



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

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

(11)



1-0030016

(51)<sup>7</sup> C07K 16/28; A61K 39/395; C07D  
491/052; A61K 31/4745; A61P 35/00

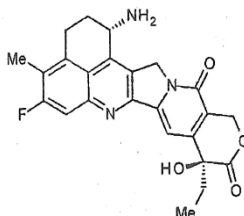
(13) B

- (21) 1-2016-01967 (22) 28/01/2015  
(86) PCT/JP2015/000355 28/01/2015 (87) WO 2015/115091 06/08/2015  
(30) 2014-017777 31/01/2014 JP; 2014-168944 22/08/2014 JP; 2014-227886 10/11/2014 JP  
(45) 25/11/2021 404 (43) 25/10/2016 343A  
(73) Daiichi Sankyo Company, Limited (JP)  
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 1038426, Japan  
(72) NAITO, Hiroyuki (JP); OGITANI, Yusuke (JP); MASUDA, Takeshi (JP);  
NAKADA, Takashi (JP); YOSHIDA, Masao (JP); ASHIDA, Shinji (JP); MORITA,  
Koji (JP); MIYAZAKI, Hideki (JP); KASUYA, Yuji (JP); HAYAKAWA, Ichiro  
(JP); ABE, Yuki (JP).  
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) THỂ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ  
LIÊN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề xuất thể liên hợp kháng thể-dược chất làm thuốc kháng u có tác dụng kháng u và độ an toàn vượt trội và có tác dụng điều trị bệnh rất tốt, trong đó hợp chất kháng u được thể hiện bằng công thức dưới đây được liên hợp với kháng thể kháng HER2 qua thành phần liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau: - L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>p</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)-, trong đó kháng thể kháng HER2 được gắn với đầu L<sup>1</sup>, và hợp chất kháng u được gắn với nhóm carbonyl của gốc -(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)- với nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 làm vị trí gắn.

(Công thức 1)



### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

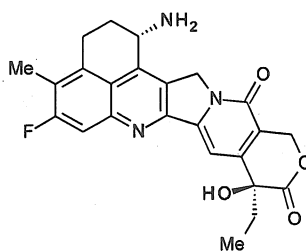
Sáng chế đề cập đến thể liên hợp kháng thể-dược chất có dược chất kháng u liên hợp với kháng thể kháng HER2 thông qua nhóm cấu trúc liên kết, thể liên hợp này có thể được dùng làm thuốc kháng u.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) có thành phần dược chất có độc tính tế bào được liên hợp với kháng thể mà kháng nguyên của nó được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư và kháng thể này cũng liên kết với kháng nguyên có khả năng nhập bào, và do đó có thể phân phối dược chất chọn lọc đến các tế bào ung thư, theo cách này có thể tích lũy dược chất trong các tế bào ung thư và tiêu diệt tế bào ung thư này (xem, các tài liệu từ 1 đến 3). Để dùng làm ADC, Mylotarg (nhãn hiệu đã được đăng ký; Gemtuzumab ozogamicin), một dạng mà trong đó calicheamicin được liên hợp với kháng thể kháng CD33, đã được chấp thuận là một chất điều trị bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính. Ngoài ra, Adcetris (nhãn hiệu đã được đăng ký; Brentuximab vedotin), dạng thuốc trong đó auristatin E được liên hợp với kháng thể kháng CD30, cũng mới được chấp thuận là chất điều trị u lympho Hodgkin và u lympho tế bào lớn thoái biến (xem, tài liệu 4). Các dược chất có trong các ADC đã được chấp nhận từ trước đến nay đều có đích là ADN hoặc tubulin.

Về chất kháng u, các dẫn xuất camptothecin, các hợp chất có phân tử lượng thấp mà ức chế topoisomeraza I để biểu hiện tác dụng kháng u, đã được biết đến. Trong số các hợp chất này, hợp chất kháng u được thể hiện bằng công thức dưới đây:

(Công thức 1)



(exatecan, tên hóa học: (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-

methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dion) là dẫn xuất tan trong nước của camptothecin (tài liệu sáng chế 1 và 2). Không giống irinotecan đang được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng, hợp chất này không cần đến việc hoạt hóa bằng enzym để tạo ra tác dụng kháng u. Ngoài ra, hoạt tính ức chế đối với topoisomeraza I của nó được đánh giá là cao hơn SN-38 – một được chất chính của irinotecan và topotecan cũng được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng, và hoạt tính diệt tế bào in vitro cao hơn cũng đã được khẳng định đối với nhiều tế bào ung thư khác nhau. Cụ thể, hợp chất này được xác nhận là có tác dụng chống lại các tế bào ung thư kháng SN-38 hoặc chất tương tự do sự biểu hiện của P-glycoprotein. Ngoài ra, trên mẫu chuột được cấy dưới da khối u của người, hợp chất này được xác nhận là có tác dụng kháng u tiềm tàng, và theo đó nó đã được nghiên cứu lâm sàng, nhưng chưa được đưa ra thị trường (xem, tài liệu từ 5 đến 10). Vẫn chưa rõ là exatecan có tác động hiệu quả hay không khi ở dạng ADC.

DE-310 là phức hợp trong đó exatecan được liên hợp với polyme của carboxymetyldextran rượu đa chức có khả năng phân hủy sinh học qua vùng đệm peptit GGFG (tài liệu sáng chế 3). Bằng cách chuyển hóa exatecan thành dạng tiền được chất polyme, có thể giữ lại tính chất lưu lại trong máu cao và tương tự, khả năng nhắm vào các khu vực có u tự động tăng do tính thấm của các mạch máu mới tạo trong khối u tăng và tính lưu lại trong mô u tăng. Với DE-310, thông qua việc phân cắt vùng đệm peptit bằng enzym, exatecan và exatecan có nhóm glyxin gắn với nhóm amin dưới dạng hoạt chất chính được giải phóng liên tục, và kết quả là cải thiện các thông số dược động lực học. DE-310 được thấy là có hiệu quả cao hơn so với exatecan khi sử dụng một mình ngay cả khi tổng liều của exatecan trong D310 thấp hơn liều dùng một mình exatecan khi đánh giá nhiều mẫu khối u khác nhau trong các nghiên cứu phi lâm sàng. Nghiên cứu lâm sàng đã được thực hiện đối với DE-310, và các trường hợp có hiệu quả cũng đã được xác nhận, nghiên cứu lâm sàng này cũng đưa ra một báo cáo cho thấy rằng hoạt chất chính tích tụ trong các khối u nhiều hơn trong mô bình thường. Tuy nhiên, cũng có báo cáo chỉ ra rằng sự tích tụ DE-310 và hoạt chất chính trong các khối u không khác nhiều so với sự tích tụ các chất này trong mô bình thường ở người và do đó không có sự nhắm đích thụ động quan sát được ở người (xem, tài liệu từ 11 đến 14). Kết quả là, DE-310 cũng không được thương mại hóa, và vẫn chưa rõ exatecan có tác động hiệu quả dưới dạng thuốc nhắm đến các đích này hay không.

Là một hợp chất liên quan đến DE-310, phức hợp trong đó nhóm cấu trúc được thể hiện bằng công thức  $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$  được xen vào giữa vùng đệm - GGFG- và exatecan để tạo thành  $\text{-GGFG-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$  được sử dụng làm cấu trúc vùng đệm cũng đã biết (tài liệu sáng chế 4). Tuy nhiên, vẫn chưa biết đến về tác dụng kháng u của phức hợp này.

HER2 là một trong số các sản phẩm của gen gây ung thư loại thụ thể yếu tố tăng trưởng điển hình được xác định là gen gây ung thư liên quan đến thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào biểu bì 2 ở người, và là protein thụ thể xuyên màng có phân tử lượng là 185 kDa và có miền tyrosin kinaza (tài liệu 15). Trình tự ADN và trình tự axit amin của HER2 đã được bộc lộ trong cơ sở dữ liệu chung, và có thể truy cập được, ví dụ, dưới số nộp lưu M11730 (GenBank), NP\_004439.2 (NCBI), hoặc số truy cập khác.

HER2 (neu, ErbB-2) là một trong số các thành viên của họ EGFR (thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì) và được hoạt hóa bằng cách tự phosphoryl hóa tại các gốc tyrosin nội bào thông qua việc hình thành homodime hoặc heterodime với thụ thể EGFR khác là HER1 (EGFR, ErbB-1), HER3 (ErbB-3), hoặc HER4 (ErbB-4) (tài liệu từ 16 đến 18), theo đó đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng, biệt hóa, và sống sót của tế bào ở các tế bào bình thường và tế bào ung thư (tài liệu 19 và 20). HER2 bị biểu hiện quá mức ở nhiều loại ung thư khác nhau như ung thư vú, ung thư dạ dày, và ung thư buồng trứng (tài liệu từ 21 đến 26) và đã được báo cáo là yếu tố tiên lượng âm tính đối với bệnh ung thư vú (tài liệu 27 và 28).

