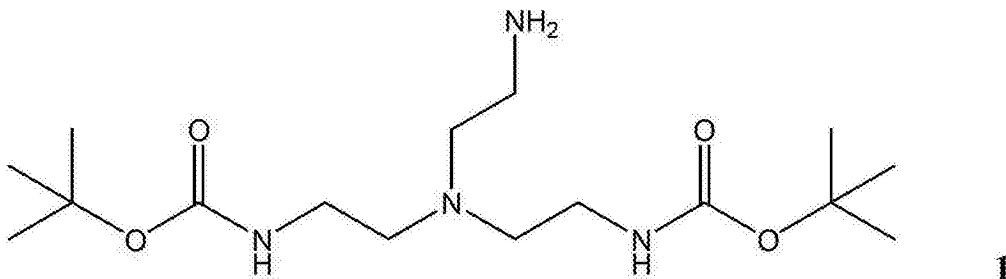
[0166] MS (APCI<sup>+</sup>) m/z 1347.7 [M+H]<sup>+</sup>

[0167] 将化合物8 (4.0g, 2.6mmol) 溶解于乙酸 (200mL) 并添加Pd (OH) 2 (20%w/w在炭上, 50%润湿的) (800mg, 10%w/w)。将反应混合物在Parr压力反应器中在30巴氢气压力在环境温度搅拌过夜。然后通过Celite®垫过滤反应混合物,将滤液真空浓缩。粗产物通过快速色谱法纯化,得到作为米色泡沫状固体的化合物9。

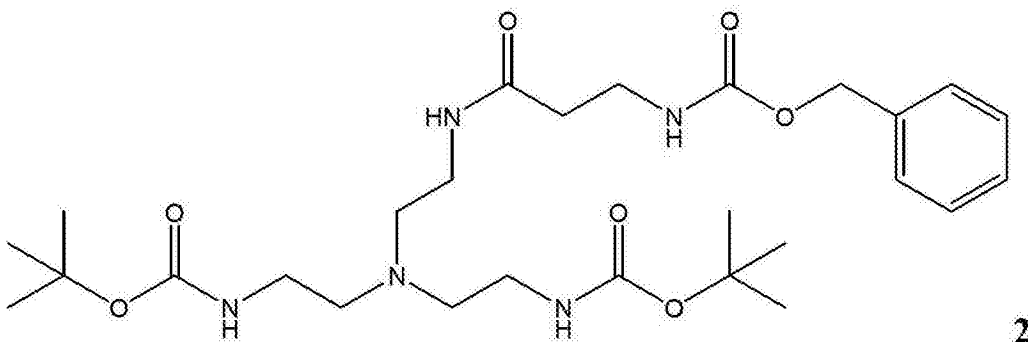
[0168] 将化合物9 (996mg) 溶解于乙酸 (5.5mL), 然后添加6M的HCl的水溶液 (2.5mL) 和5% Pd/C (99mg, 10%w/w)。将反应混合物在压力反应器中在8巴氢气压力下搅拌过夜,然后通过Celite®垫过滤。真空浓缩滤液并将其与甲苯和甲醇共蒸发。将剩余物溶解于甲醇并通过添加乙醚沉淀。过滤出形成的米色沉淀物并真空干燥过夜,得到700mg的化合物10 (ALG1005-38) 的HCl盐。

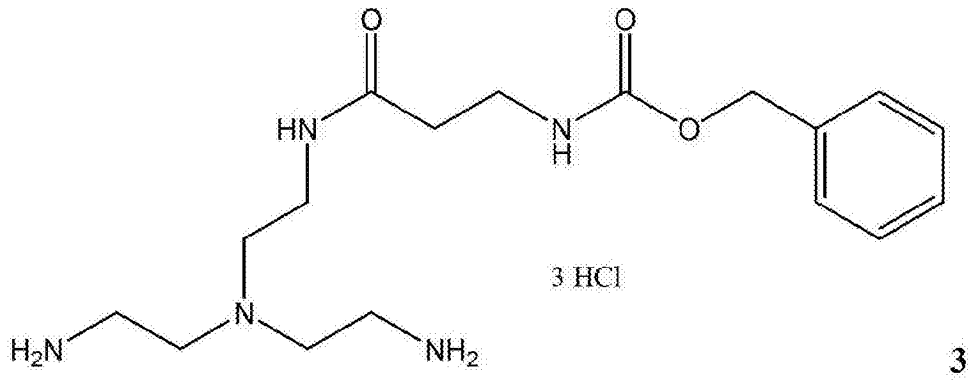
[0169] MS (APCI<sup>+</sup>) m/z 956.7 [M+H]<sup>+</sup>

[0170] 实施例4-合成替代性的对称的含3,2-HOPO的螯合剂。

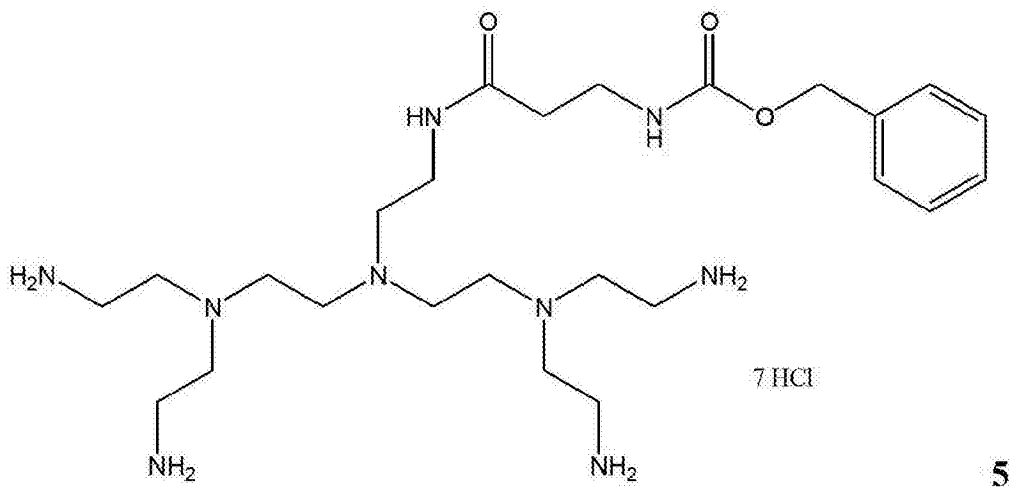
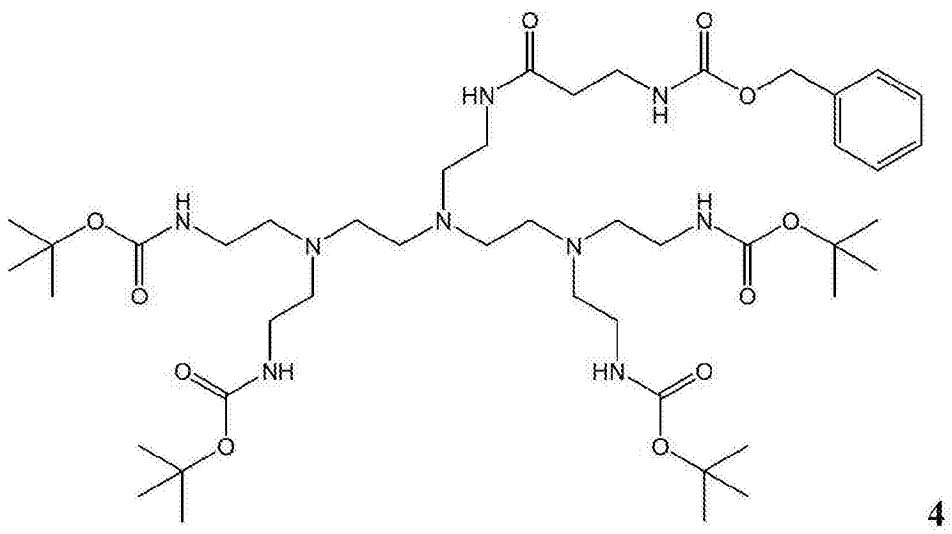


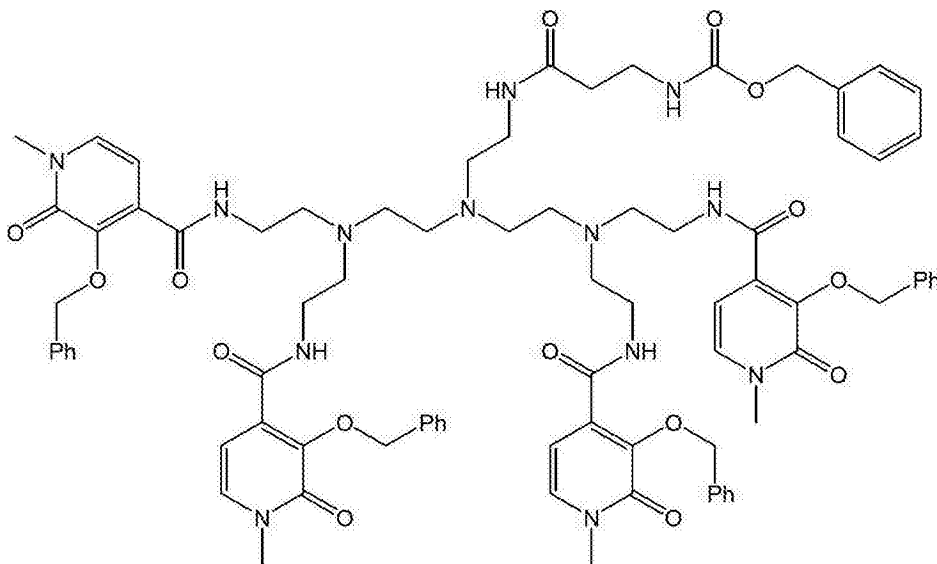
[0171]





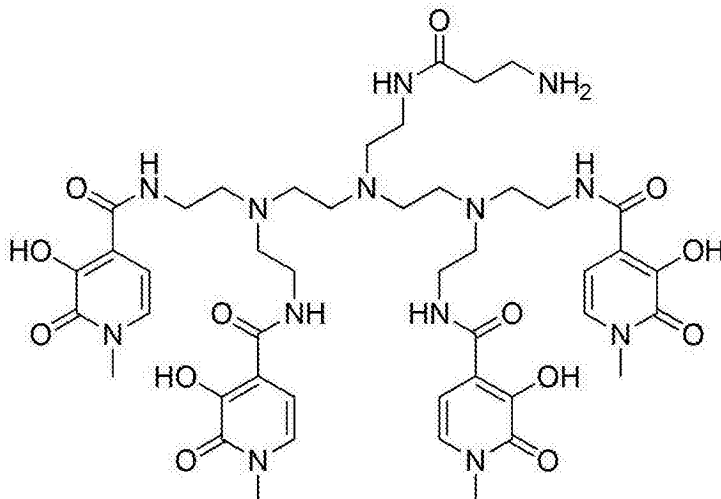
[0172]





6

[0173]



7

[0174] 在室温将Boc酐(24.4g,119mmol)逐份添加到咪唑(8.0g,117mmol)在50mL二氯甲烷中的溶液中。将反应混合物搅拌1小时。反应混合物用50mL水洗涤2次,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。将剩余物溶解于25mL甲苯,添加三(2-氨基乙基)胺(8.19g,56mmol)。将反应混合物在60°C搅拌2小时并真空浓缩。将剩余物溶解于125mL二氯甲烷并用水洗涤(4次,每次用50mL),用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并真空浓缩。干燥快速色谱法(0-15%甲醇的二氯甲烷溶液,含有1%三乙胺)得到作为稠的无色油状的(((2-氨基乙基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)二氨基甲酸二叔丁酯(1)(13.51g,39.0mmol,70%)。

[0175] 波谱数据符合由Frullano et al. (Chem.Eur.J.2004,10,5205-17)报道的数据。

[0176] 将N-Cbz-β-丙氨酸(8.04g,36mmol),4-(二甲基氨基)吡啶(4.40g,36mmol)和EDC·HCl(6.90g,36mmol)溶解于25mL四氢呋喃并搅拌10分钟,然后添加溶解于75mL四氢呋喃的化合物1(10.4g,30mmol)。将反应混合物搅拌4小时并真空浓缩。通过干燥快速色谱法的纯化(0-40%四氢呋喃的二氯甲烷溶液)得到(((2-(3-(Cbz-氨基)丙酰氨基)乙基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)二氨基甲酸二叔丁酯(2)(15.11g,27.4mmol,91%),其为非常粘稠的

浅黄色油。

[0177]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.43 (s, 18H), 2.42-2.56 (m, 8H), 3.04-3.17 (m, 4H), 3.19-3.32 (m, 2H), 3.41-3.57 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 5.22 (bs, 2H), 5.83 (bs, 1H), 7.23 (bs, 1H), 7.26-7.43 (m, 5H)

[0178] MS (ESI<sup>+</sup>) : m/z 574.3 [M+Na]<sup>+</sup>

[0179] 将((2-(3-(Cbz-氨基)丙酰氨基)乙基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)二氨基甲酸二叔丁酯(10.30g, 18.7mmol)溶解于100mL甲醇,逐滴添加乙酰氯(25mL, 0.35mol)。将反应混合物在环境温度搅拌1小时。在真空下将反应混合物浓缩至体积的约1/3,然后添加100mL乙醚,使得无色固体沉淀出。过滤固体,将其用醚洗涤并真空干燥,得到作为无色固体的(3-((2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基甲酸苄酯三盐酸盐(3)(8.70g, 18.7mmol, ~100%)。

[0180]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz, MeOD) : 3.19-3.28 (m, 2H), 3.38-3.62 (m, 14H), 5.10 (s, 2H), 7.26-7.39 (m, 5H)

[0181] MS (ESI<sup>+</sup>) : m/z 352.2 [M+H]<sup>+</sup>

[0182] 在室温将三乙胺(6.75mL, 48.4mmol)添加到化合物3(10.56g, 11.4mmol)在320mL四氢呋喃和320mLN,N-二甲基甲酰胺中的悬浮液中。添加N-boc-2-氨基乙醛(16.0g, 100.5mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(32.00g, 151mmol)。将反应混合物搅拌20小时。添加200mL盐水和500mL氯仿,相分离,水相用3x 100mL氯仿萃取。合并的有机相用100mL盐水洗涤,用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并真空浓缩。快速色谱法(0-10%甲醇的二氯甲烷溶液)得到作为黄色固体的((((2-3-Cbz-氨基丙酰氨基)乙基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基))双(氮烷三基)四(乙烷-2,1-二基)四氨基甲酸四叔丁酯(4)(3.40g, 3.7mmol, 32%)。

[0183] MS (ESI<sup>+</sup>) : m/z 946.7 [M+Na]<sup>+</sup>

[0184] 将化合物4(3.40g, 3.7mmol)溶解于60mL甲醇,逐滴添加乙酰氯(12mL, 0.17mol)。将反应在环境温度搅拌1小时。在真空下将反应混合物浓缩至约10mL,添加50mL乙腈,导致沉淀。过滤固体,用乙腈洗涤并真空干燥,得到作为无色固体的(3-((2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)氨基)-3-氧代丙基)氨基甲酸苄酯七盐酸盐(5)(2.88g, 3.7mmol, ~100%)。