Trastuzumab là kháng thể được làm cho tương thích với người của kháng thể kháng HER2 của chuột 4D5 (tài liệu 29 và tài liệu sáng chế 5), được gọi là kháng thể đơn dòng kháng HER2 tái tổ hợp được làm cho tương thích với người (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Herceptin(R)) (tài liệu sáng chế 6). Trastuzumab liên kết đặc hiệu với miền ngoại bào IV của HER2 và tạo ra độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC) hoặc tạo ra tác dụng chống ung thư thông qua việc ức chế sự dẫn truyền tín hiệu từ HER2 (tài liệu 30 và 31). Trastuzumab có hiệu quả cao đối với khối u biểu hiện quá HER2 (tài liệu 32) và do đó, nó đã được giới thiệu vào năm 1999 ở Hoa Kỳ và năm 2001 ở Nhật làm chất trị liệu cho các bệnh nhân mắc bệnh ung thư vú di căn biểu hiện quá HER2.

Mặc dù tác dụng trị liệu của trastuzumab đối với bệnh ung thư vú đã được chứng



minh đầy đủ (tài liệu 33), nhưng dường như chỉ khoảng 15% bệnh nhân mắc ung thư vú biểu hiện quá HER2 nhận nhiều liệu pháp chống ung thư truyền thống có đáp ứng với trastuzumab. Khoảng 85% bệnh nhân còn lại không có đáp ứng hoặc đáp ứng yếu với việc điều trị bằng trastuzumab.

Do đó, cần có chất trị liệu nhằm điều trị các bệnh liên quan đến sự biểu hiện HER2 ở các bệnh nhân có các khối u biểu hiện quá HER2 mà không đáp ứng hoặc đáp ứng yếu với trastuzumab hoặc các rối loạn liên quan đến HER2. T-DM1 (trastuzumab emtansine, Kadcyla (R); tài liệu 34) mang được chất kháng u liên hợp với trastuzumab thông qua cấu trúc liên kết, và pertuzumab (Perjeta(R); tài liệu 35 và tài liệu sáng chế 7) được thiết kế để nhắm vào miền ngoại bào II của HER2 và ức chế sự tạo thành heterodime đã được phát triển. Tuy nhiên, tính đáp ứng, độ mạnh của hoạt tính, và các chỉ định được chấp nhận của chúng vẫn chưa đủ, và nhu cầu về chất nhắm đích HER2 vẫn chưa được đáp ứng.

Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: JP 5-59061

Tài liệu sáng chế 2: JP 8-337584

Tài liệu sáng chế 3: WO 1997/46260

Tài liệu sáng chế 4: WO 2000/25825

Tài liệu sáng chế 5: US 5677171

Tài liệu sáng chế 6: US 5821337

Tài liệu sáng chế 7: WO 01/00244

Tài liệu khác:

Tài liệu 1: Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

Tài liệu 2: Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

Tài liệu 3: Damle N.K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.

Tài liệu 4: Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.

- Tài liệu 5: Kumazawa, E., Tohgo, A., *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1998) 7, 625-632.
- Tài liệu 6: Mitsui, I., et al., *Jpn J. Cancer Res.* (1995) 86, 776-782.
- Tài liệu 7: Takiguchi, S., et al., *Jpn J. Cancer Res.* (1997) 88, 760-769.
- Tài liệu 8: Joto, N. et al. *Int J Cancer* (1997) 72, 680-686.
- Tài liệu 9: Kumazawa, E. et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998) 42, 210-220.
- Tài liệu 10: De Jager, R., et al., *Ann N Y Acad Sci* (2000) 922, 260-273.
- Tài liệu 11: Inoue, K. et al., *Polymer Drugs in the Clinical Stage*, Edited by Maeda et al. (2003) 145-153.
- Tài liệu 12: Kumazawa, E. et al., *Cancer Sci* (2004) 95, 168- 175.
- Tài liệu 13: Soepenberg, O. et al., *Clinical Cancer Research*, (2005) 11, 703-711.
- Tài liệu 14: Wente M. N. et al., *Investigational New Drugs* (2005) 23, 339-347.
- Tài liệu 15: Coussens L, et al., *Science*.1985;230(4730):1132-1139.
- Tài liệu 16: Graus-Porta G, et al., *EMBO J.* 1997;16;1647- 1655.
- Tài liệu 17: Karnagaran D, et al., *EMBO J.* 1996;15:254-264.
- Tài liệu 18: Sliwkowski MX, et al., *J. Biol. Chem.* 1994;269:14661-14665.
- Tài liệu 19: Di Fore PP, et al., *Science.* 1987;237:178-182.
- Tài liệu 20: Hudziak RM, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:7159-7163.
- Tài liệu 21: Hardwick R, et al., *Eur. J Surg Oncol.* 1997 (23):30-35.
- Tài liệu 22: Korkaya H, et al., *Oncogene.* 2008;27(47):6120- 6130.
- Tài liệu 23: Yano T, et al., *Oncol Rep.* 2006;15(1):65-71.
- Tài liệu 24: Slamon DJ, et al., *Science.* 1987;235:177-182.
- Tài liệu 25: Gravalos C, et al., *Ann Oncol* 19: 1523-1529, 2008.
- Tài liệu 26: Fukushima S et al., *Mol Cell Biol* 6: 955-958, 1986.
- Tài liệu 27: Slamon DJ, et al. *Science.* 1989;244:707-712.
- Tài liệu 28: Kaptain S et al., *Diagn Mol Pathol* 10:139-152, 2001.
- Tài liệu 29: Fendly. et al., *Cancer Research* 1990(50):1550- 1558.

Tài liệu 30: Sliwkowski MX, et al., Semin Oncol. 1999;26(4,Suppl 12):60-70.

Tài liệu 31: Hudis CA, et al., N Engl J Med. 357: 39-51, 2007.

Tài liệu 32: Vogel CL, et al., J Clin Oncol. 2002;20(3):719- 726.

Tài liệu 33: Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996).

Tài liệu 34; Howard A. et al., J Clin Oncol 2011;29:398-405.

Tài liệu 35: Adams CW, et al., Cancer Immunol Immunother. 2006;6:717-727.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

#### **Vấn đề kỹ thuật**

Liên quan đến việc điều trị khối u bằng các kháng thể, tác dụng kháng u chưa đầy đủ có thể quan sát thấy ngay cả khi kháng thể nhận diện kháng nguyên để liên kết với các tế bào khối u, và có những trường hợp trong đó cần đến kháng thể kháng u hiệu quả hơn. Ngoài ra, nhiều hợp chất kháng u có phân tử lượng thấp gặp các vấn đề về tính an toàn như các tác dụng phụ và độc tính ngay cả khi hợp chất có tác dụng kháng u nổi bật. Vẫn có mục tiêu là đạt được tác dụng trị liệu nổi trội với độ an toàn cao hơn nữa. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất thuốc kháng u có tác dụng trị liệu nổi bật, vừa có hiệu quả kháng u vừa an toàn.

#### **Giải quyết vấn đề**

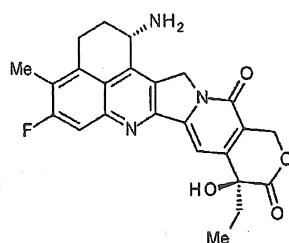
Các tác giả sáng chế coi rằng kháng thể kháng HER2 là kháng thể có khả năng nhắm vào các tế bào khối u, tức là, có đặc tính nhận diện các tế bào khối u, đặc tính liên kết với các tế bào khối u, đặc tính nhập dòng trong các tế bào khối u, hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào khối u, hoạt tính diệt tế bào đối với các tế bào khối u, hoặc các đặc tính tương tự; do đó, khi hợp chất kháng u exatecan được chuyển hóa thành thể liên hợp kháng thể-được chất, thông qua nhóm cấu trúc liên kết, bằng cách liên hợp với kháng thể này, hợp chất kháng u này có thể được phân phối một cách đảm bảo hơn nữa đến các tế bào khối u để thể hiện cụ thể tác dụng kháng u của hợp chất trong các tế bào khối u, và do đó có thể thể hiện chắc chắn tác dụng kháng u và cũng có thể mong đợi tác dụng diệt tế bào của kháng thể kháng HER2 được tăng cường, và liều dùng hợp chất kháng u có thể được giảm so với trường hợp sử dụng một mình hợp chất, và do đó các ảnh hưởng của hợp chất kháng u đến các tế bào bình thường có thể giảm bớt sao cho có thể nhận được độ an toàn cao hơn.

Liên quan đến điều này, các tác giả sáng chế đã tạo ra thành phần liên kết có cấu trúc cụ thể và tiếp tục theo đuổi để thu nhận thể liên hợp kháng thể-độc chất trong đó kháng thể kháng HER2 và exatecan được liên hợp với nhau thông qua liên kết này, và xác nhận tác dụng kháng u nổi bật được thể hiện bởi thể liên hợp để từ đó hoàn thiện sáng chế.

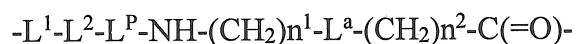
Cụ thể, sáng chế đề cập đến các đối tượng sau.

(1) Thể liên hợp kháng thể-độc chất trong đó hợp chất kháng u được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 2)



được liên hợp với kháng thể kháng HER2 thông qua thành phần liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:



thông qua liên kết thioete được tạo thành ở nhóm liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng HER2.

Trong bản mô tả, kháng thể kháng HER2 được gắn với đầu  $L^1$ , hợp chất kháng u được gắn với nhóm cacbonyl của gốc  $-(CH_2)n^2-C(=O)-$  bằng nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 làm vị trí liên kết,

trong đó:

$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6,

$n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5,

$L^1$  là  $-(\text{Suxinimit-3-yl-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-$ ,

trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8,

$L^2$  là  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$  hoặc liên kết đơn,

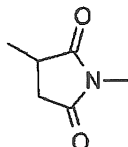
trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 1 đến 6,

$L^P$  là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin,

$L^a$  là -O- hoặc liên kết đơn, và

-(Suxinimit-3-yl-N)- có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 3)



được gắn với kháng thể kháng HER2 ở vị trí 3 của nó và được gắn với nhóm metylen trong cấu trúc thành phần liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1.

Sáng chế còn đề cập đến mỗi trong số các đối tượng sau:

(2) Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (1), trong đó gốc peptit  $L^P$  là gốc peptit chứa axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic.

(3) Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (1) hoặc (2), trong đó  $L^P$  là gốc peptit được chọn từ nhóm sau:

-GGF-,

-DGGF-,

-(D-)D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,

-SGGF-,

-KGGF-,

-DGGFG-,

-GGFGG-,

-DDGGFG-,

-KDGGFG-, và

-GGFGGGF-;

trong đó "(D-)D" là axit D-aspartic.

(4) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo (1) hoặc (2), trong đó  $L^P$  là gốc peptit chứa 4 axit amin.

(5) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó  $L^P$  là gốc tetrapeptit -GGFG-.

(6) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5, và  $L^2$  là liên kết đơn.

(7) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5,  $L^2$  là  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ , và  $n^4$  là 2 hoặc 4.

(8) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7), trong đó  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  là cấu trúc một phần có chiều dài mạch từ 4 đến 7 nguyên tử.

(9) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7), trong đó  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  là cấu trúc một phần có chiều dài mạch là 5 hoặc 6 nguyên tử.

(10) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9), trong đó  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  là:

$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ ,

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ ,

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ , hoặc

$-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$ .

(11) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến

(9), trong đó  $\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}^{n^2}\text{-C(=O)-}$  là

$\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,

$\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ , hoặc

$\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ .

(12) Thễ liên hợp kháng thễ-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9), trong đó nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết có dược chất được gắn với  $\text{L}^1\text{-L}^2\text{-L}^p\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}^{n^2}\text{-C(=O)-}$  là một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết được chọn từ các nhóm sau:

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

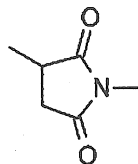
$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

trong đó -(suxinimit-3-yl-N)- có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

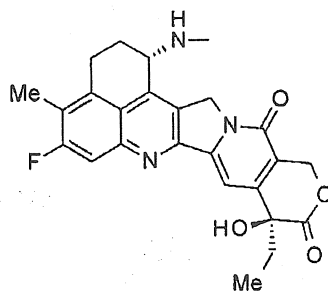
(Công thức 4)



được gắn với kháng thể kháng HER2 ở vị trí 3 của nó và được gắn với nhóm metylen trong cấu trúc thành phần liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

-(NH-DX) là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 5)



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 là vị trí liên kết, và

-GGFG- là gốc tetrapeptit -Gly-Gly-Phe-Gly-.

(13) Thể liên hợp kháng thể-được chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9), trong đó nhóm cấu trúc được chất-thành phần liên kết có được chất được gắn với -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)- là một cấu trúc được chất-thành phần liên kết được chọn từ nhóm sau:

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-

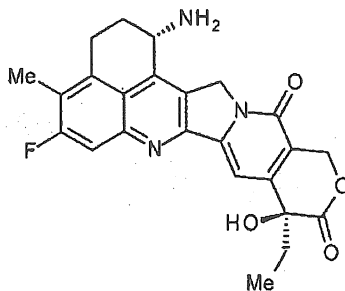


GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Trong bản mô tả, -(suxinimit-3-yl-N)-, -(NH-DX), và -GGFG- như đã nêu trên.

(14) Thể liên hợp kháng thể-được chất, trong đó hợp chất kháng u được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 6)



được liên hợp với kháng thể kháng HER2 thông qua thành phần liên kết có cấu trúc được thể hiện bởi công thức sau:

-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)-

thông qua liên kết thioete được tạo thành ở gốc liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng HER2,

trong đó:

kháng thể kháng HER2 được gắn với đầu L<sup>1</sup>, hợp chất kháng u được gắn với nhóm cacbonyl của gốc -(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)-,

trong đó:

n<sup>1</sup> là số nguyên từ 0 đến 6,

n<sup>2</sup> là số nguyên từ 0 đến 5,

L<sup>1</sup> là -(suxinimit-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-,

trong đó n<sup>3</sup> là số nguyên từ 2 đến 8,

L<sup>2</sup> là -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sup>n<sup>4</sup></sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)- hoặc liên kết đơn,

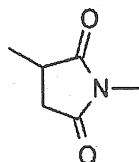
trong đó n<sup>4</sup> là số nguyên từ 1 đến 6,

L<sup>P</sup> là gốc tetrapeptit -GGFG-,

$L^a$  là -O- hoặc liên kết đơn, và

-(suxinimit-3-yl-N)- có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 7)



được gắn với kháng thể kháng HER2 ở vị trí 3 của nó và gắn với nhóm metylen trong cấu trúc thành phần liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1.

(15) Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (14), trong đó

$n^1$  là 3,  $n^2$  là 0,  $n^3$  là 2,  $L^2$  là  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $n^4$  là 2, và  $L^a$  là liên kết đơn,

$n^1$  là 1,  $n^2$  là 1,  $n^3$  là 5,  $L^2$  là liên kết đơn, và  $L^a$  là -O-, hoặc

$n^1$  là 2,  $n^2$  là 1,  $n^3$  là 5,  $L^2$  là liên kết đơn, và  $L^a$  là -O-.

(16) Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (14) hoặc (15), trong đó  $n^3$  là 2 hoặc 5, và  $L^2$  là liên kết đơn.

(17) Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (14) hoặc (15), trong đó  $n^3$  là 2 hoặc 5,  $L^2$  là  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ , và  $n^4$  là 2 hoặc 4.

(18) Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (14) đến (17), trong đó  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$  là

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ , hoặc

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ .

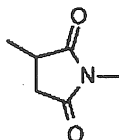
(19) Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (14) đến (18), trong đó nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết có dược chất gắn với  $-L^1-L^2-L^P-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$  là một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết được chọn từ nhóm gồm:

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ ,

- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

trong đó, -(suxinimit-3-yl-N)- có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

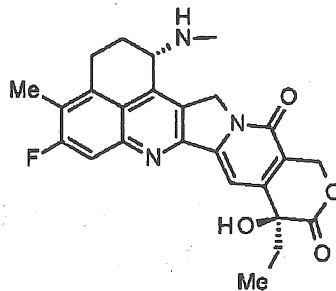
(Công thức 8)



được gắn với kháng thể kháng HER2 ở vị trí 3 của nó và được gắn với nhóm metylen trong cấu trúc thành phần liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

-(NH-DX) là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 9)



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 là vị trí liên kết, và

-GGFG- là gốc tetrapeptit -Gly-Gly-Phe-Gly-.

(20) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (14) đến (18), trong đó nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết có dược chất được gắn với  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$  là một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết được chọn từ các nhóm sau:

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
(NH-DX),

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
(NH-DX), và

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Trong bản mô tả, -(suxinimit-3-yl-N)-, -(NH-DX), và -GGFG- như được xác định ở trên.

(21) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (20), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

(22) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (20), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

(23) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (20), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên

kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

(24) Thuốc chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (23), muối của nó hoặc hydrat của nó.

(25) Thuốc kháng u và/hoặc thuốc chống ung thư chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (23), muối của nó hoặc hydrat của nó.

(26) Thuốc kháng u và/hoặc thuốc chống ung thư theo mục (25), để sử dụng chống lại ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư vú, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, u mô đệm đường tiêu hóa, ung thư cổ tử cung, ung thư thực quản, caxinom tế bào vảy, ung thư màng bụng, ung thư gan, ung thư tế bào gan, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư đại trực tràng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tử cung, ung thư tuyến nước bọt, ung thư thận, ung thư âm hộ, ung thư tuyến giáp, ung thư dương vật, bệnh bạch cầu, u lympho ác tính, u tương bào, u tủy, hoặc sacôm.

(27) Dược phẩm chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (23), muối của nó hoặc hydrat của nó làm thành phần hoạt tính, và thành phần chế phẩm dược dụng.

(28) Dược phẩm theo mục (27), được sử dụng để chống lại bệnh ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư vú, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, u mô đệm đường tiêu hóa, ung thư cổ tử cung, ung thư thực quản, caxinom tế bào vảy, ung thư màng bụng, ung thư gan, ung thư tế bào gan, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư đại trực tràng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tử cung, ung thư tuyến nước bọt, ung thư thận, ung thư âm hộ, ung thư tuyến giáp, ung thư dương vật, bệnh bạch cầu, u lympho ác tính, u tương bào, u tủy, hoặc sacôm.

(29) Phương pháp điều trị khối u và/hoặc bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-dược chất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (23), muối của nó hoặc hydrat của nó.