[0185]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz, MeOD) : 2.44-2.61 (m, 2H), 2.68-3.00 (m, 4H), 3.08-3.40 (m, 16H), 3.44-3.52 (m, 4H), 3.54-3.77 (m, 6H), 5.12 (s, 2H), 7.30-7.47 (m, 5H)

[0186] MS (ESI<sup>+</sup>) : m/z 524.5 [M+H]<sup>+</sup>

[0187] 将三乙胺(2.52mL, 18.1mmol)和4-(二甲基氨基)吡啶(12mg, 催化)添加到化合物5(0.81g, 1.04mmol)和3-(苄氧基)-1-甲基-4-(2-硫代噻唑烷-3-羰基)吡啶-2(1H)-酮(1.50g, 4.16mmol)在180mL二氯甲烷中的悬浮液中。将反应混合物搅拌过夜并真空浓缩。快速色谱法(0-10%甲醇的二氯甲烷溶液)得到作为浅棕色固体的(1-(3-(苄氧基)-1-甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-4-基)-5-(2-(3-(苄氧基)-1-甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-4-甲酰氨基)乙基)-8-(2-(双(2-(3-(苄氧基)-1-甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-4-甲酰氨基)乙基)氨基)乙基)-1,12-二羰基-2,5,8,11-四氮杂十四烷-14-基)氨基甲酸苄酯(6)(673mg, 0.45mmol, 43%)。

[0188]  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2.10-2.40 (m, 20H), 3.02-3.21 (m, 10H), 3.32-3.46 (m,

2H), 3.50 (s, 12H), 4.99 (s, 2H), 5.25 (s, 8H), 5.95 (bs, 1H), 6.62 (d, 7.17Hz, 4H), 7.01 (d, 7.17Hz, 4H), 7.15-7.40 (m, 25H), 7.89 (bs, 4H)

[0189]  $^{13}\text{C}$ -NMR (75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 11.48, 35.71, 37.18, 37.35, 37.50, 37.66, 46.18, 51.55, 52.15, 52.82, 53.28, 66.34, 74.64, 74.75, 77.43, 104.63, 127.90, 127.94, 128.40, 128.65, 128.75, 128.94, 130.81, 132.32, 136.27, 136.76, 146.19, 156.45, 159.51, 163.30, 171.31

[0190] MS (ESI<sup>+</sup>): m/z 766.9 [M+2Na]<sup>2+</sup>

[0191] 按照实施例2中描述的将化合物6溶解并脱苄基化, 得到Bb-1-HOPO-1-DEBN (7)。

[0192] 实施例5-用ALG-DD-NCS的整合实验

[0193] 反应溶液通过将固体ALG-DD-NCS (实施例2中的4) 溶解于DMSO (Biotech等级溶剂 99.8%) 至1mg/mL而制备。

[0194] 通过将1mg/mL反应溶液与选择的金属溶液混合 (所用配体与金属比率为3:2) 进行使用不同金属的整合反应。测试用的金属离子来自以下: 将 $^{232}\text{Th}$ 在2% $\text{HNO}_3$  (Perkin Elmer Pure Plus) 中的溶液,  $\text{Fe}^{3+}$ 在2% $\text{HNO}_3$  (Perkin Elmer Pure Plus) 中的溶液, 和 $\text{InCl}_3$  (无水粉末99.999%, Aldrich) 在0.01M HCl中的溶液。使试剂在室温反应15分钟, 然后将5 $\mu\text{L}$ 反应混合物注入到LC-MS上进行分析。

[0195] 结果表明, 对于金属 $^{232}\text{Th}^{4+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 和 $\text{In}^{3+}$ , 定量形成金属-ALG-DD-NCS络合物。LC-MS色谱图以及 $^{232}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS、 $\text{Fe}$ -ALG-DD-NCS和 $\text{In}$ -ALG-DD-NCS络合物的谱图如图1-6所示。

[0196] LC-MS条件如下: 在1.7 $\mu\text{m}$ , 2.1x 50mm Acquity UPLC BEH C18柱上, 在50 $^\circ\text{C}$ , 使用0.05%甲酸的 $\text{H}_2\text{O}$ 溶液作为流动相A和0.05%甲酸的乙腈作为流动相B进行分离。梯度组分和流速显示于表3。

[0197] 表3.

时间(分钟)	流速(mL/分钟)	%A	%B
0.0	0.6	95	5
2.0	0.6	95	5
9.0	0.8	40	60
9.1	0.8	10	90
10.0	0.8	10	90
10.1	0.8	95	5
11.4	0.8	95	5
11.5	0.6	95	5
12.0	0.6	95	5

[0198] 质谱分析在Xevo-ToF-1仪器上, 使用~450-1950Da的获取质量范围, 摩尔浓度ES<sup>+</sup>, 3.0kV毛细管, 超过1.000sec扫描使用20V的锥孔电压 (cone voltage) 进行。

[0200] 实施例6-与ALG1005-38的整合实验

[0201] 储备溶液通过将ALG1005-38 (实施例3中的10) 溶解于MeOH (LC-MS级) 至10mg/mL制备。10mg/mL的储备溶液使用MeOH和0.5M NaOAc-缓冲液 (pH 5.5) 按比例1:8:1稀释, 得到1mg/mL的ALG1005-38反应溶液。

[0202] 使用不同金属的整合反应通过混合1mg/mL反应溶液与选择的金属进行, 如实施例5所指示的, 而且,  $\text{GaCl}_3$  (无水珠99.99%, Aldrich) 溶解于0.01M HCl, 得到配体与金属的比

率为3:1至1:2。使试剂在室温反应10分钟。最后,用甲酸(0.1%)将反应混合物稀释10-倍,然后将5 $\mu$ L注入到LC-MS上用于分析。LC-MS分离和分析按照实施例5中所描述的进行,所不同的是锥孔电压为35V。

[0203] 结果表明,对于金属如 $^{232}\text{Th}^{4+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{In}^{3+}$ 和 $\text{Ga}^{3+}$ ,金属-ALG1005-38络合物以显著量形成。 $^{232}\text{Th}$ -ALG1005-38、 $\text{Fe}$ -ALG1005-38、 $\text{In}$ -ALG1005-38和 $\text{Ga}$ -ALG1005-38络合物的LC-MS色谱以及波谱如图7-14所示。

#### [0204] 实施例7-使用Bb-1-HOPO-1-DEBN的螯合实验

[0205] 储备溶液通过将Bb-1-HOPO-1-DEBN(在实施例4中制得)溶解于DMSO(Biotech等级溶剂99.8%)至1mg/mL而制备。螯合实验通过如实施例5所指示的,将1mg/mL溶液与 $^{232}\text{Th}$  0.01M HCl (Perkin Elmer)混合而进行。LC-MS分离和分析按照实施例6中描述的进行。结果表明,预期的 $^{232}\text{Th}$ -Bb-1-HOPO-1-DEBN络合物迅速形成,见图15和16。

[0206] 实施例8-ALG-DD-NCS与曲妥珠单抗的缀合,用钷-227标记缀合物,和确认保留的靶向结合。

#### [0207] 缀合

[0208] 使用药物等级的单克隆抗体曲妥珠单抗(赫塞汀(**Herceptin**)<sup>®</sup>,Roche)。抗体经缓冲液交换进入0.9%NaCl,达到6.3mg/mL的浓度。ALG-DD-NCS的储备溶液在DMSO中制备,包含1mg/mL(不考虑杂质)。将DMSO储备溶液添加到抗体溶液中,对应于螯合剂与抗体的摩尔比为6.5:1或更少。将0.07M硼砂溶液添加到反应溶液中,得到pH 9,然后在37 $^{\circ}$ C培养过夜。将所得缀合物纯化并在Amicon Ultra-4(30k MWC0)离心过滤器装置上进行缓冲液交换。将1mg溶于100 $\mu$ L 0.9%NaCl中的溶液的等份冷冻并储存于-18 $^{\circ}$ C直至使用。

#### [0209] 标记

[0210] 将100 $\mu$ L的0.5M NaOAc-缓冲液(pH 5.5)添加到1mg ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗缀合物的一个小瓶,得到适宜标记的pH。该溶液与4.2-16.4MBq $^{227}\text{Th}$ 在0.01M HCl中混合,用pH试纸检查pH。将Eppendorf管帽包在铝箔中,将管放入热混合器,在室温伴随温和混合达15分钟。

[0211] 在添加10 $\mu$ L饱和的DTPA到MF-H<sub>2</sub>O中之后,将管在室温进一步培养5分钟,意在捕获剩余的游离钷-227。所得产物在NAP-5柱上使用PBS纯化以洗脱标记的ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗缀合物,在柱上留下大多数的游离放射性核素(钷-227和子核素)和DTPA-钷螯合物。

[0212] 柱和洗脱的级分在HPGe-检测器GEM(15)上测量以确定产物的反应收率和特异活性。将产物级分无菌过滤并在4 $^{\circ}$ C储存过夜。

[0213] 产物级分的第二次NAP-5柱纯化在使用前进行。

#### [0214] 确定免疫反应性级分

[0215] SK-OV-3细胞(ATCC)在标准条件下培养。制备固定的SK-OV-3细胞并通过流式细胞计数法(flow cytometry)检查,之后才可用于确认表面上存在HER2(数据未显示)。常规培养基用McCoy's 5A培养基(GIBCO)添加的10%FBS(PAA)和1%Pen/Strep(BioChrom)制备。细胞的培养在CO<sub>2</sub>-培养箱中在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>中,使用T25(25cm<sup>2</sup>)和T75(75cm<sup>2</sup>)细胞瓶进行。

[0216] 各实验一式两份进行。使固定的SK-OV-3细胞悬浮在PBS中并转移至Eppendorf管(1000万个细胞/管)中。将非缀合的曲妥珠单抗(赫塞汀(**Herceptin**)<sup>®</sup>),10 $\mu$ L,来自储备溶液)添加到两个参照管中,在37 $^{\circ}$ C,阻断反应进行30分钟。将相等量的 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲

妥珠单抗(约500cpm)添加到各管中,然后在37°C培养2.5小时。样品用PBS稀释,然后离心并将上清液的一半转移至新的Eppendorf管。所有的管在Wizard gamma计数器上测量5分钟,钷-227的量通过应用<sup>227</sup>Th-规程确定。

[0217] 以%计的结合计算为: $100 * [(P+1/2S) - (1/2S)] / [(P+1/2S) + (1/2S)]$ ,其中P和S分别是在细胞沉淀物和上清液中测得的活性。对未阻断的样品进行计算以获得总结合(%),对阻断的样品进行计算以获得非特异性结合(%),IRF计算为:IRF(%)=总结合(%)-非特异性结合(%).

[0218] 总结在表4中的来自该质量控制的数据表明,<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗结合靶细胞。

[0219] 表4:在<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗批料A和B上进行的质量控制的结果,其随后分别用于实施例9和10中。

[0220]

	收 率 (%) <sup>i</sup>	回 收 (%) <sup>ii</sup>	特 异 性 活 性 (Bq/μg) <sup>iii</sup>	平 均 IRF (%) <sup>iv</sup>	平 均 总 结 合(%) <sup>iv</sup>	平 均 非 特 异 性 结 合(%) <sup>iv</sup>
批料 A	60	95	10 166	65	84	20
批料 B	64	92	2 700	60	74	15

[0221] i. 收率(%) 在反应混合物的NAP-5纯化之后计算。

[0222] ii 回收(%) 在产物级分的新NAP-5纯化之后计算。

[0223] iii. 特异性活性(Bq/μg) 使用产物级分中发现的<sup>227</sup>Th(Bq) 的量计算,所述产物级分按照用于反应混合物的ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(μg) 的量划分。

[0224] iv. IRF根据标准规程评价。

[0225] 实施例9-钷-227标记的ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗的体内稳定性和功效研究

[0226] 评价时间与结合的关系

[0227] 通过在7天的期间内测量与SK-OV-3细胞沉淀物有关的<sup>227</sup>Th-活性的量,评价<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗构建体结合于SK-OV-3细胞的稳定性。将该结果与用游离<sup>227</sup>Th培养之后获得的数据比较。

[0228] SK-OV-3细胞按照实施例8中描述的培养,该细胞最初用700kBq<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗或700kBq游离<sup>227</sup>Th处理,在1小时培养(HPGe-检测器GEM(50))之后在细胞沉淀物上分别得到77kBq(11%)和7kBq(1%)的<sup>227</sup>Th-活性。SK-OV-3细胞上的<sup>227</sup>Th-活性每日使用Wizard gamma计数器测量(<sup>227</sup>Th-规程)。针对衰变校正测量的放射性活性。图17中显示的结果表明,在1小时之后细胞沉淀物中残余的活性在接下来的7天中仅损失20%。相反,用游离<sup>227</sup>Th处理的细胞仅结合小部分的增加的活性,在之后的24小时中它的大部分损失(约95%)。因此,不存在游离<sup>227</sup>Th与SK-OV-3细胞的特异性结合,而<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗有效地保留。

[0229] 细胞毒性的评价

[0230] 对肿瘤细胞的影响在两个补充试验中研究。在第一个实验中,细胞中的代谢活性使用结合于ATP分子的荧光试剂测量。因此,减少的荧光信号表明代谢活性损失。在第二个实验中,计数形成的克隆的数目。

[0231] 每日测量荧光,共进行9天,将来自暴露于 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗的结果与分别暴露于曲妥珠单抗和游离 $^{227}\text{Th}$ 的SK-OV-3细胞的荧光进行比较。在常规培养基中生长的SK-OV-3细胞用作对照。

[0232] 在第0天,将35mL在常规培养基中的500000个SK-OV-3细胞/mL转移至4个T75细胞瓶中。这些细胞瓶用于制备以下样品溶液:(1) 常规培养基,(2) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗,(3) 20kBq/mL  $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(10166Bq/ $\mu\text{g}$ ),(4) 20kBq/mL游离 $^{227}\text{Th}$ 。将细胞瓶放在 $\text{CO}_2$ -培养箱中培养1小时。丢弃上清液,用0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液使细胞消化,用常规培养基洗涤并离心。使细胞沉淀物悬浮在新鲜常规培养基中并在Wizard gamma计数器( $^{227}\text{Th}$ -规程)上测量。将各培养溶液分配到7个新的T25细胞瓶中,并在 $\text{CO}_2$ -培养箱中培养。

[0233] 在第1天和第2天丢弃来自四个样品溶液中每一个细胞瓶的上清液。细胞沉淀物在第0天制备,放射性活性在Wizard gamma计数器( $^{227}\text{Th}$ -规程)上和HPGe-检测器GEM(50)上测量。所有的样品在常规培养基中稀释4倍,将5x 100 $\mu\text{L}$ 的各细胞悬浮液转移进96孔View plate板的5个孔中。为测量背景荧光,在五个孔中添加100 $\mu\text{L}$ 常规培养基(不含细胞)。最后,将100 $\mu\text{L}$ 的Cell Titer-Glo Reagent添加到各孔中,溶液在回旋振荡器(orbital shaker)上混合以诱导细胞裂解。使荧光信号在室温稳定10分钟,然后使用LUM-单个程序在Envision多板读数器上测量荧光三次。