(30) Phương pháp sản xuất thể liên hợp kháng thể-dược chất bao gồm bước cho hợp chất được thể hiện bằng công thức sau:

(maleimide-N-yl)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)-(NH-DX)

phản ứng với kháng thể kháng HER2 hoặc dẫn xuất có tính phản ứng của nó và cho gốc được chất-thành phần liên kết liên hợp với kháng thể bằng phương pháp tạo liên kết thioete ở vị trí liên kết disulfua ở phần bản lề của kháng thể.

Trong công thức này, n<sup>3</sup> là số nguyên từ 2 đến 8,

L<sup>2</sup> là -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sup>n<sup>4</sup></sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)- hoặc liên kết đơn,

trong đó n<sup>4</sup> là số nguyên từ 1 đến 6,

L<sup>P</sup> là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic,

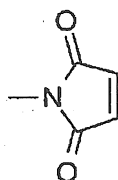
n<sup>1</sup> là số nguyên từ 0 đến 6,

n<sup>2</sup> là số nguyên từ 0 đến 5,

L<sup>a</sup> là -O- hoặc liên kết đơn,

(maleimide-N-yl)- là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

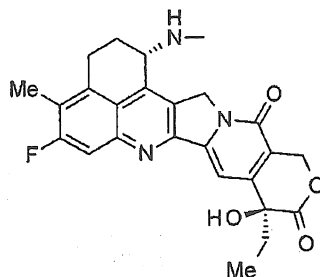
(Công thức 10)



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí liên kết, và

-(NH-DX) là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 11)



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 là vị trí liên kết.

(31) Phương pháp sản xuất theo mục (30), trong đó phương pháp cho gốc được chất-thành phần liên kết liên hợp với kháng thể kháng HER2 là phương pháp làm giảm kháng thể để chuyển hóa kháng thể thành dẫn xuất có tính phản ứng.

(32) Phương pháp sản xuất theo mục (30) hoặc (31), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc được chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

(33) Phương pháp sản xuất theo mục (30) hoặc (31), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc được chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

(34) Phương pháp sản xuất theo mục (30) hoặc (31), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc được chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

(35) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất thu được từ phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (30) đến (34).

(36) Thẻ liên hợp kháng thể-được chất thu được bằng cách tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết sulfua ở phần bản lề của kháng thể, trong đó kháng thể kháng HER2 được xử lý ở điều kiện khử và sau đó được cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm được nêu dưới đây:

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-



$C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$(maleimit-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$(maleimit-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$(maleimit-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$(maleimit-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

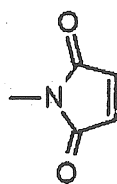
$(maleimit-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$(maleimit-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$  và

$(maleimit-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX).$

Trong các nhóm trên, (maleimit-N-yl)- là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

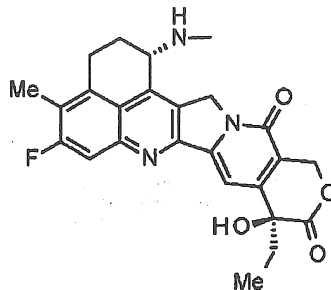
(Công thức 12)



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí liên kết, và

-(NH-DX) là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 13)



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 là vị trí liên kết, và

-GGFG- là gốc tetrapeptit -Gly-Gly-Phe-Gly-.

(37) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất thu được bằng cách tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết sulfua có ở phần bản lề của kháng thể, trong đó kháng thể kháng HER2 được xử lý ở điều kiện khử và sau đó được cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm được nêu dưới đây:

(maleimide-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimide-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), và

(maleimide-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Ở đây, (maleimide-N-yl)-, -(NH-DX), và -GGFG- như được xác định ở trên.

(38) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (36) hoặc (37), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

(39) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (36) hoặc (37), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

(40) Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo mục (36) hoặc (37), trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết đã chọn liên hợp với mỗi phân tử kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

Hiệu quả của sáng chế

Với thẻ liên hợp kháng thể kháng HER2-dược chất có hợp chất kháng u exatecan

được liên hợp qua thành phần liên kết với cấu trúc cụ thể, có thể đạt được tác dụng kháng u và độ an toàn nổi bật.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig. 1 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng kháng HER2 được làm cho tương thích với người (SEQ ID NO: 1).

Fig. 2 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng kháng HER2 được làm cho tương thích với người (SEQ ID NO: 2).

Fig. 3 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể-dược chất (27) hoặc trastuzumab trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư vú của người KPL-4 được cấy dưới da. Trên hình, trục hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trục tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể-dược chất (8), (28) hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư dạ dày của người NCI-N87 được cấy dưới da. Trên hình, trục hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trục tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 5 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể-dược chất (8), (29), (30), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư vú của người JIMT-1 được cấy dưới da. Trên hình, trục hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trục tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 6 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể-dược chất (31), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư tuyến tụy của người Capan-1 được cấy dưới da. Trên hình, trục hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trục tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 7 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể-dược chất (50) trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư dạ dày của người NCI- N87 được cấy dưới da. Trên hình, trục hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trục tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 8 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể-dược chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào ung thư vú của người ST225 được cấy dưới da. Trên hình, trục hoành biểu diễn ngày sau

khi cấy khối u, và trực tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 9 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể- dược chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào ung thư vú của người ST910 được cấy dưới da. Trên hình, trực hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trực tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 10 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể- dược chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư đại trực tràng của người CTG-0401 được cấy dưới da. Trên hình, trực hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trực tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 11 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể- dược chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ của người CTG-0860 được cấy dưới da. Trên hình, trực hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trực tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 12 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể- dược chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư ống mật của người CTG-0927 được cấy dưới da. Trên hình, trực hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trực tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 13 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể- dược chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư thực quản của người CTG-0137 được cấy dưới da. Trên hình, trực hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trực tung biểu diễn thể tích khối u.

Fig. 14 là đồ thị thể hiện tác dụng kháng u của thể liên hợp kháng thể- dược chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin trên chuột trụi lông có các tế bào dòng ung thư buồng trứng của người SK-OV-3 được cấy dưới da. Trên hình, trực hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trực tung biểu diễn thể tích khối u.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sau đây, các phương án được ưu tiên để thực hiện sáng chế được mô tả với sự tham khảo các hình vẽ. Các phương án được mô tả dưới đây chỉ đơn thuần nhằm mục đích minh họa cho một ví dụ về phương án tiêu biểu của sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế là thuốc kháng u trong đó kháng thể kháng HER2 được liên hợp với hợp chất kháng u thông qua nhóm cấu trúc thành phần liên kết và được giải thích chi tiết dưới đây.

#### Kháng thể

Kháng thể kháng HER2 được sử dụng trong thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế có thể thu được từ loài bất kỳ, và ví dụ ưu tiên về các loài này có thể bao gồm người, chuột cống, chuột nhắt, và thỏ. Trong trường hợp kháng thể thu được từ loài khác không phải người, tốt hơn là nó được tạo thể khảm hoặc được làm cho tương thích với người bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết. Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng và tốt hơn nếu là kháng thể đơn dòng.

Kháng thể kháng HER2 là kháng thể có khả năng nhắm đích các tế bào khối u, tức là, có đặc tính nhận diện tế bào khối u, đặc tính liên kết với tế bào khối u, đặc tính nhập dòng vào trong tế bào khối u, hoạt tính diệt tế bào đối với các tế bào khối u, hoặc các đặc tính tương tự, và có thể được liên hợp với dược chất có hoạt tính kháng u qua thành phần liên kết để tạo thành thể liên hợp kháng thể-được chất.

Hoạt tính liên kết của kháng thể đối với các tế bào khối u có thể được xác nhận bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Sự nhập dòng của kháng thể vào các tế bào khối u có thể được xác nhận bằng cách sử dụng:

- (1) phân tích hiển thị kháng thể được kết hợp trong các tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang sử dụng kháng thể bậc hai (được đánh dấu huỳnh quang) liên kết với kháng thể trị liệu (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761),
- (2) phân tích đo cường độ phát huỳnh quang được kết hợp trong các tế bào bằng cách sử dụng kháng thể bậc hai (được đánh dấu huỳnh quang) liên kết với kháng thể trị liệu (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, December 2004), hoặc
- (3) phân tích Mab-ZAP sử dụng độc tố miễn dịch liên kết với kháng thể trị liệu trong đó độc tố này được giải phóng dựa vào sự kết hợp vào các tế bào để ức chế sự phát triển của tế bào (Bio Techniques 28: 162-165, January 2000). Để làm độc tố miễn dịch, có thể sử dụng protein phức tái tổ hợp của miễn xúc tác gây độc bệnh bạch hầu và protein G.

Hoạt tính kháng u của kháng thể có thể được xác nhận *in vitro* bằng cách xác định hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào. Ví dụ, dòng tế bào ung thư biểu hiện quá protein nhắm đích kháng thể được nuôi cấy, và kháng thể được thêm ở các nồng độ khác nhau vào hệ môi trường nuôi cấy để xác định hoạt tính ức chế chống lại sự hình thành ổ bệnh, sự hình thành khuẩn lạc, và sự phát triển dạng phòng cầu. Hoạt tính kháng u có thể được xác nhận *in vivo*, ví dụ, bằng cách cho chuột trụi lông được cấy ghép dòng tế bào khối u biểu hiện cao protein nhắm đích sử dụng kháng thể này, và xác định sự thay đổi ở tế bào ung thư.

Vì hợp chất được liên hợp trong thể liên hợp kháng thể-độc chất gây ra tác dụng kháng u, được ưu tiên nhưng không nhất thiết là bản thân kháng thể đó cần phải có tác dụng kháng u. Cho mục đích gây ra hoạt tính gây độc tế bào đặc hiệu và chọn lọc của hợp chất kháng u đối với các tế bào khối u, quan trọng và cũng được ưu tiên là kháng thể cần có đặc tính nhập nội để di chuyển vào các tế bào khối u.

Kháng thể kháng HER2 có thể thu được bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp thường được tiến hành trong lĩnh vực này, bao gồm bước gây miễn dịch cho động vật bằng polypeptit kháng nguyên và thu gom và tinh sạch các kháng thể được sản xuất *in vivo*. Nguồn gốc của kháng nguyên không bị giới hạn ở người, và các con vật có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên thu được từ động vật không phải người như của chuột nhắt, chuột cống và các động vật tương tự. Trong trường hợp này, tính phản ứng chéo của các kháng thể liên kết với kháng nguyên khác loại thu được với kháng nguyên của người có thể được kiểm tra để sàng lọc kháng thể có thể áp dụng cho bệnh của người.

Theo cách khác, các tế bào sản xuất kháng thể mà sản xuất ra các kháng thể dựa trên kháng nguyên được dung hợp với các tế bào u tùy theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256, p. 495-497; và Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) để thiết lập các thể lai, từ đó có thể quay lại thu nhận các kháng thể đơn dòng.

Kháng nguyên có thể thu được bằng cách xử lý di truyền cho các tế bào chủ để tạo ra gen mã hóa protein kháng nguyên. Cụ thể, các vector cho phép biểu hiện gen kháng nguyên được chuẩn bị và được chuyển vào các tế bào chủ sao cho gen này được

biểu hiện. Do đó, kháng nguyên được biểu hiện này có thể được tinh sạch. Kháng thể này cũng có thể thu được bằng phương pháp gây miễn dịch cho động vật có các tế bào biểu hiện kháng nguyên đã được xử lý di truyền như nêu trên hoặc có dòng tế bào biểu hiện kháng nguyên này.

Các kháng thể kháng HER2 có thể được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể và tốt hơn nếu là, ví dụ, các kháng thể có các đặc tính như được nêu dưới đây.

(1) Kháng thể kháng HER2 có các đặc tính sau đây:

(a) liên kết đặc hiệu với HER2, và

(b) có hoạt tính nhập nội vào các tế bào biểu hiện HER2 bằng cách liên kết với HER2.

(2) Kháng thể theo điểm (1) ở trên, trong đó kháng thể này liên kết với miền ngoại bào của HER2.

(3) Kháng thể theo điểm (1) hoặc (2) ở trên, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

(4) Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (3) ở trên, trong đó kháng thể này có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cytotoxicity - ADCC) và/hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC).

(5) Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (4) ở trên, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng của chuột, kháng thể đơn dòng thể khảm, hoặc kháng thể đơn dòng được làm cho tương thích với người.

(6) Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (5) ở trên, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng được làm cho tương thích với người bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2.

(7) Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (6) ở trên, trong đó kháng thể này không có gốc lysin ở đầu carboxyl của chuỗi nặng.

(8) Kháng thể theo điểm (7) ở trên, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng chứa

trình tự axit amin chứa các gốc axit amin 1 đến 449 được nêu trong SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin 1 đến 214 được nêu trong SEQ ID NO: 2.

(9) Kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (8) ở trên, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ đã được biến nạp với vectơ biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa kháng thể; và thu gom kháng thể quan tâm từ môi trường nuôi cấy thu được ở bước trước đó.

Dưới đây, kháng thể kháng HER2 được sử dụng trong sáng chế được mô tả.

Thuật ngữ "ung thư" và "khối u" như được sử dụng trong bản mô tả được dùng với nghĩa giống nhau.

Thuật ngữ "gen" như được sử dụng trong bản mô tả không chỉ bao gồm ADN, mà còn có mRNA của nó, cADN của nó và cARN của nó.

Thuật ngữ "polynucleotit" như được sử dụng trong bản mô tả được dùng với cùng nghĩa như axit nucleic và còn bao gồm ADN, ARN, đoạn cò, oligonucleotit, và đoạn mồi.

Thuật ngữ "polypeptit", "protein" và "protein" như được sử dụng trong bản mô tả được sử dụng như nhau.

Thuật ngữ "tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả còn bao gồm các tế bào trong cá thể động vật và các tế bào được nuôi cấy.

Thuật ngữ "HER2" như được sử dụng trong bản mô tả được sử dụng với nghĩa giống như protein HER2.

Ví dụ về kháng thể kháng HER2 như được sử dụng trong bản mô tả có thể bao gồm, nhưng không giới hạn cụ thể ở, pertuzumab (công bố sáng chế quốc tế số WO 01/00245) và trastuzumab (Patent Mỹ số 5821337). Trastuzumab được ưu tiên. Tuy nhiên, kháng thể kháng HER2 theo sáng chế không bị giới hạn ở đó miễn nó là kháng thể kháng HER2 liên kết đặc hiệu với HER2, và tốt hơn nữa là có hoạt tính nhập nội vào các tế bào biểu hiện HER2 bằng cách liên kết với HER2.

Thuật ngữ "trastuzumab" như được sử dụng trong bản mô tả còn được gọi là HERCEPTIN(R), huMAb4D5-8, hoặc rhuMAb4D5-8 và là kháng thể được làm cho tương thích với người bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit



amin 1 đến 449 được nêu trong SEQ ID NO: 1 (Fig. 1) và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin 1 đến 214 được nêu trong SEQ ID NO: 2 (Fig. 2).

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" như được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là liên kết không phải là sự hấp phụ không đặc hiệu. Ví dụ về tiêu chuẩn để xác định liên kết có đặc hiệu hay không có thể bao gồm hằng số phân ly (sau đây được gọi là "KD"). Giá trị KD của kháng thể đối với protein HER2 tốt hơn là bằng  $1 \times 10^{-5}$  M hoặc nhỏ hơn,  $5 \times 10^{-6}$  M hoặc nhỏ hơn,  $2 \times 10^{-6}$  M hoặc nhỏ hơn, hoặc  $1 \times 10^{-6}$  M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa nếu là  $5 \times 10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn,  $2 \times 10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn, hoặc  $1 \times 10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nếu bằng  $5 \times 10^{-8}$  M hoặc nhỏ hơn,  $2 \times 10^{-8}$  M hoặc nhỏ hơn, hoặc  $1 \times 10^{-8}$  M hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất nếu bằng  $5 \times 10^{-9}$  M hoặc nhỏ hơn,  $2 \times 10^{-9}$  M hoặc nhỏ hơn, hoặc  $1 \times 10^{-9}$  M hoặc nhỏ hơn. Liên kết giữa protein HER2 và kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như cộng hưởng plasmon bề mặt, ELISA, hoặc RIA.

Thuật ngữ "CDR" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR). Được biết rằng mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể có ba vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining regions - CDRs). CDR còn được gọi là miền siêu biến, và có mặt trong vùng biến đổi của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Nó là vị trí có tính biến đổi cao bất thường ở cấu trúc cơ sở của nó, và có ba CDR riêng biệt trong cấu trúc cơ sở này của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của polypeptit. Trong bản mô tả này, đối với các CDR của kháng thể, các CDR của chuỗi nặng được thể hiện bằng CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ phía đầu amin của trình tự axit amin của chuỗi nặng, và các CDR của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ phía đầu amin của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ. Các vị trí này nằm gần nhau trong cấu trúc bậc ba và quyết định tính đặc hiệu đối với kháng nguyên mà kháng thể liên kết với.

Cụm từ "bước lai hóa được thực hiện trong điều kiện nghiêm ngặt" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ quy trình trong đó việc thực hiện sự lai hóa là dưới các điều kiện ở đó có thể thu được sự nhận diện bằng cách lai ở  $68^{\circ}\text{C}$  trong dung dịch lai ExpressHyb Hybridization Solution có bán trên thị trường (Clontech, Inc. sản xuất) hoặc bằng cách thực hiện lai ở  $68^{\circ}\text{C}$  trong điều kiện có mặt NaCl nồng độ 0,7 đến 1,0 M sử dụng bộ lọc có ADN được cố định trên đó, sau đó rửa ở  $63^{\circ}\text{C}$  sử dụng 0,1 đến 2 x dung dịch SSC (1 x dung dịch SSC bao gồm NaCl 150 mM và natri xitrat 15 mM)

hoặc dưới các điều kiện tương đương với các điều kiện này.