[0234] 在第3天制备细胞并在Wizard gamma计数器和Envision多板读数器上测量,如针对第1-2天所描述的。然后,由于密集的生长而稀释各细胞悬浮液;将3/4的细胞悬浮液转移至新的T75细胞瓶,添加常规培养基并在 $\text{CO}_2$ -培养箱中培养过夜。

[0235] 在第4-9天的每一天用0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液使四个T75细胞瓶消化,用常规培养基洗涤并离心。细胞沉淀物在常规培养基中稀释4倍,并取出100 $\mu\text{L}$ 部分,按照以上进行测量。然后,将3/4的细胞悬浮液在常规培养基中稀释,将其转移至新的T75细胞瓶并在 $\text{CO}_2$ -培养箱中培养过夜。

[0236] 图18显示在用 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗(10166Bq/ $\mu\text{g}$ )、曲妥珠单抗和游离 $^{227}\text{Th}$ 处理的SK-OV-3细胞上的荧光测量,将其标准化成为从常规培养基中生长的SK-OV-3细胞(对照)获得的荧光值。用 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗处理的SK-OV-3细胞的荧光信号从第1天到第9天逐渐下降,而其它处理显示在该期间内几乎恒定的荧光信号和生长。用 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗处理的SK-OV-3细胞的代谢活性随时间降低,在第9天几乎所有的细胞都死亡。该结果表明 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗的显著和持续的细胞毒性作用。

[0237] 进行克隆形成测定以评价在使单细胞暴露于潜在的毒性条件之后的细胞克隆生长。SK-OV-3细胞在不同浓度的 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗、曲妥珠单抗或游离 $^{227}\text{Th}$ 中培养1小时,然后培养12天以诱导克隆生长。

[0238] 细胞的制备按照以上进行,在各样品中,将在5mL常规培养基中的12000个细胞转移至T25细胞瓶。研究各试剂的3个含量的影响,对于 $^{227}\text{Th}$ -ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗和 $^{227}\text{Th}$ 分别为5、10和20kBq/mL,对于曲妥珠单抗分别为5、10和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (最终浓度)。制备一个对照细胞瓶。所有的10个T25细胞瓶在 $\text{CO}_2$ -培养箱培养1小时。丢弃上清液,将细胞用常规培养基洗涤,用0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液使细胞消化,用常规培养基洗涤并离心。使细胞沉淀物悬浮在常规培养基中,将十个细胞悬浮液的每一个分装在6个新的T25细胞瓶中;3个细胞瓶

中有1000细胞和3个细胞瓶中有3000细胞。所得60个T25细胞瓶在CO<sub>2</sub>-培养箱中培养,直至克隆达到可见的大小(约50个细胞/克隆)。在培养12天之后,移除培养基。将细胞用PBS洗涤,用乙醇固定,用0.25%台盼蓝在PBS中的溶液染色,用自来水洗涤并最终在45°C干燥过夜。手动计数克隆,将各培养溶液中克隆的平均数绘制成图。

[0239] 图19和20中显示的结果表明,用<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗培养1小时有效地杀死SK-OV-3细胞。用游离<sup>227</sup>Th培养可能具有一定的细胞杀灭效应,但在使用较大量的细胞的第一个细胞毒性试验中不明显。用曲妥珠单抗培养对细胞生长没有负面影响。

#### [0240] 实施例10-钍-227标记的ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗的体内肿瘤靶向

[0241] 将100μL (15kBq) 无菌过滤的<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗 (2700Bq/μg) 注射到十只具有SK-OV-3异种移植的Balb/c裸鼠的尾部侧面静脉中。在24小时之后处死5只小鼠,在4天之后处死另外5只小鼠,切离感兴趣的器官并称量。所有的样品和3个包含10%ID/g的标准溶液在Wizard gamma计数器(<sup>227</sup>Th-规程)上测量5分钟。结果表示为%注射的剂量/克组织(%ID/g)。

[0242] 图21中所示的结果支持,<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗特异性结合于肿瘤。吸收值是中等的,但是在24小时和4天之间吸收有所增加(为8.7%ID/g至11.3%ID/g),同时血液中的浓度降至约1%ID/g。

[0243] 在头骨和股骨中的吸收在24小时和4天之间也有所增加,但是这些值通常较低(2.8-3.2%,24小时),表明在系统中极少的游离<sup>227</sup>Th循环,因此意味着<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗络合物的高度稳定性。该结论的进一步支持是下述情形的高可能性:在头骨和股骨中测得的活性分率是由子核素<sup>223</sup>Ra的吸收引起的。该<sup>223</sup>Ra的一些可以在Wizard gamma计数器上进行的在针对<sup>227</sup>Th-测量指定的选通窗口内检测,因此头骨和股骨的计算的%ID/g-值可能是对在这些组织中积累的<sup>227</sup>Th-ALG-DD-NCS-曲妥珠单抗的量的过高评估。

#### [0244] 实施例11-制备螯合部分

[0245] 制备3-苄氧基-1-甲基-4-(2-硫代噻唑烷-1-基)羧基-2(1H)-吡啶酮(结构A)。

[0246] 步骤1):1-甲基-3-羟基-2(1H)-吡啶酮:

[0247] 将3-羟基-2(1H)-吡啶酮(34.44g,0.31mol)和碘甲烷(75g,0.53mol)放在80mL盖帽的Teflon容器中,并在Parr弹状储气瓶(Parr bomb)中加热至150°C保持约48-60小时。打开冷却的弹状储气瓶,轻轻倒出过量的碘甲烷。将所得的深色稠油与亚硫酸钠(64g,0.5mol)混合并溶解于300mL水以形成浅棕色溶液。将溶液中和至pH 7-8并过滤以移除不溶的杂质。然后滤液用二氯甲烷(4x100mL)萃取。然后干燥合并的萃取物,施用至快速硅胶填料(6cm.x 8cm)并用4%甲醇的二氯甲烷溶液的溶液洗脱。移除溶剂,得到作为无色晶体的标题化合物(24.3g,62.6%)。

[0248] 步骤2:4-羧基-1-甲基-3-羟基-2(1H)-吡啶酮

[0249] 将1-甲基-3-羟基-2(1H)-吡啶酮(1)(6.25g,50mmol)与无水碳酸钾(36g,0.26mol)混合并真空干燥。然后将混合物加热至175-185°C并在Parr弹状储气瓶中在干燥二氧化碳气体(850psi)下保持3天。打开冷却的弹状储气瓶,将所得浅黄色固体溶解于结冰的水中并用6N HCl酸化,得到米色结晶产物。

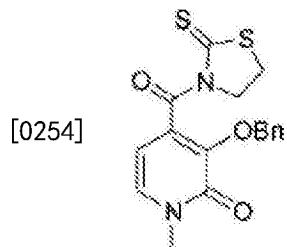
[0250] 步骤3:3-苄氧基-4-羧基-1-甲基-2(1H)-吡啶酮

[0251] 4-羧基-1-甲基-3-羟基-2(1H)-吡啶酮(6.8g,0.04mol)与苄基氯(12.1g,

0.088mol) 和无水碳酸钾 (13.8g, 0.1mol) 在无水二甲基甲酰胺 (DMF) (120mL) 中混合。在氮气下在黑暗中将混合物加热至 75–80 °C 并保持 16 小时。然后过滤所得混合物, 蒸发溶剂得到深色油状物。所述油状物通过施用至硅胶填料 (6cm. x 8cm) 纯化并用 4% 甲醇的二氯甲烷溶液的溶液洗脱, 得到浅黄色稠油状的 3-苄氧基-4-苄氧基羰基-1-甲基-2 (1H)-吡啶酮。将其溶解于甲醇 (50mL) 和 6M NaOH 溶液 (10mL), 将混合物在室温搅拌 4 小时, 然后蒸发至干燥。将剩余物溶解于水 (100mL), 用 6M HCl 溶液酸化至 pH 为 2, 得到作为白色结晶产物的标题化合物 (9.3g 88.7%)。

[0252] 步骤 4: 3-苄氧基-1-甲基-4-(2-硫代噻唑烷-1-基) 羰基-2 (1H)-吡啶酮

[0253] 向 3-苄氧基-4-羰基-1-甲基-2 (1H)-吡啶酮 (1.05g, 4mmol)、2-巯基噻唑啉 (0.50g, 4.2mmol) 和催化量的 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 在无水二氯甲烷 (50mL) 中的溶液中, 添加 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) (0.86g, 4.2mmol)。在搅拌 4 小时之后, 通过过滤移除二环己基脲 (DCU) 固体。然后将黄色滤液旋转蒸发得到黄色固体。从异丙醇-二氯甲烷结晶得到作为淡黄色结晶片的标题化合物 (结构 A, 1.16g, 80.4%)。

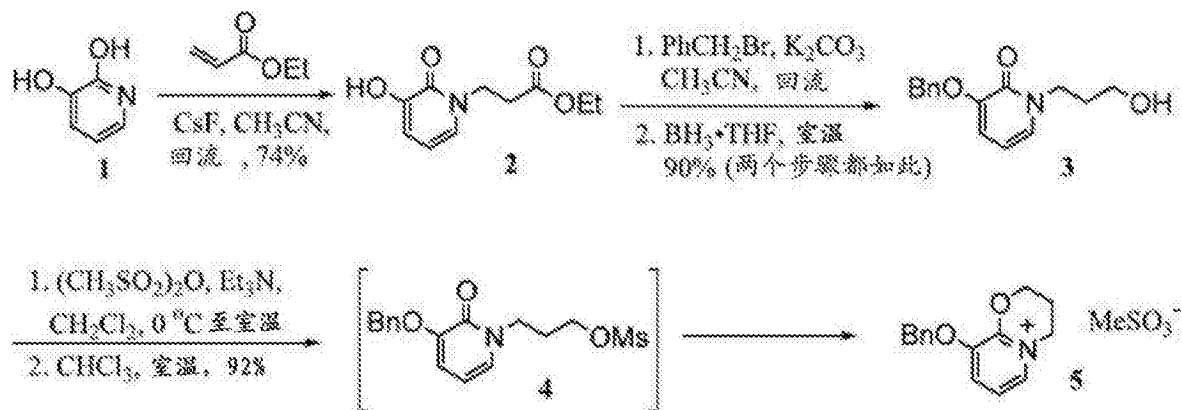


[0255] 结构 A

[0256] 实施例 12-制备式 VIII 的 3,2-HOPO 前体

[0257] 环状盐 (结构 5) 的制备根据以下方程式进行:

[0258]



[0259] 2,3-二羟基吡啶 (2,3-DHP) 1 与丙烯酸乙酯在回流的乙腈中借助氟化铯 (10mol%) 的 Michael 反应以良好收率得到相应酯 2。之后进行 2 的 O-苄基化 (使用标准条件 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/乙腈/回流), 然后还原酯部分 (BH<sub>3</sub>·THF, 室温) 在色谱法之后以 90% 收率得到醇 3。用甲磺酸酐的二氯甲烷溶液在三乙胺存在下处理醇 3 使得直接形成所需环状盐 5 (~85-90%) 以及一些中间体甲磺酸酯 4 (~10-15%), 如通过 <sup>1</sup>H NMR 波谱分析所确定。环状盐 5 的完全转化可以通过在氯仿中在室温搅拌粗产物混合物由甲磺酰化实现。在用热乙酸乙酯研磨之后, 盐 5 以 92% 的收率以高纯度作为浅白色固体分离。

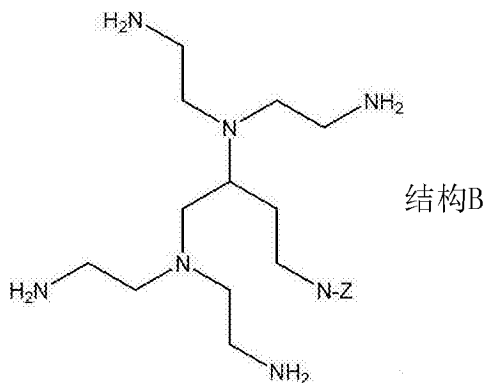
[0260] 实施例 13-制备式 VIII 的化合物

[0261] 将盐5 (0.2g) 添加到1.2当量的环烯 (1,4,7,10-四氮杂环十二烷) 在存在三乙胺的乙腈 (3ml) 中的溶液并在60°C在氮气下加热2天。然后反应用二氯甲烷 (50ml) 稀释并用饱和 NaHCO<sub>3</sub> (50ml) 洗涤。水层用二氯甲烷 (25ml) 再次萃取。合并的有机相萃取物用硫酸钠干燥, 真空移除溶剂, 过量的N-甲基苄胺经真空蒸馏移除, 得到VIII。

[0262] 实施例14-制备式IX的化合物

[0263] 向3-苄氧基-1-甲基-4-(2-硫代噻唑烷-1-基) 羰基-2 (1H) -吡啶酮在二氯甲烷中的溶液中添加相应官能化的N,N',N'',N'''-四(2-氨基乙基) 乙二胺 (结构B, Z是保护基团)。在搅拌4小时之后, 过滤混合物并使其干燥。

[0264]



[0265] 在快速硅胶柱上用丙醇的二氯甲烷溶液将适当的苄基-保护的前体产物从反应混合物中分离。在羟基的酸性脱保护之后, 得到具有结构IX的最终产物。

[0266] 实施例15

[0267] 使用本领域技术人员已知的标准方法使结构VIII缀合于靶向分子。例如, 将制备 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯并使用标准条件使其缀合于蛋白质和肽, 所得缀合的蛋白质将使用凝胶过滤分离。

[0268] 实施例16

[0269] 缀合蛋白质的钆-227标记

[0270] 10mg/mL缀合蛋白质 (具有通过偶联部分附接的八齿配体) 的溶液将在适当的缓冲液溶液, 例如0.5M NaOAc-缓冲液 (pH 5.5) 中制备, 并用纯化的钆-227在25°C标记1小时, 然后在硅胶过滤柱上进行纯化步骤。

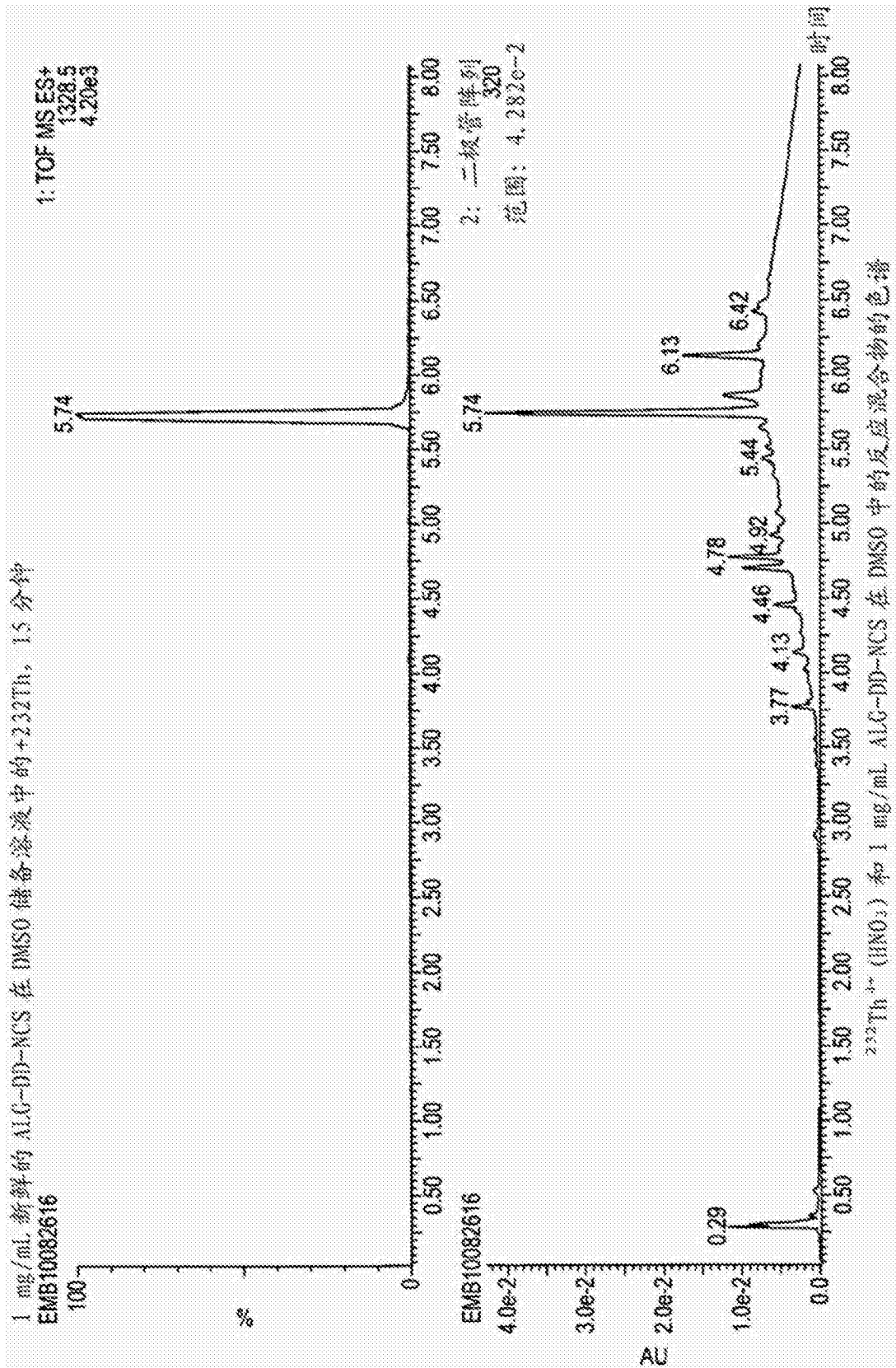


图1

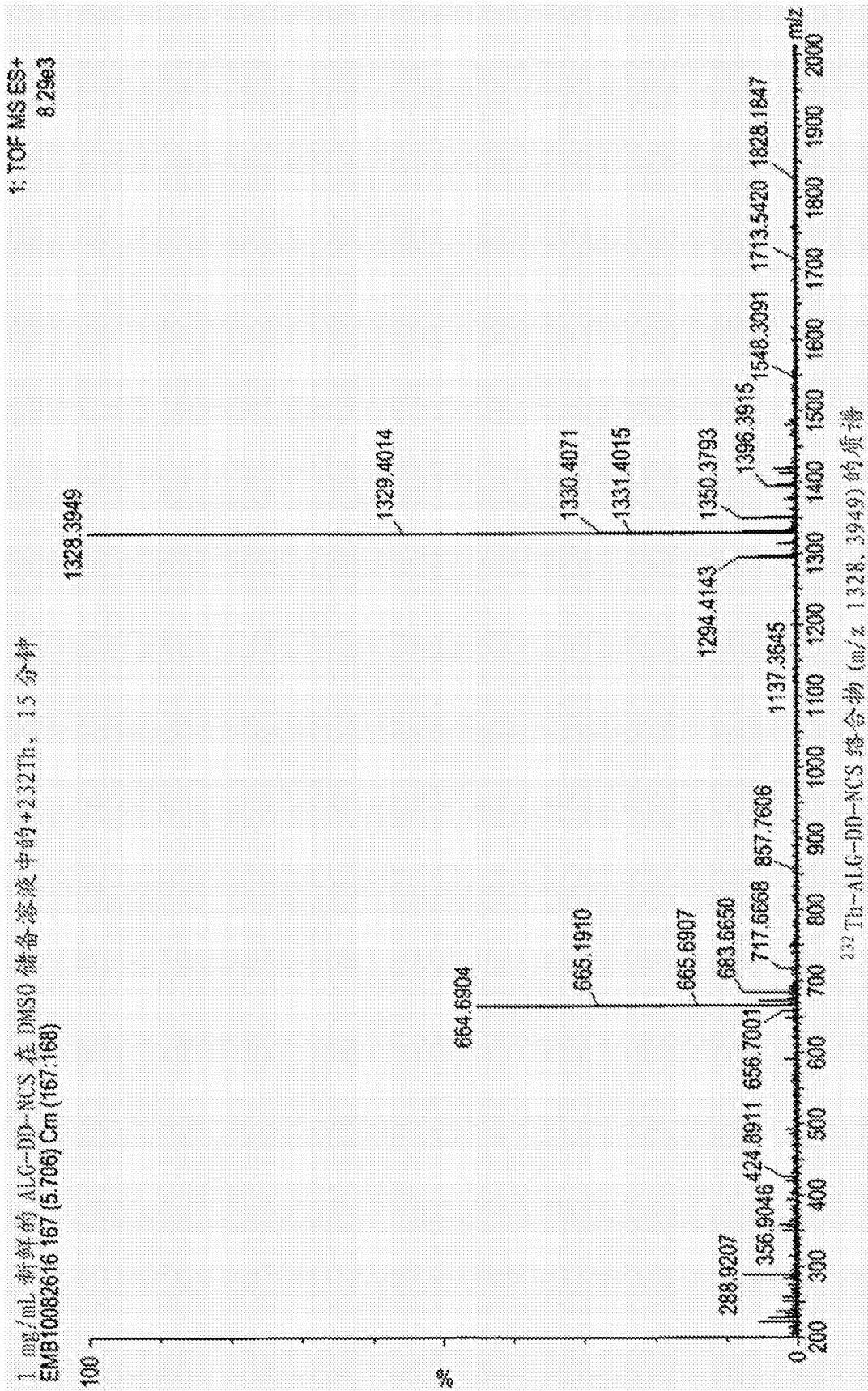


图2

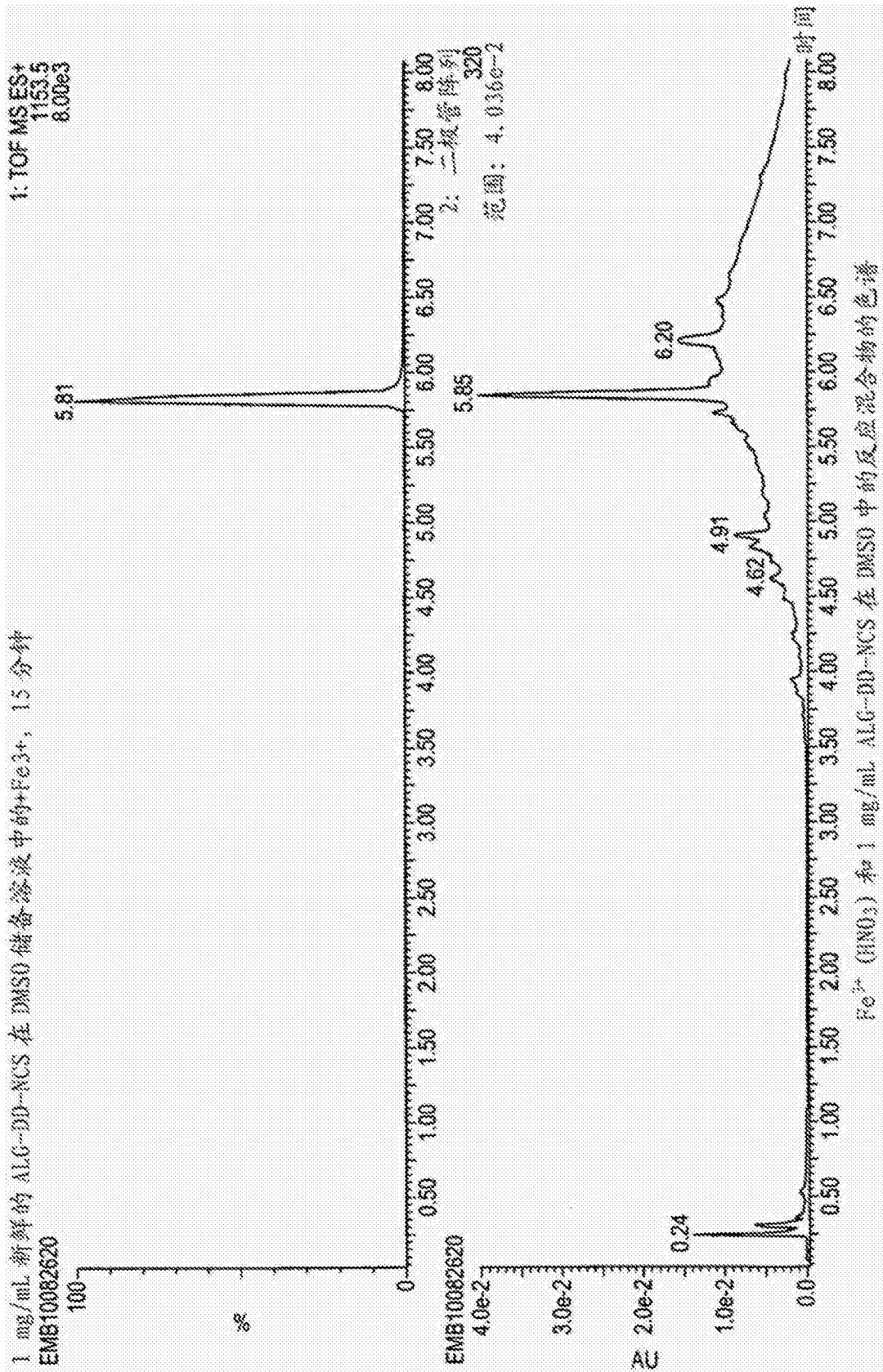


图3

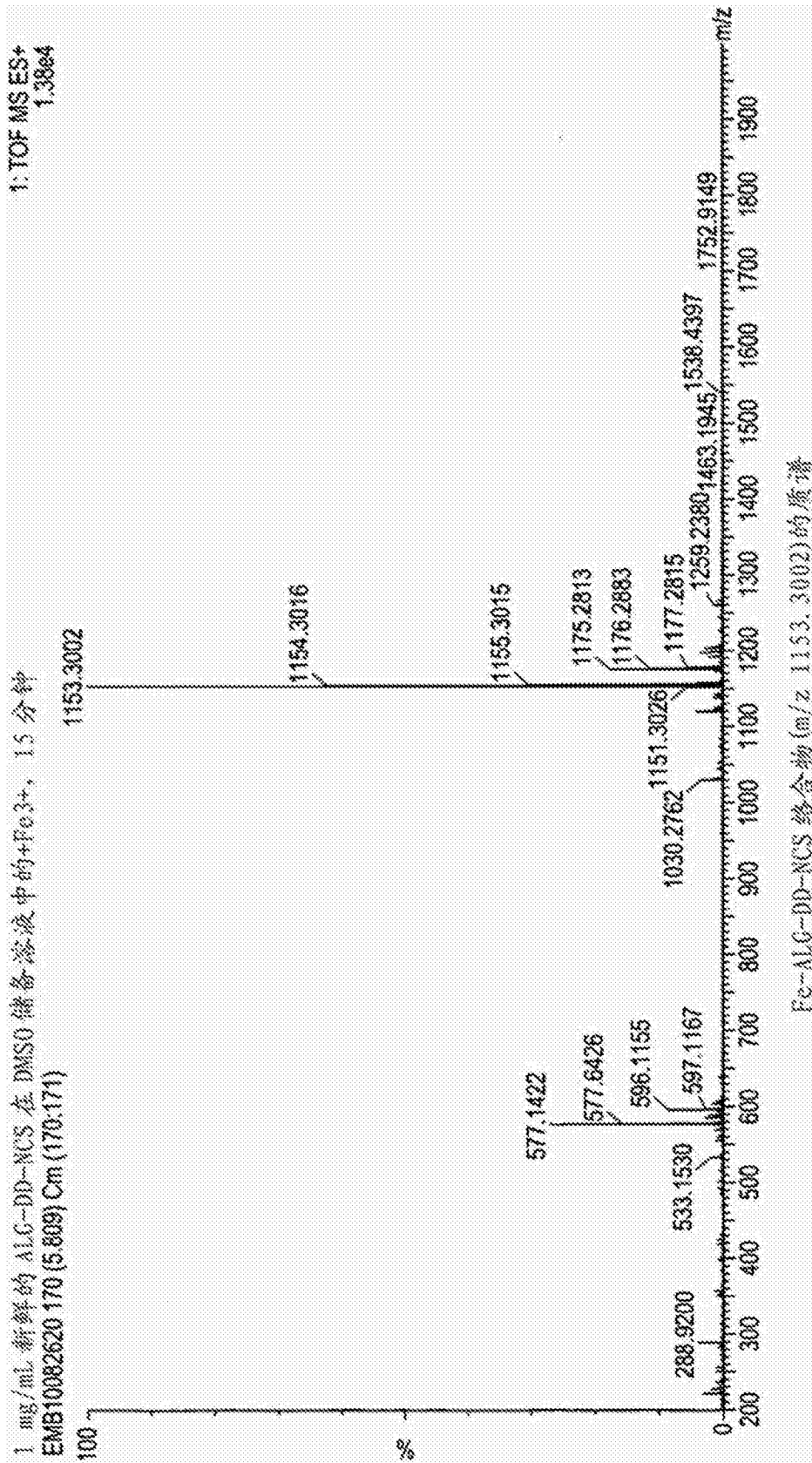


图4

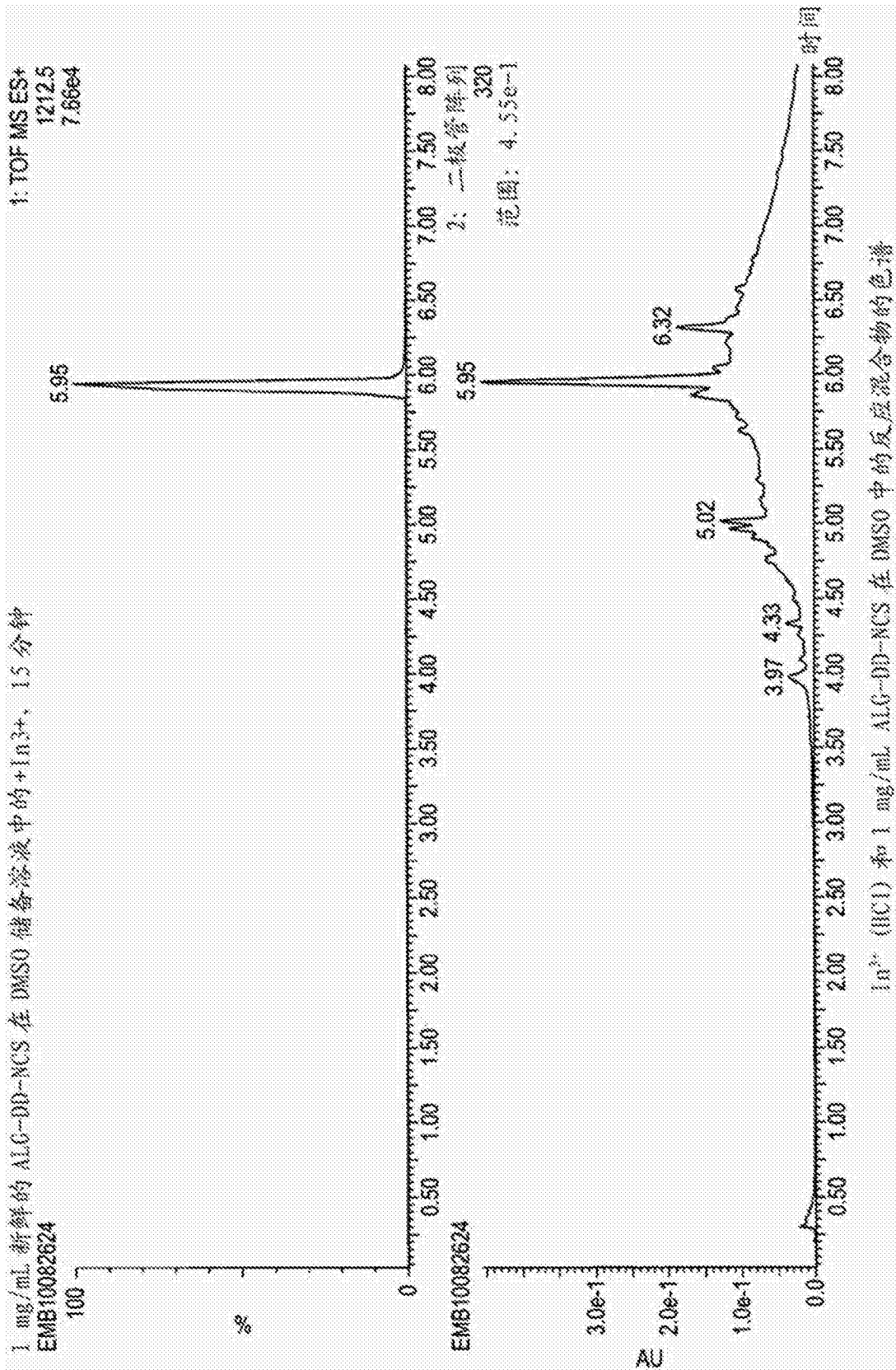


图5