## 1. HER2

HER2 là một trong số các sản phẩm gen gây ung thư của gen gây ung thư thụ thể yếu tố tăng trưởng điển hình được nhận biết là gen gây ung thư liên quan đến thụ thể yếu tố tăng trưởng tế bào biểu bì 2 của người, và là protein thụ thể xuyên màng có phân tử lượng là 185 kDa và có miền tyrosin kinaza. HER2 là thành viên của họ EGFR bao gồm HER1 (EGFR, ErbB-1), HER2 (neu, ErbB-2), HER3 (ErbB-3), và HER4 (ErbB-4) và được biết là được phosphoryl hóa tự động ở gốc tyrosin nội bào bởi sự hình thành homodime hoặc sự tạo thành heterodime với thụ thể EGFR khác HER1, HER3, hoặc HER4 và tự được hoạt hóa theo cách đó, nhờ đó đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển, biệt hóa, và khả năng sống sót của tế bào ở các tế bào bình thường và các tế bào khối u.

Về protein HER2 được sử dụng trong sáng chế, protein HER2 có thể được tinh sạch trực tiếp từ các tế bào biểu hiện HER2 của người hoặc động vật có vú không phải người (như chuột cống hoặc chuột nhắt) và được sử dụng, hoặc phần màng tế bào của các tế bào nêu trên có thể được thu nhận và sử dụng. Ngoài ra, HER2 có thể thu được bằng quá trình tổng hợp in vitro của nó hoặc quá trình sản xuất nó trong tế bào chủ thông qua việc xử lý di truyền. Trong việc xử lý di truyền, cụ thể, sau khi cADN của HER2 được kết hợp vào vector có khả năng biểu hiện cADN HER2, protein HER2 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch chứa enzym, cơ chất và chất tạo năng lượng cần cho sự phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện HER2 ở tế bào chủ được biến nạp dạng không nhân hoặc nhân chuẩn khác. Theo cách khác, các tế bào biểu hiện HER2 đã được xử lý di truyền nêu trên, hoặc dòng tế bào biểu hiện HER2 có thể được sử dụng làm protein HER2.

Trình tự ADN và trình tự axit amin của HER2 được bộc lộ trên cơ sở dữ liệu chung, và có thể được đề cập đến, ví dụ, với số nộp lưu M11730 (GenBank), NP\_004439.2 (NCBI), hoặc tương tự.

Ngoài ra, protein chứa trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin được thế, được xóa và/hoặc được bổ sung trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trên của HER2 và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của protein này cũng được bao gồm trong HER2.

Protein HER2 của người bao gồm trình tự tín hiệu chứa đầu N có 22 gốc axit amin, miền ngoại bào chứa 630 gốc axit amin, miền xuyên màng chứa 23 gốc axit amin, và miền nội bào chứa 580 gốc axit amin.

## 2. Sản xuất kháng thể kháng HER2

Kháng thể kháng HER2 theo sáng chế có thể thu được theo, ví dụ, phương pháp thường được tiến hành trong lĩnh vực này, bao gồm bước gây miễn dịch cho động vật bằng HER2 hoặc polypeptit tùy ý được chọn từ trình tự axit amin của HER2 và thu gom và tinh sạch các kháng thể được sản xuất *in vivo*. Dạng sinh học của HER2 được sử dụng làm kháng nguyên không bị giới hạn ở người, và động vật có thể được gây miễn dịch bằng HER2 thu được từ động vật không phải người như chuột nhắt hoặc chuột cống hoặc vó b bằng p185neu của chuột cống. Trong trường hợp này, bằng cách kiểm tra tính phản ứng chéo giữa kháng thể liên kết với HER2 khác loài thu được và HER2 của người, có thể chọn ra kháng thể áp dụng được cho bệnh của người.

Ngoài ra, có thể thu được kháng thể đơn dòng từ thể lai được tạo ra bởi sự dung hợp các tế bào sản xuất kháng thể này mà tạo ra kháng thể kháng HER2 với các tế bào u tùy theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler and Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

HER2 được sử dụng làm kháng nguyên có thể thu được bằng cách biểu hiện gen HER2 trong tế bào chủ sử dụng phương pháp xử lý di truyền.

Cụ thể, vector có khả năng biểu hiện gen HER2 được tạo ra, và vector thu được được chuyển nhiễm vào tế bào chủ để biểu hiện gen, và sau đó, HER2 đã được biểu hiện được tinh sạch.

Theo cách khác, các tế bào biểu hiện HER2 đã được xử lý di truyền nêu trên, hoặc dòng tế bào biểu hiện HER2 có thể được sử dụng làm protein HER2. Kháng thể kháng HER2 có thể thu được bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Sau đây, phương pháp thu nhận kháng thể kháng HER2 được mô tả cụ thể.

### (1) Chuẩn bị kháng nguyên

Ví dụ về kháng nguyên được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng HER2 bao gồm HER2, hoặc polypeptit chứa trình tự axit amin một phần có ít nhất 6 axit amin

liên tiếp của HER2, hoặc dẫn xuất thu được bằng cách thêm trình tự axit amin hoặc chất mang xác định vào đó.

HER2 có thể được tinh sạch trực tiếp từ mô khối u hoặc các tế bào khối u của người và được sử dụng. Ngoài ra, HER2 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó *in vitro* hoặc bằng cách sản xuất nó trong tế bào chủ bằng phương pháp xử lý di truyền.

Về phương pháp xử lý di truyền, cụ thể, sau khi cADN của HER2 được kết hợp vào vectơ có khả năng biểu hiện cADN của HER2, HER2 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch chứa enzym, cơ chất và chất tạo năng lượng cần để phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện HER2 trong tế bào chủ được biến nạp dạng không nhân hoặc có nhân chuẩn.

Ngoài ra, kháng nguyên còn có thể thu được ở dạng protein tiết bằng cách biểu hiện protein dung hợp thu được từ việc gắn miền ngoại bào của HER2, là protein màng, với vùng không đổi của kháng thể trong hệ vật chủ-vectơ thích hợp.

cADN của HER2 có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp được gọi là phương pháp PCR trong đó phản ứng chuỗi polymeraza được thực hiện bằng cách sử dụng thư viện cADN biểu hiện cADN của HER2 làm khuôn và các đoạn mồi khuếch đại đặc hiệu cADN của HER2 (PCR; Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489).

Về quy trình tổng hợp polypeptit *in vitro*, ví dụ, hệ dịch mã nhanh (Rapid Translation System - RTS) do Roche Diagnostics, Inc. sản xuất có thể được lấy làm ví dụ, nhưng không giới hạn ở đó.

Ví dụ về các tế bào chủ không nhân bao gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*. Để biến nạp các tế bào chủ với gen nhắm đích, các tế bào chủ được biến nạp bằng vectơ plasmit chứa đơn vị sao chép, nghĩa là, nguồn gốc sao chép thu được từ các loài tương thích với vật chủ, và trình tự điều hòa. Ngoài ra, vectơ này tốt hơn là có trình tự có khả năng áp tính chọn lọc kiểu hình lên tế bào được biến nạp.

Ví dụ về các tế bào chủ có nhân chuẩn bao gồm tế bào của động vật có xương sống, tế bào côn trùng, và tế bào nấm men. Về các tế bào của động vật có xương sống, ví dụ, các tế bào COS của khỉ (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175- 182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), các nguyên bào sợi của chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và chủng thiếu dihydrofolat reductaza (Urlaub, G.

và Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) của các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61); và các tế bào tương tự thường được sử dụng, tuy nhiên, các tế bào không bị giới hạn ở đó.

Thế biến nạp thu được từ đó có thể được nuôi cấy theo phương pháp thường được tiến hành trong lĩnh vực này, và bằng cách nuôi cấy thế biến nạp này, polypeptit nhắm đích được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào.

Môi trường thích hợp được sử dụng để nuôi cấy có thể được chọn từ nhiều môi trường nuôi cấy thường được sử dụng khác nhau tùy vào các tế bào chủ được sử dụng. Nếu sử dụng *Escherichia coli*, ví dụ, môi trường LB có bổ sung chất kháng sinh như ampicilin hoặc IPMG khi cần có thể được sử dụng.

Protein tái tổ hợp được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào bằng thế biến nạp thông qua việc nuôi cấy này có thể được phân tách và tinh sạch bằng nhiều phương pháp phân tách khác nhau đã biết sử dụng tính chất vật lý hoặc hóa học của protein.

Ví dụ cụ thể về các phương pháp này bao gồm điều trị bằng chất làm kết tủa protein thông thường, siêu lọc, các kiểu sắc ký lỏng khác nhau như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, và sắc ký ái lực, thẩm tách, và kết hợp các phương pháp này.

Ngoài ra, bằng cách gắn thẻ của sáu gốc histidin vào protein tái tổ hợp cần được biểu hiện, protein này có thể được tinh sạch hiệu quả bằng cột ái lực niken. Theo cách khác, bằng cách gắn vùng Fc của IgG vào protein tái tổ hợp cần được biểu hiện, protein này có thể được tinh sạch hiệu quả bằng cột protein A.

Bằng cách kết hợp các phương pháp nêu trên, lượng lớn polypeptit nhắm đích có thể dễ dàng được sản xuất với hiệu suất cao và độ tinh khiết cao.

Thế biến nạp nêu trên tự nó có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Dòng tế bào biểu hiện HER2 cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Ví dụ về dòng tế bào này có thể bao gồm dòng ung thư vú của người SK-BR-3, BT-474, KPL-4, và JIMT-1, dòng ung thư dạ dày của người NCI-N87, và dòng ung thư buồng trứng của người SK-OV-3. Dòng tế bào theo sáng chế không bị giới hạn ở các dòng tế bào này miễn là nó biểu hiện HER2.