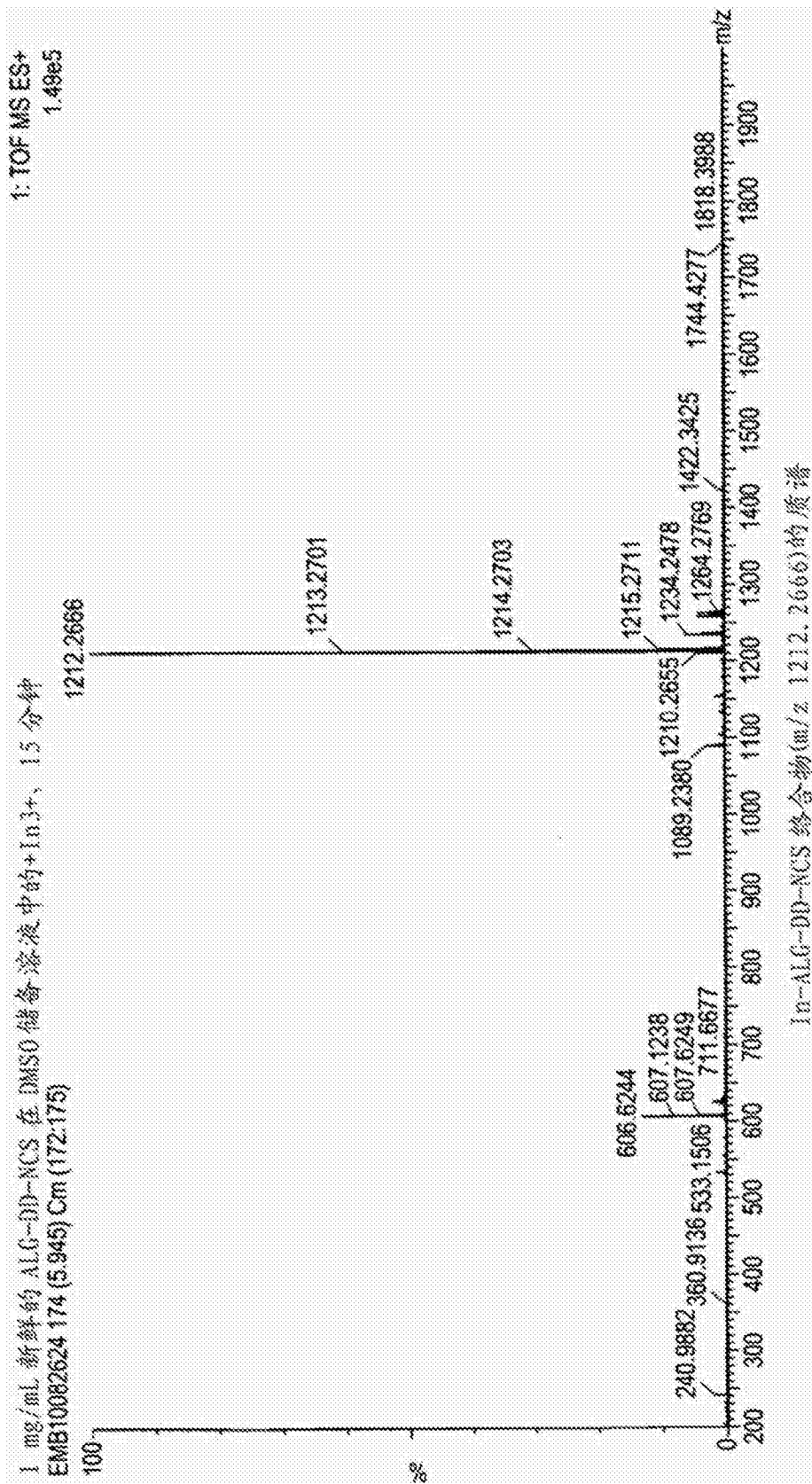


图6

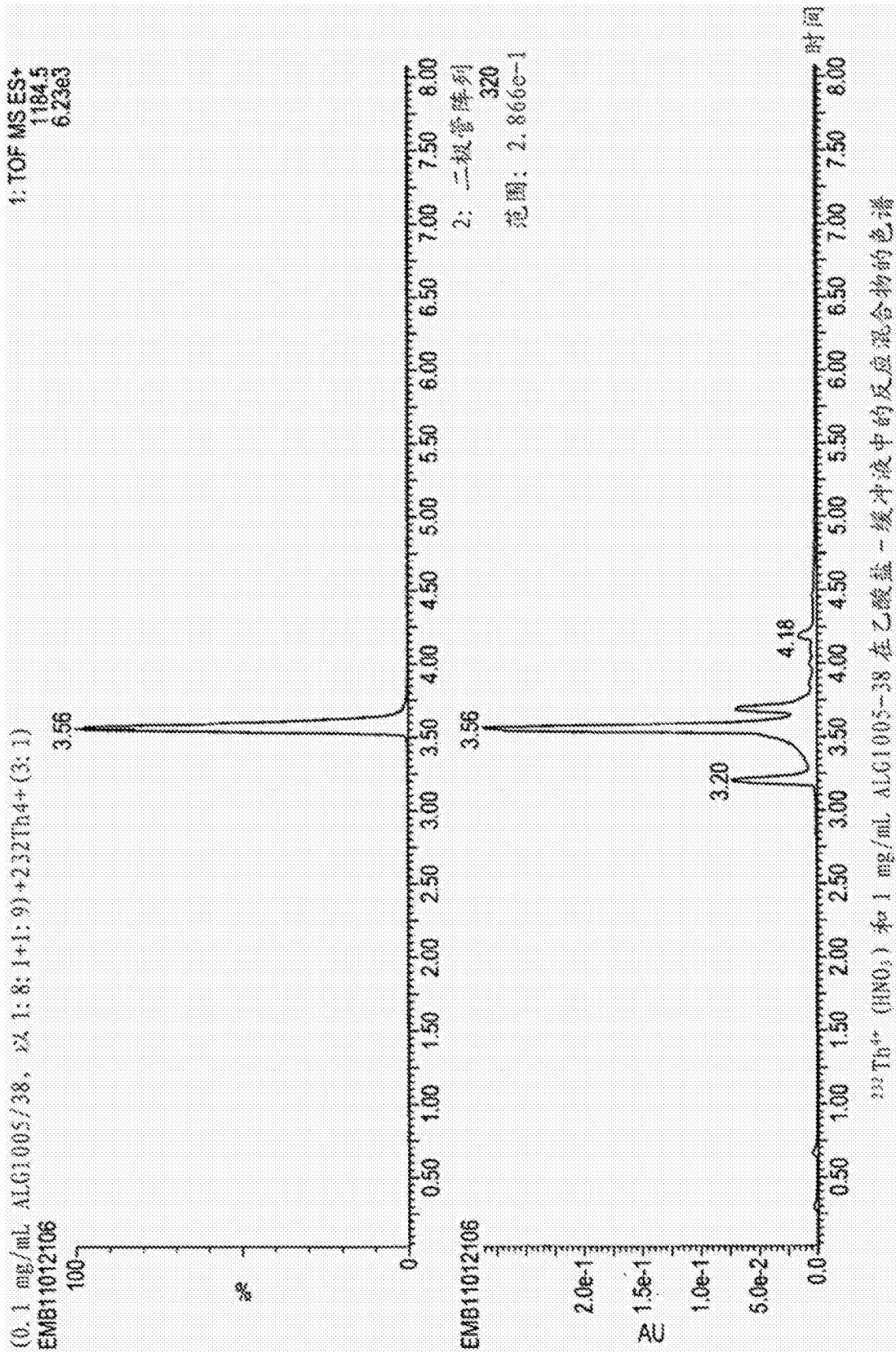


图7

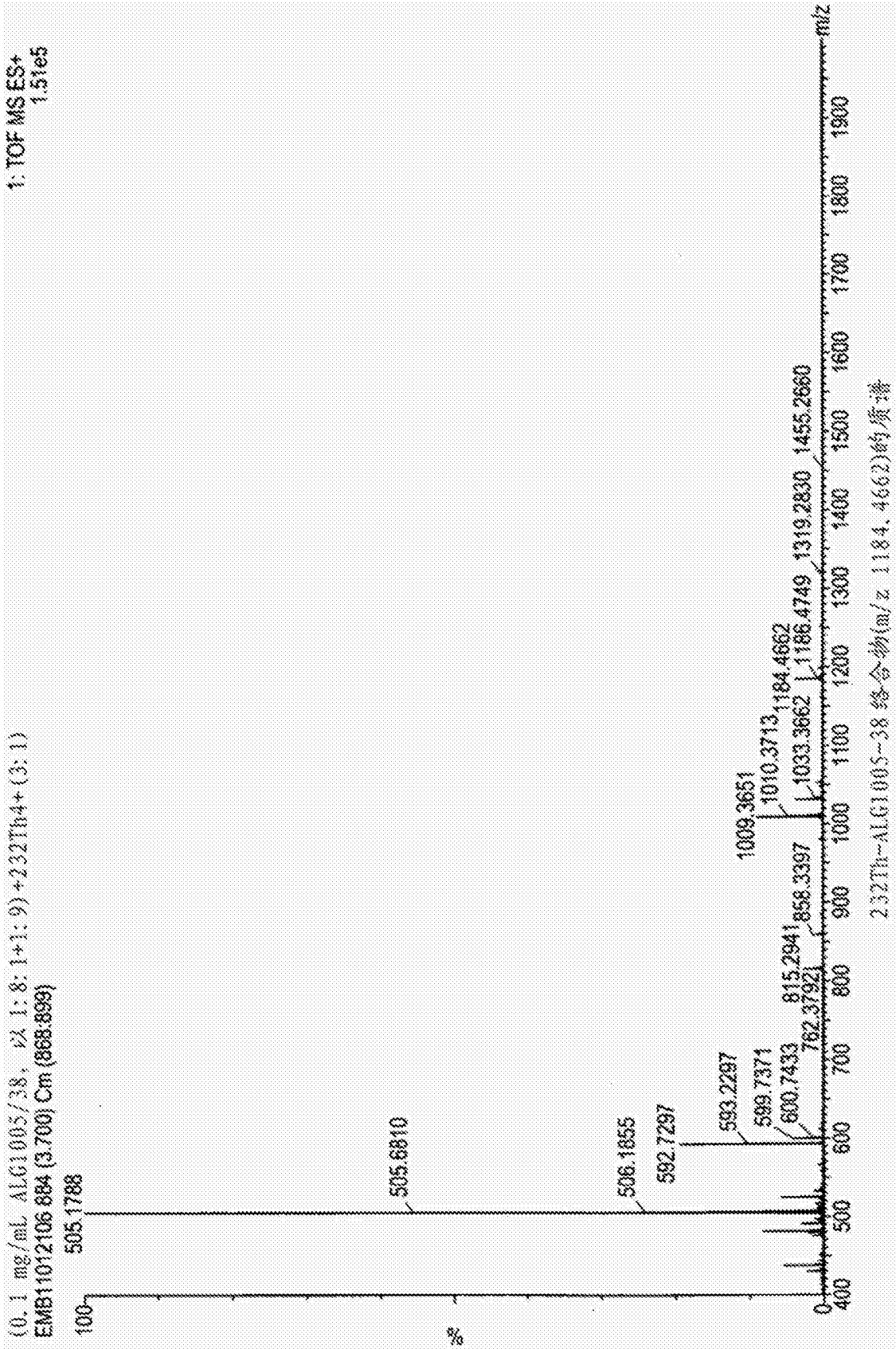


图8

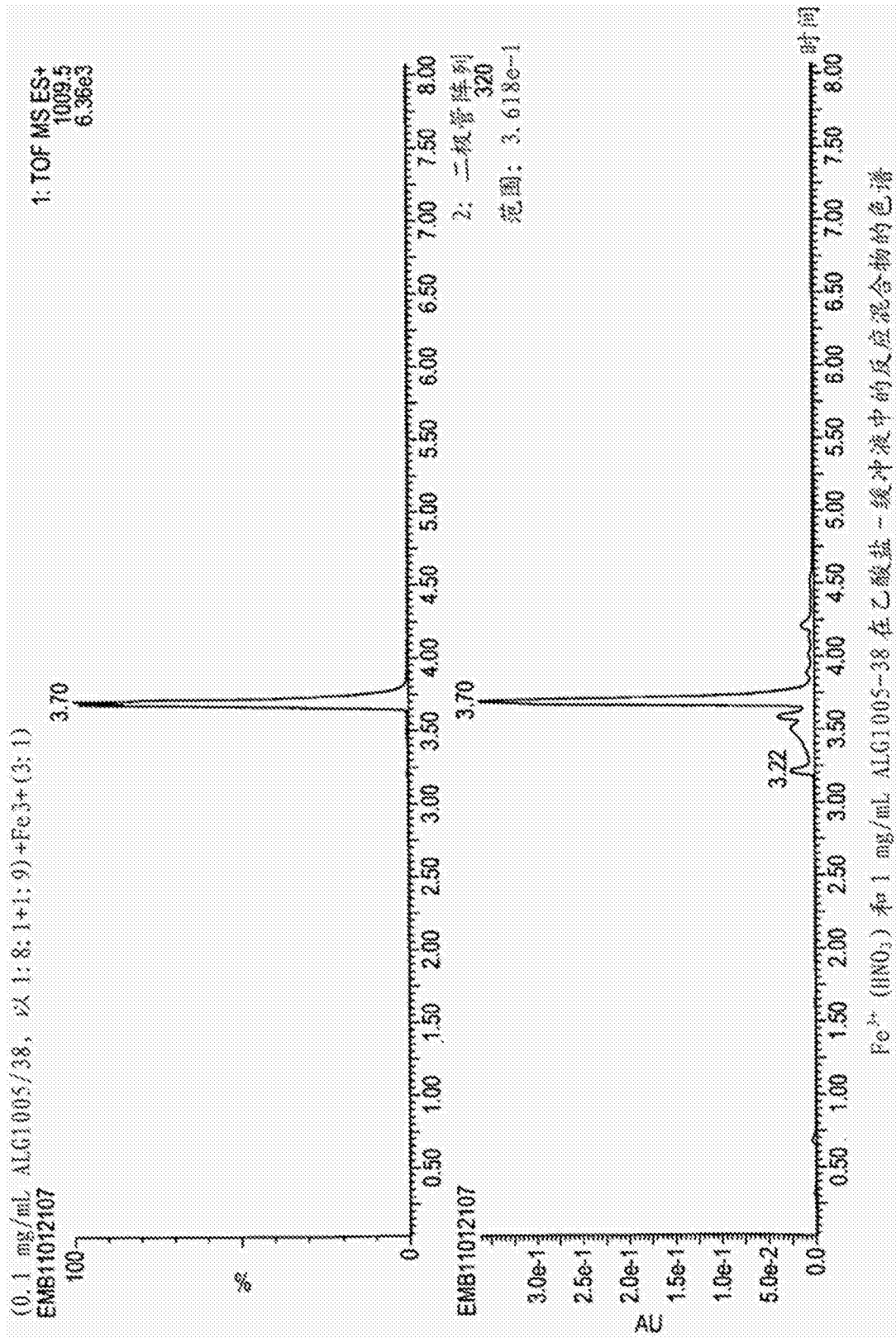


图9

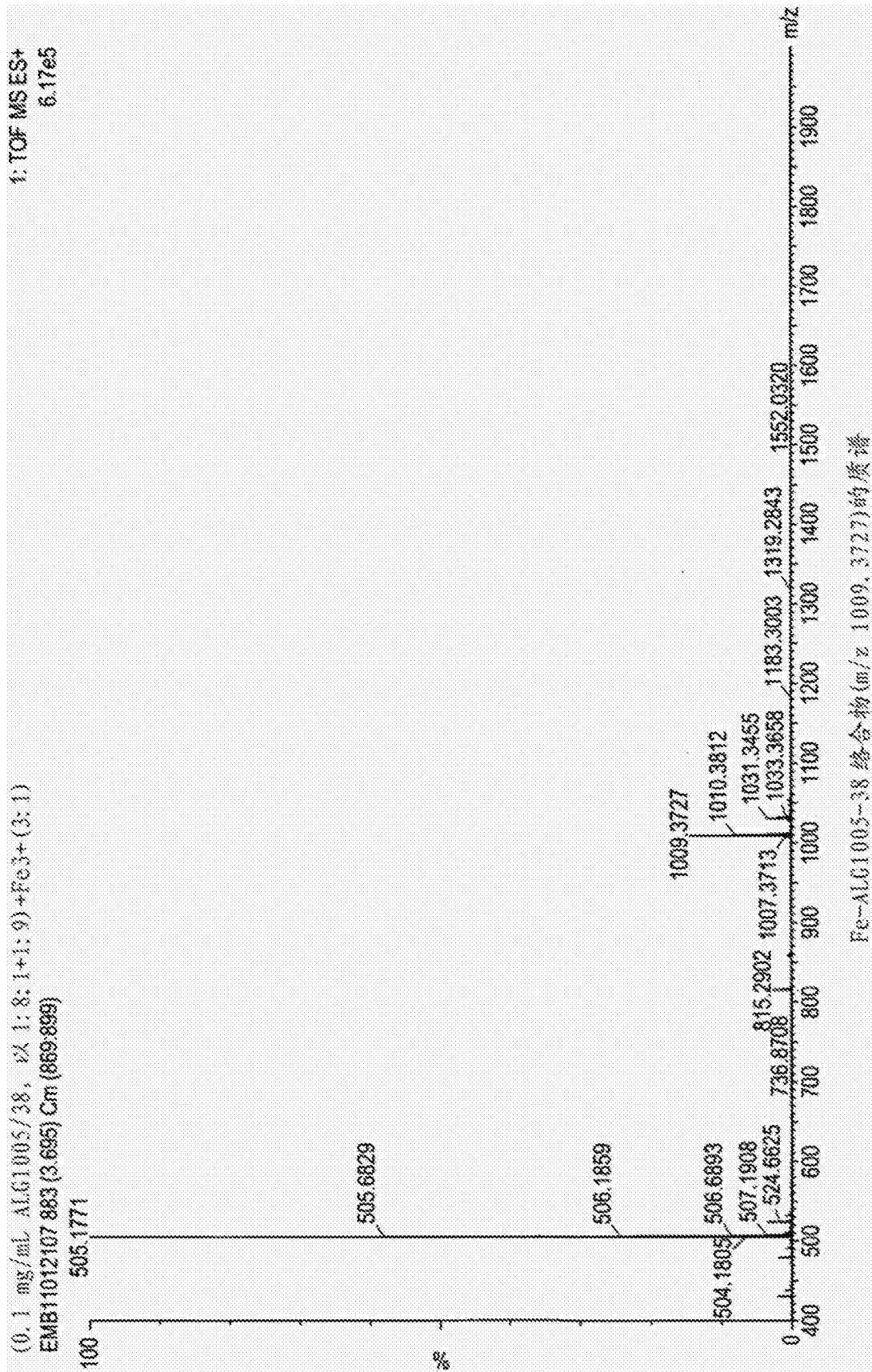


图10

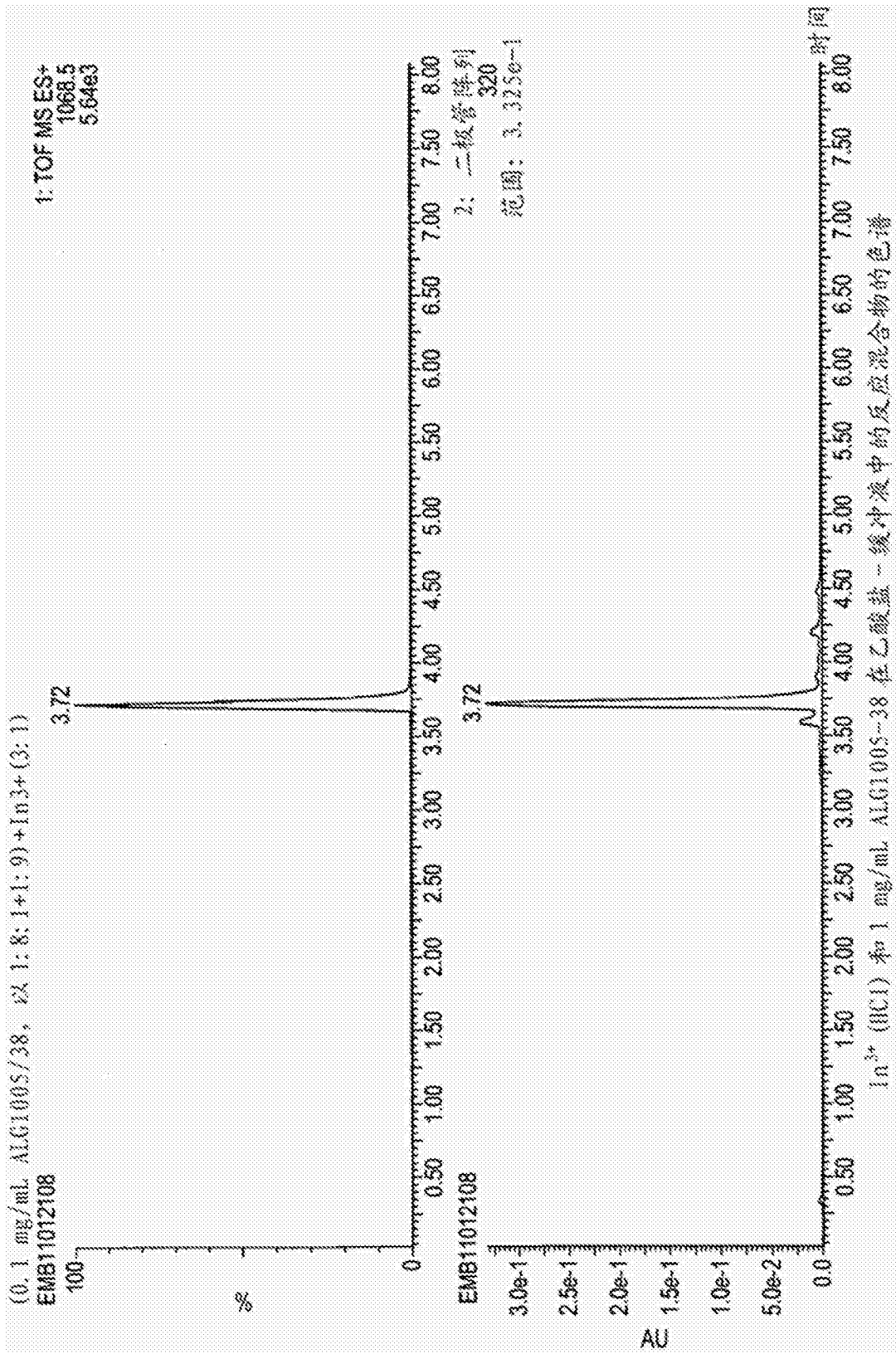


图11

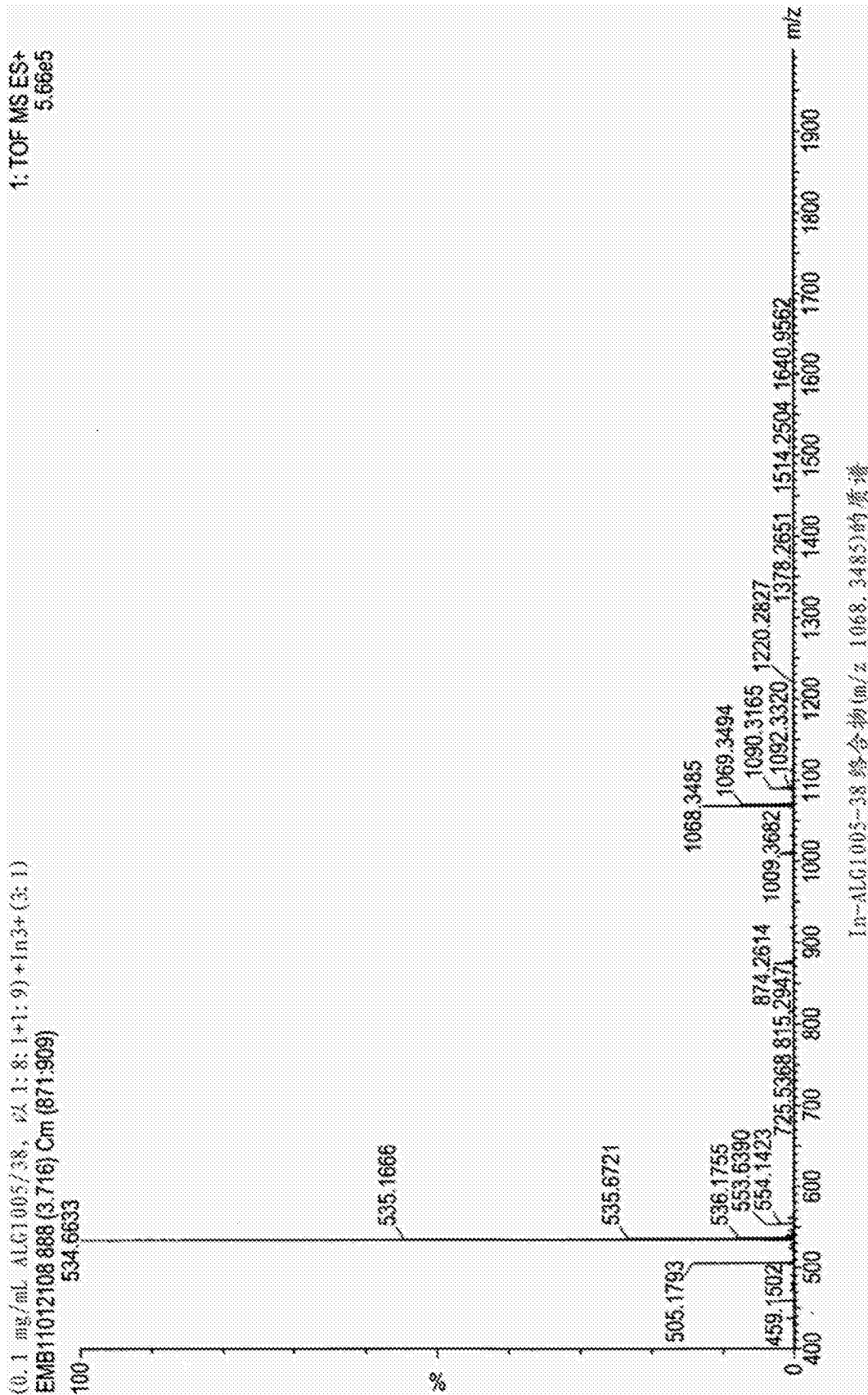


图12

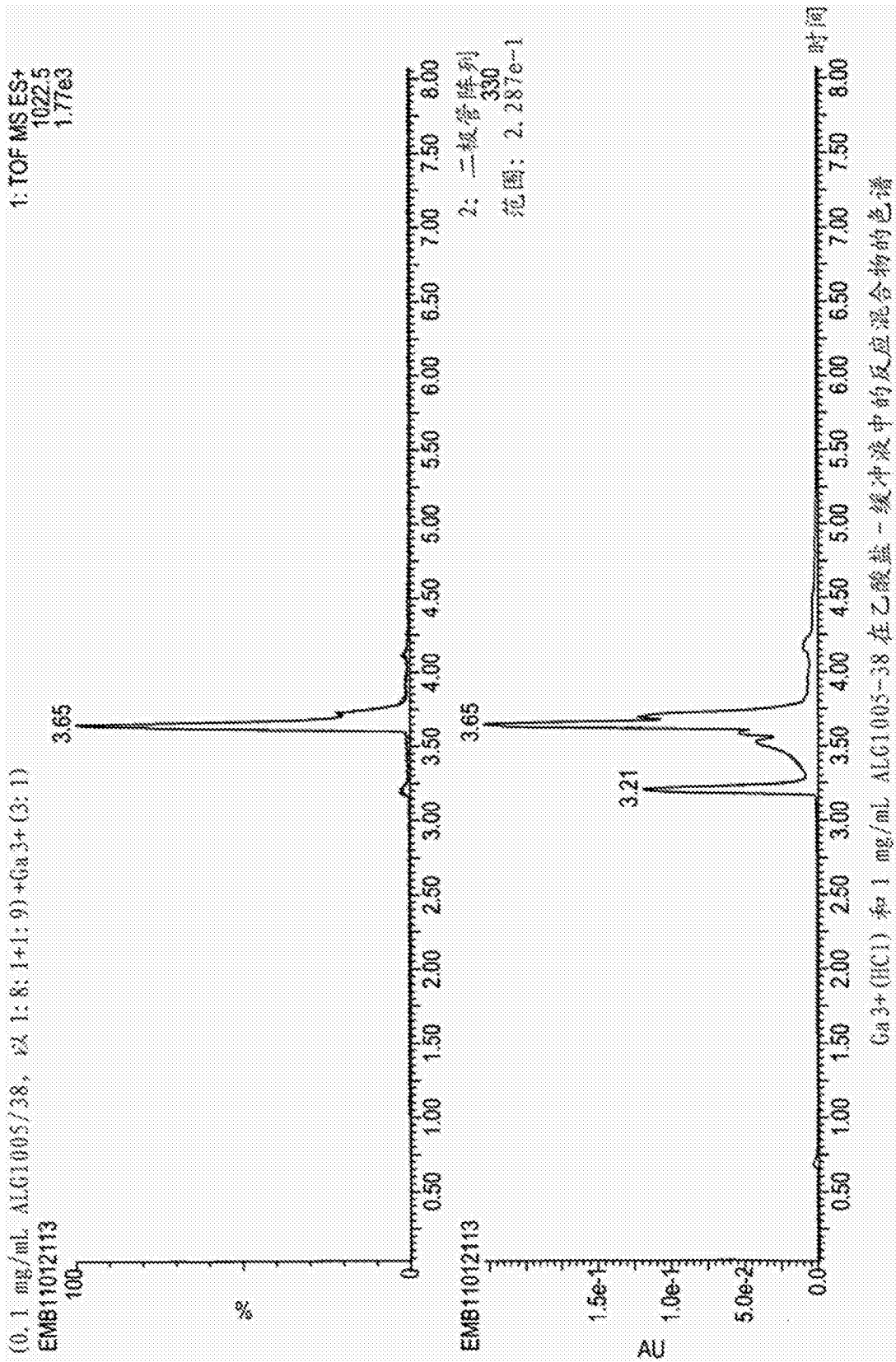


图13

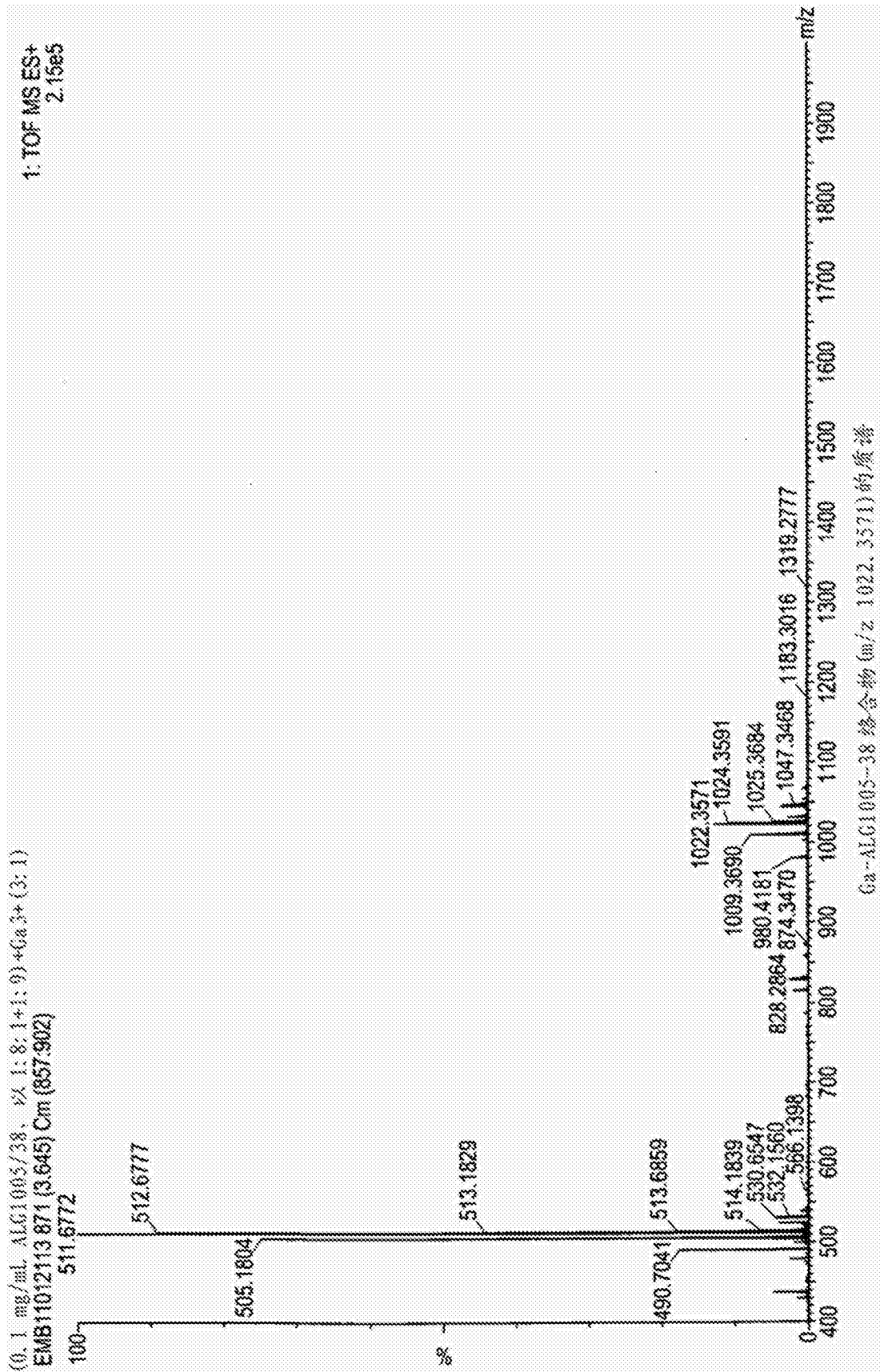


图14

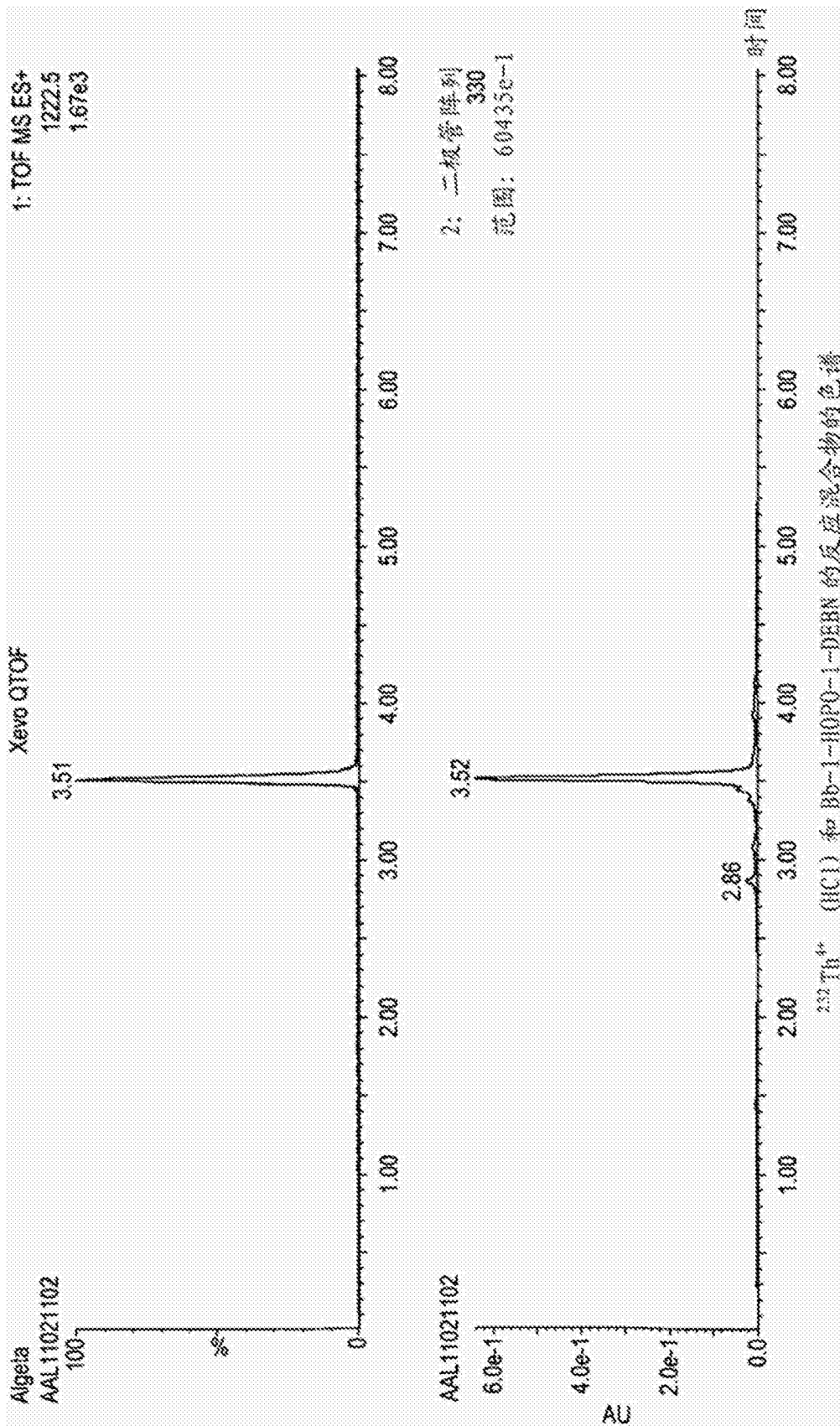