## (2) Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng HER2

Ví dụ về kháng thể liên kết đặc hiệu với HER2 bao gồm kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với HER2, và phương pháp thu nhận kháng thể này được mô tả dưới đây.

Quy trình sản xuất kháng thể đơn dòng thường đòi hỏi các bước thao tác bao gồm:

(a) tinh sạch polyme sinh học cần được sử dụng làm kháng nguyên, hoặc tạo ra các tế bào biểu hiện kháng nguyên;

(b) tạo ra các tế bào sản xuất kháng thể bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng cách tiêm kháng nguyên, thu gom máu, phân tích hiệu giá kháng thể của nó để xác định khi nào cắt được lá lách;

(c) thu các tế bào u tủy (sau đây được gọi là "u tủy");

(d) dung hợp các tế bào sản xuất kháng thể với u tủy;

(e) sàng lọc nhóm các thể lai sản xuất kháng thể mong muốn;

(f) chia các thể lai này thành các dòng tế bào đơn (tách dòng);

(g) tùy ý, nuôi cấy thể lai hoặc nuôi động vật được cấy thể lai này để sản xuất lượng lớn kháng thể đơn dòng;

(h) kiểm tra hoạt tính sinh học và tính đặc hiệu liên kết ở kháng thể đơn dòng được sản xuất từ đó, hoặc phân tích các đặc tính như chất thử được đánh dấu ở kháng thể này; và tương tự.

Sau đây, phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả chi tiết theo các bước nêu trên, tuy nhiên, phương pháp không bị giới hạn ở đó, và, ví dụ, các tế bào sản xuất kháng thể không phải tế bào lá lách và u tủy cũng có thể được sử dụng.

(a) Tinh sạch kháng nguyên

Làm kháng nguyên, HER2 thu được bằng phương pháp như được nêu ở trên hoặc peptit một phần của nó có thể được sử dụng.

Ngoài ra, phần màng thu được từ các tế bào tái tổ hợp biểu hiện HER2 hoặc các tế bào tái tổ hợp tự biểu hiện HER2, và cả peptit một phần của protein theo sáng chế được tổng hợp hóa học bằng phương pháp đã biết với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

Ngoài ra, dòng tế bào biểu hiện HER2 cũng có thể được sử dụng làm kháng

nguyên.

(b) Thu các tế bào sản xuất kháng thể

Kháng nguyên thu được ở bước (a) được trộn với tá dược như tá dược Freund hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh hoặc chất bổ trợ như nhôm kali sulfat và hỗn hợp thu được được sử dụng làm chất sinh miễn dịch để gây miễn dịch cho động vật thử nghiệm. Phương pháp khác bao gồm bước gây miễn dịch cho động vật thử nghiệm bằng các tế bào biểu hiện kháng nguyên dùng làm chất sinh miễn dịch. Để làm động vật thử nghiệm, động vật bất kỳ được sử dụng trong phương pháp sản xuất thể lai đã biết có thể được sử dụng mà không gặp trở ngại nào. Cụ thể, ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, dê, cừu, gia súc, ngựa, hoặc các con vật tương tự có thể được sử dụng. Tuy nhiên, từ quan điểm về tính sẵn có của các tế bào u tủy được dung hợp với các tế bào sản xuất kháng thể đã tách, tốt hơn là chuột nhắt hoặc chuột cống được sử dụng làm động vật được gây miễn dịch.

Ngoài ra, chủng của chuột nhắt hoặc chuột cống cần được sử dụng không bị giới hạn cụ thể, và trong trường hợp là chuột nhắt, ví dụ, nhiều chủng khác nhau như A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, và 129 và chủng tương tự có thể được sử dụng, và trong trường hợp là chuột cống, ví dụ, Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer và chủng tương tự có thể được sử dụng.

Các con chuột nhắt và chuột cống này có bán trên thị trường từ các nhà nhân giống/nhà phân phối động vật thử nghiệm, ví dụ, CLEA Japan, Inc. và Charles River Laboratories Japan, Inc.

Để làm động vật được gây miễn dịch, khi xem xét tính tương thích của việc dung hợp với các tế bào u tủy được nêu dưới đây, trong trường hợp là chuột nhắt, chủng BALB/c, và trong trường hợp là chuột cống, chủng Wistar và Low được đặc biệt ưu tiên.

Ngoài ra, khi xem xét tính đồng nhất kháng nguyên giữa người và chuột nhắt, cũng ưu tiên sử dụng chuột nhắt có chức năng sinh học bị giảm để loại bỏ các kháng thể tự động, tức là, chuột nhắt mắc bệnh tự miễn.

Tuổi của các con chuột nhắt hoặc chuột cống này tại thời điểm gây miễn dịch tốt

hơn là từ 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn nữa là từ 6 đến 8 tuần tuổi.

Để gây miễn dịch cho động vật bằng HER2 hoặc thể tái tổ hợp của nó, ví dụ, phương pháp đã biết được nêu chi tiết dưới đây, ví dụ, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng.

Trong số các phương pháp gây miễn dịch này, phương pháp cụ thể được ưu tiên theo sáng chế là, ví dụ, như sau.

Đầu tiên, đưa vào động vật phần màng protein đóng vai trò làm kháng nguyên hoặc các tế bào được làm cho biểu hiện kháng nguyên qua đường trong da hoặc trong màng bụng. Tuy nhiên, sự kết hợp cả hai con đường sử dụng được ưu tiên để tăng hiệu quả gây miễn dịch, và khi thực hiện việc đưa vào qua đường trong da ở nửa đầu và đưa vào qua đường trong màng bụng ở nửa sau của liều hoặc chỉ ở liều dùng cuối, hiệu quả gây miễn dịch có thể được tăng đặc biệt.

Phác đồ sử dụng kháng nguyên thay đổi tùy vào loài động vật được gây miễn dịch, sự khác biệt riêng hoặc tương tự. Tuy nhiên, nói chung, phác đồ sử dụng trong đó tần suất sử dụng kháng nguyên là 3 đến 6 lần và khoảng nghỉ giữa các liều là 2 đến 6 tuần được ưu tiên, và phác đồ sử dụng trong đó tần suất sử dụng kháng nguyên là 3 đến 4 lần và khoảng nghỉ giữa các liều là 2 đến 4 tuần được ưu tiên hơn.

Ngoài ra, liều kháng nguyên thay đổi tùy vào loài động vật, sự khác biệt riêng hoặc tương tự, tuy nhiên, liều này thường được quy định từ 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là từ khoảng 0,1 đến 0,5 mg.

Việc gây miễn dịch tăng cường được thực hiện từ 1 đến 6 tuần, tốt hơn là 1 đến 4 tuần, tốt hơn nữa là 1 đến 3 tuần sau khi sử dụng kháng nguyên như nêu trên. Khi chất sinh miễn dịch là tế bào,  $1 \times 10^6$  đến  $1 \times 10^7$  tế bào được sử dụng.

Liều kháng nguyên tại thời điểm thực hiện gây miễn dịch tăng cường thay đổi tùy vào loài hoặc kích thước động vật hoặc yếu tố tương tự, tuy nhiên, trong trường hợp là, ví dụ, chuột nhắt, liều này thường được quy định ở 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là từ 0,1 đến 0,5 mg, tốt hơn nữa là khoảng từ 0,1 đến 0,2 mg. Khi chất sinh miễn dịch là tế



bào,  $1 \times 10^6$  đến  $1 \times 10^7$  tế bào được sử dụng.

Các tế bào lách hoặc lympho bào bao gồm các tế bào sản xuất kháng thể được lấy vô trùng từ động vật được gây miễn dịch sau 1 đến 10 ngày, tốt hơn là 2 đến 5 ngày, tốt hơn nữa là 2 đến 3 ngày từ khi gây miễn dịch tăng cường. Lúc này, hiệu giá kháng thể được đo, và nếu động vật có hiệu giá kháng thể tăng đủ được sử dụng làm nguồn cung các tế bào sản xuất kháng thể, quy trình sau đó có thể được tiến hành hiệu quả hơn.

Ví dụ về phương pháp đo hiệu giá kháng thể được sử dụng ở đây bao gồm phương pháp RIA và phương pháp ELISA, nhưng phương pháp không bị giới hạn ở đó. Ví dụ, nếu sử dụng phương pháp ELISA, việc đo hiệu giá kháng thể trong sáng chế có thể được tiến hành theo các quy trình được nêu dưới đây.

Trước tiên, kháng nguyên đã được tinh sạch hoặc tinh sạch một phần được hấp phụ lên bề mặt của pha rắn như đĩa 96 giếng đối với ELISA, và bề mặt của pha rắn không có kháng nguyên được hấp phụ lên đó được phủ protein không liên quan đến kháng nguyên như albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA). Sau khi rửa bề mặt, bề mặt được cho tiếp xúc với mẫu được pha loãng theo dãy (ví dụ, huyết thanh của chuột nhắt) làm kháng thể bậc một để cho phép kháng thể trong mẫu liên kết với kháng nguyên.