图15

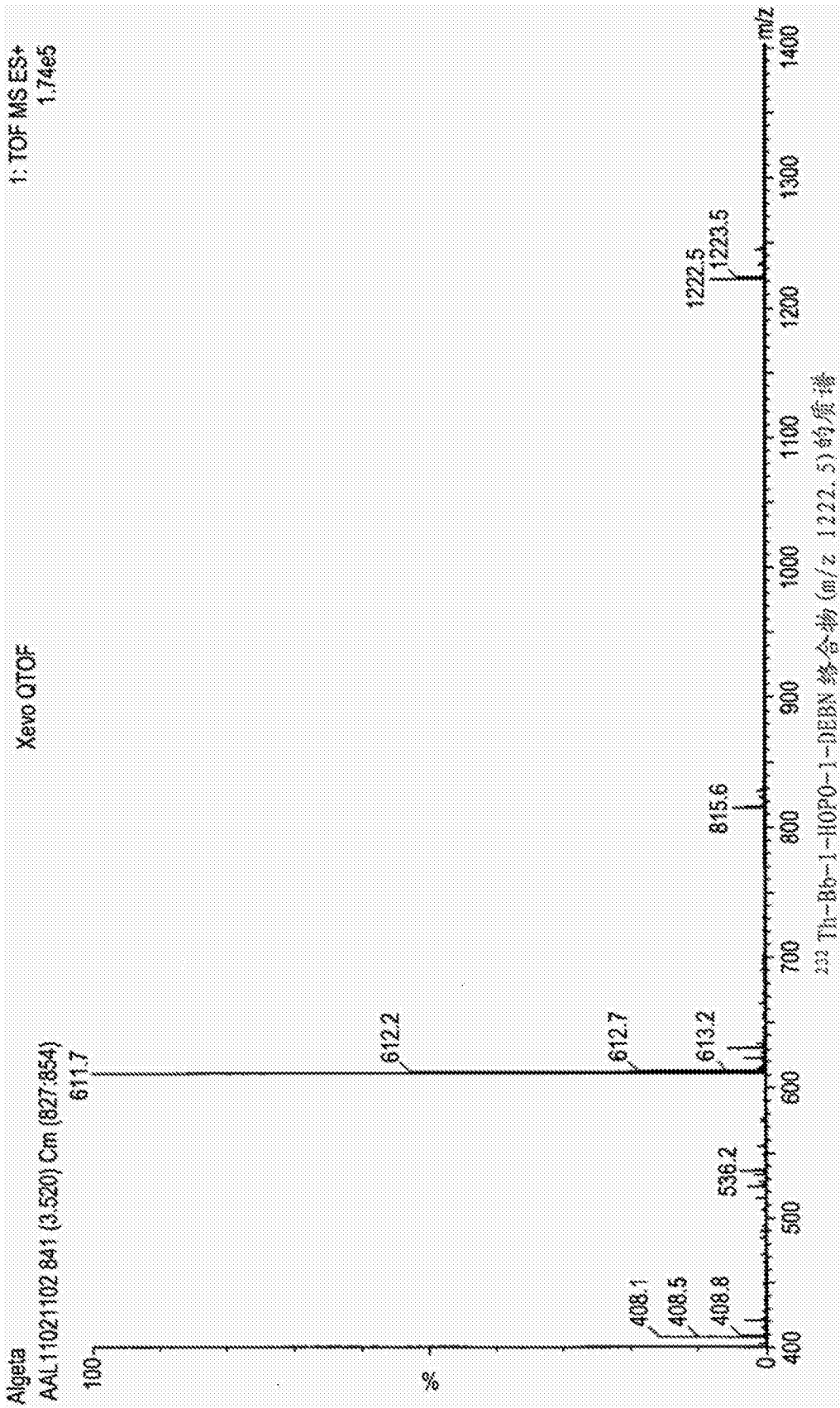


图16

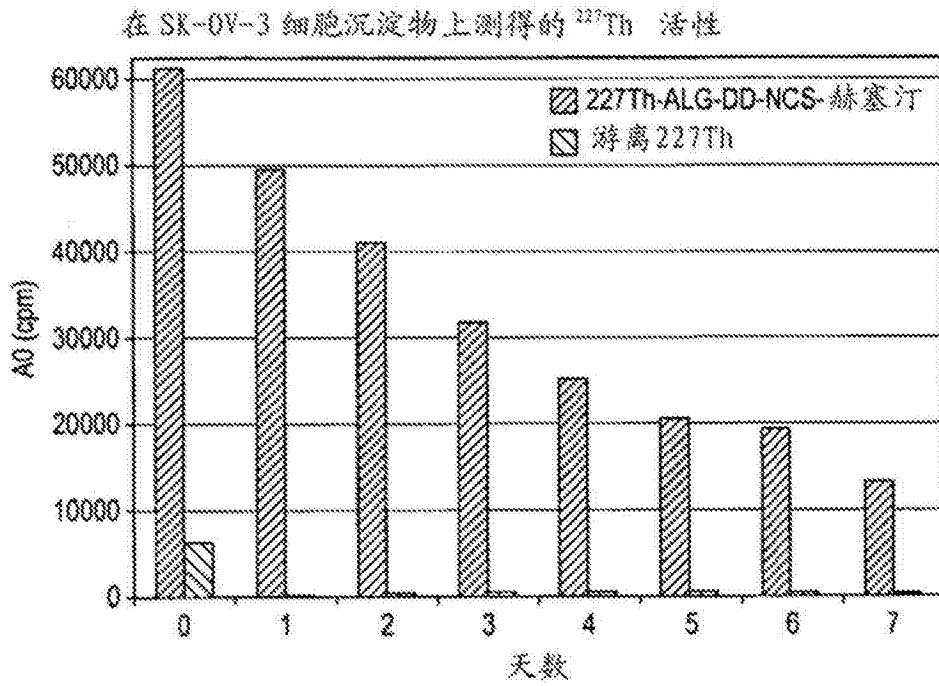


图17

Th-227-ALG-DD-NCS- 曲妥珠单抗对 SK-OV-3 细胞的细胞毒性

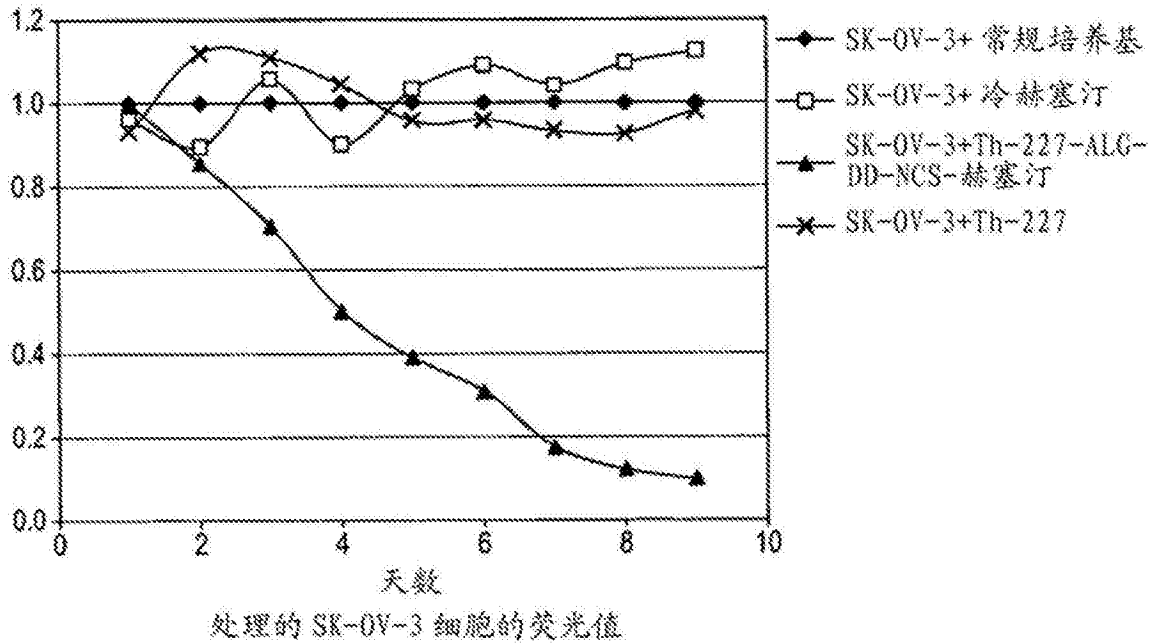
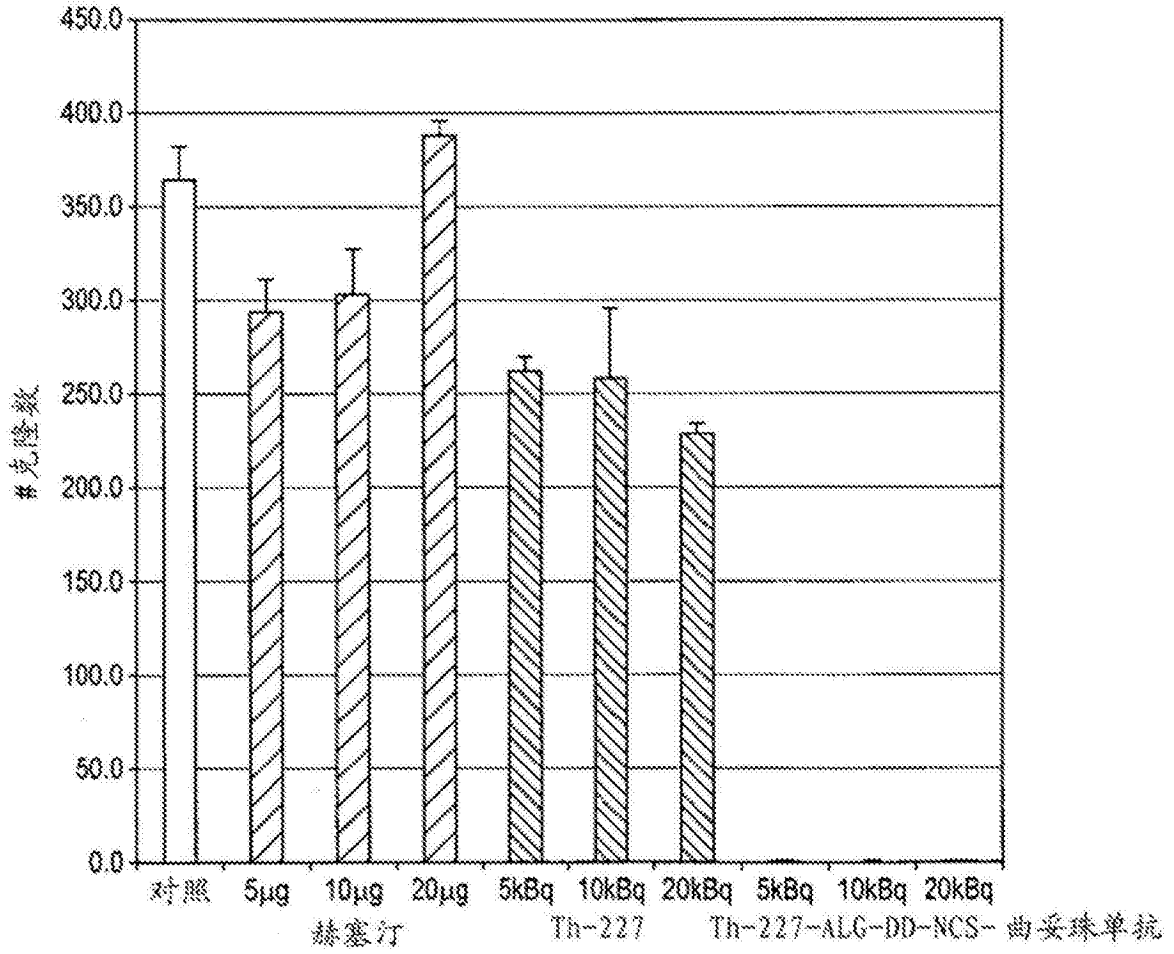


图18

使用 SK-OV-3 细胞的克隆形成测定中的 Th-227-ALG-DD-NCS- 曲妥珠单抗



1000 个处理的 SK-OV-3 单细胞的克隆形成测定

图19

使用 SK-OV-3 细胞的克隆形成测定中的 Th-227-ALG-DD-NCS- 曲妥珠单抗

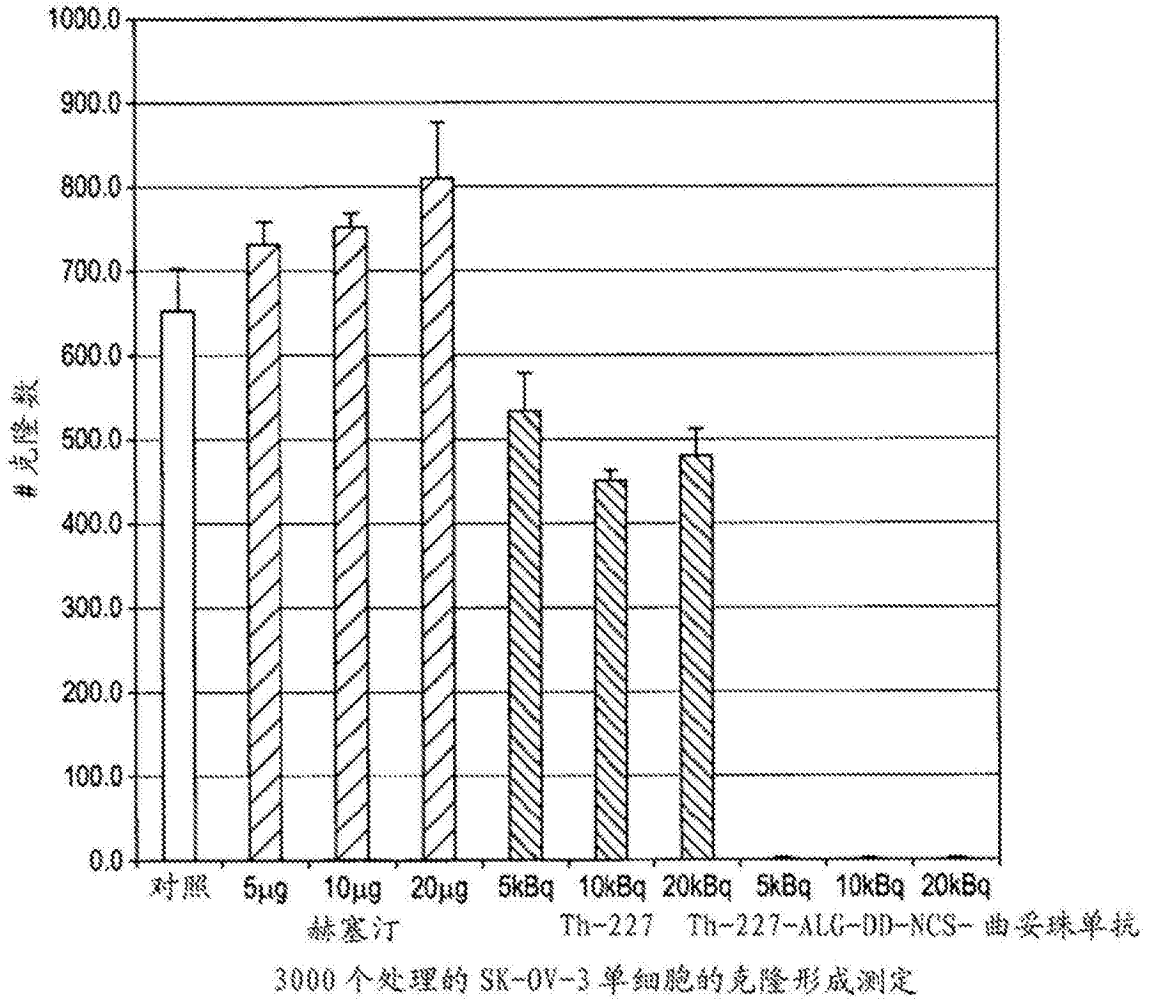


图20

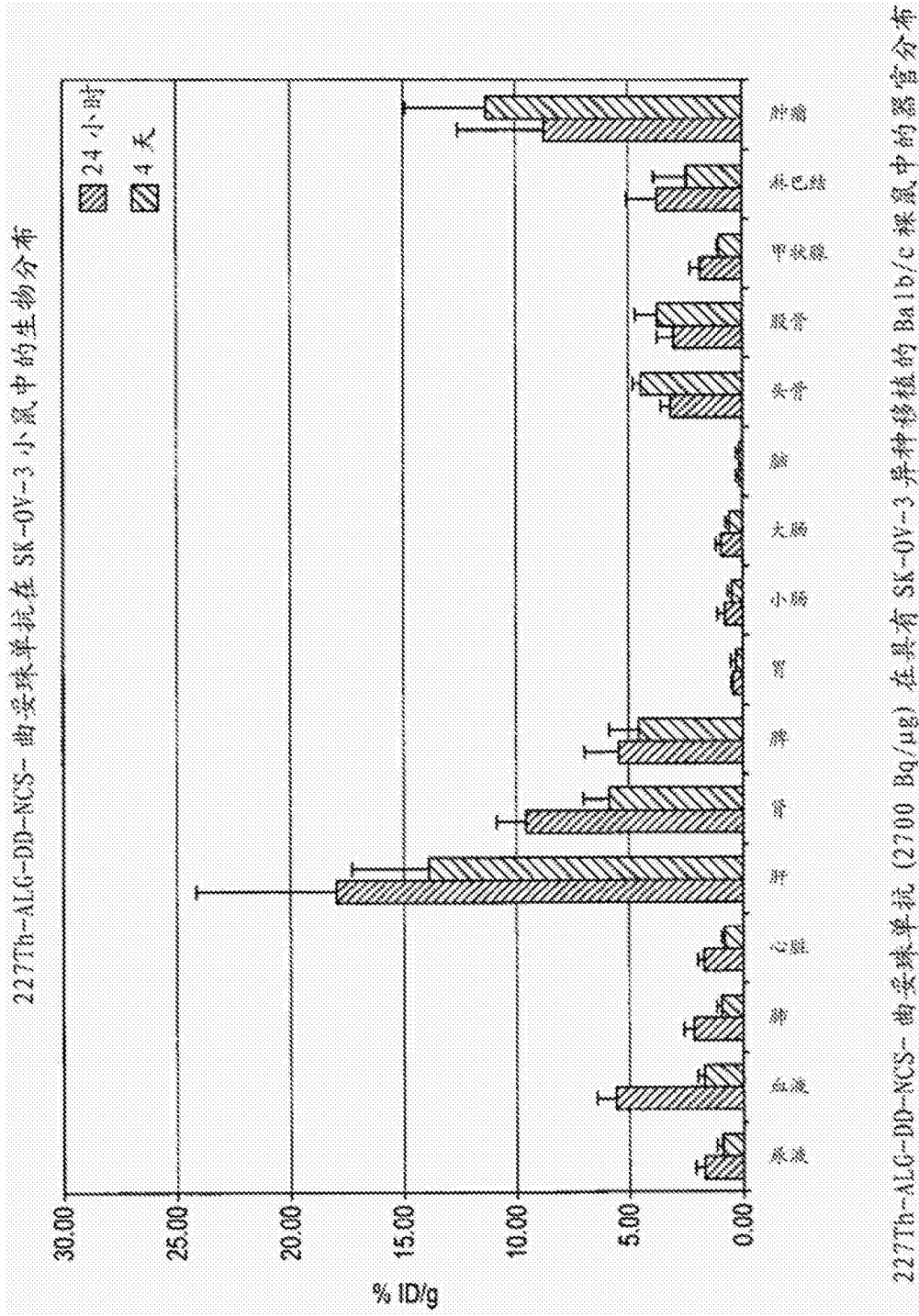


图21