Tiếp theo, để dùng làm kháng thể bậc hai, kháng thể được đánh dấu bằng enzym kháng lại kháng thể của chuột nhắt được bổ sung và được cho liên kết với kháng thể của chuột nhắt. Sau khi rửa, cơ chất của enzym được bổ sung và sự thay đổi độ hấp thụ xảy ra do sự phát triển màu gây ra bởi sự phân rã cơ chất hoặc yếu tố tương tự được đo và hiệu giá kháng thể được tính dựa trên phép đo này.

Việc phân tách các tế bào sản xuất kháng thể từ các tế bào lách hoặc lympho bào của động vật được gây miễn dịch có thể được tiến hành theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495). Ví dụ, trong trường hợp là tế bào lách, có thể sử dụng phương pháp tổng quát trong đó các tế bào sản xuất kháng thể được tách bằng cách làm đồng nhất lá lách để thu được các tế bào thông qua bước lọc bằng lưới thép không gỉ và tạo huyền phù các tế bào trong môi trường cần thiết tối thiểu Eagle (MEM).

## (c) Thu tế bào u tủy (sau đây được gọi là "u tủy")

Các tế bào u tủy được sử dụng để dung hợp tế bào không bị giới hạn cụ thể và các tế bào thích hợp có thể được chọn từ các dòng tế bào đã biết. Tuy nhiên, khi xem xét về tính thuận lợi nếu thể lai được chọn từ các tế bào dung hợp, ưu tiên sử dụng chủng thiếu hụt HGPRT (hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferaza) có quy trình chọn lọc đã được thiết lập.

Cụ thể hơn, ví dụ về chủng thiếu hụt HGPRT bao gồm X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0- Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, và BU.1 có nguồn gốc từ chuột nhắt; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) có nguồn gốc từ chuột cống; và U266AR(SKO-007), GM1500.GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) và 8226AR/NIP4-1(NP41) có nguồn gốc từ người. Các chủng thiếu hụt HGPRT là có sẵn từ, ví dụ, ATCC hoặc tương tự.

Các chủng tế bào này được cấy chuyển vào môi trường thích hợp như môi trường 8-azaguanin (môi trường này thu được bằng cách bổ sung 8-azaguanin vào môi trường RPMI 1640 có bổ sung glutamin, 2-mercaptoetanol, gentamixin, và huyết thanh thai bê (sau đây gọi là "FCS")), môi trường Dulbecco cải biến Iscove (sau đây gọi là "IMDM"), hoặc môi trường Eagle cải biến Dulbecco (sau đây gọi là "DMEM"). Trong trường hợp này, 3 đến 4 ngày trước khi thực hiện dung hợp tế bào, các tế bào được cấy chuyển vào môi trường thông thường (ví dụ, môi trường ASF104 (được sản xuất bởi Ajinomoto Co., Ltd.) chứa FCS 10%) để đảm bảo có không ít hơn  $2 \times 10^7$  tế bào vào ngày dung hợp tế bào.

## (d) Dung hợp tế bào

Việc dung hợp giữa các tế bào sản xuất kháng thể và các tế bào u tủy có thể được thực hiện thích hợp theo phương pháp đã biết (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), v.v.), ở các điều kiện sao cho tỷ lệ sống sót của các tế bào không bị giảm quá mức.

Về phương pháp như vậy, ví dụ, phương pháp hóa học trong đó các tế bào sản xuất kháng thể và các tế bào u tủy được trộn trong dung dịch chứa polyme như

polyetylen glycol ở nồng độ cao, phương pháp vật lý sử dụng phép kích điện, hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng. Trong số các phương pháp này, ví dụ cụ thể về phương pháp hóa học được nêu dưới đây.

Tức là, trong trường hợp polyetylen glycol được sử dụng trong dung dịch chứa polyme ở nồng độ cao, các tế bào sản xuất kháng thể và các tế bào u tủy được trộn trong dung dịch polyetylen glycol có phân tử lượng từ 1500 đến 6000, tốt hơn nữa là từ 2000 đến 4000 ở nhiệt độ từ 30 đến 40°C, tốt hơn là từ 35 đến 38°C trong thời gian từ 1 đến 10 phút, tốt hơn là từ 5 đến 8 phút.

(e) Lựa chọn nhóm các thể lai

Phương pháp lựa chọn thể lai thu được bởi tế bào dung hợp nêu trên không bị giới hạn cụ thể. Thông thường, phương pháp lựa chọn HAT (hypoxanthin, aminopterin, thymidin) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550) được sử dụng.

Phương pháp này có hiệu quả khi các thể lai thu được bằng cách sử dụng các tế bào u tủy của chủng thiếu hụt HGPRT mà không thể sống sót khi có mặt aminopterin. Tức là, bằng cách nuôi cấy các tế bào chưa dung hợp và thể lai trong môi trường HAT, chỉ các thể lai kháng aminopterin được cho sống sót và tăng sinh chọn lọc.

(f) Sự phân chia thành dòng tế bào đơn (tách dòng)

Về phương pháp tách dòng đối với các thể lai, phương pháp đã biết như phương pháp metylxenluloza, phương pháp agarosa mềm, hoặc phương pháp pha loãng giới hạn có thể được sử dụng (xem, ví dụ, Barbara, B. M. và Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Trong số các phương pháp này, cụ thể, phương pháp nuôi cấy ba chiều như phương pháp metylxenluloza được ưu tiên. Ví dụ, nhóm các thể lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào được tạo huyền phù trong môi trường metylxenluloza như Môi trường chọn lọc ClonaCell-HY D (được sản xuất bởi StemCell Technologies, Inc., #03804) và được nuôi cấy. Sau đó, các khuẩn lạc thể lai đã hình thành được gom lại, nhờ đó có thể thu được các thể lai đơn dòng. Các khuẩn lạc thể lai tương ứng được thu gom được nuôi cấy, và thể lai được xác nhận là có hiệu giá kháng thể ổn định trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thể lai thu được được chọn làm chủng thể lai sản xuất kháng thể đơn dòng HER2.

(g) Thu kháng thể đơn dòng bằng cách nuôi cấy thể lai

Bằng cách nuôi cấy thể lai đã chọn, có thể thu kháng thể đơn dòng một cách hiệu quả. Tuy nhiên, trước khi nuôi cấy, ưu tiên thực hiện sàng lọc thể lai sản xuất kháng thể đơn dòng nhắm đích.

Trong bước sàng lọc này, phương pháp đã biết có thể được sử dụng.

Phép đo hiệu giá kháng thể theo sáng chế có thể được tiến hành bằng, ví dụ, phương pháp ELISA được giải thích trong mục (b) nêu trên.

Thể lai thu được bằng phương pháp nêu trên có thể được bảo quản ở trạng thái kết đông trong nitơ lỏng hoặc trong máy làm đông ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn.

Sau khi tách dòng xong, môi trường được thay đổi từ môi trường HT thành môi trường thông thường, và thể lai được nuôi cấy.

Việc nuôi cấy quy mô lớn được thực hiện bằng nuôi cấy quay sử dụng chai nuôi cấy lớn hoặc bằng nuôi cấy lắc. Từ dịch nổi bề mặt thu được bằng việc nuôi cấy quy mô lớn này, kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với protein theo sáng chế có thể thu được bằng cách tinh sạch sử dụng phương pháp đã biết với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này như phương pháp lọc gel.

Ngoài ra, thể lai được tiêm vào khoang bụng của chuột nhắt của cùng một chủng như thể lai (ví dụ, BALB/c nêu trên) hoặc Nu/Nu của chuột nhắt để làm tăng sinh thể lai, từ đó có thể nhận được các cổ trướng chứa lượng lớn kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Trường hợp thể lai được sử dụng trong khoang bụng, nếu dầu khoáng như 2,6,10,14-tetrametyl pentadecan (pristan) được sử dụng từ 3 đến 7 ngày trước đó, có thể thu được lượng lớn cổ trướng.

Ví dụ, chất ức chế miễn dịch được tiêm trước đó vào khoang bụng của chuột của cùng một chủng như thể lai để bất hoạt các tế bào T. 20 ngày sau,  $10^6$  đến  $10^7$  tế bào dòng thể lai được tạo huyền phù trong môi trường không chứa huyết thanh (0,5 ml), và dịch huyền phù được đưa vào trong khoang bụng của chuột nhắt. Nhìn chung, khi bụng bị trương phình và chứa đầy cổ trướng, các cổ trướng này được gom lại từ chuột nhắt. Bằng phương pháp này, kháng thể đơn dòng có thể thu được ở nồng độ bằng khoảng 100 lần hoặc cao hơn nồng độ trong dung dịch nuôi cấy.

Kháng thể đơn dòng thu được bằng phương pháp nêu trên có thể được tinh sạch bằng phương pháp được mô tả trong, ví dụ, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

Kháng thể đơn dòng thu được từ đó có tính đặc hiệu kháng nguyên cao đối với HER2. Ví dụ về kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kháng thể đơn dòng của chuột nhắt 4D5 (ATCC CRL 10463).

#### (h) Phân tích kháng thể đơn dòng

Isotyp và lớp phụ của kháng thể đơn dòng thu được từ ở trên có thể được xác định như sau.

Trước tiên, ví dụ về phương pháp nhận diện bao gồm phương pháp Ouchterlony, phương pháp ELISA, và phương pháp RIA.

Phương pháp Ouchterlony là phương pháp đơn giản, nhưng khi nồng độ của kháng thể đơn dòng thấp, cần đến bước ngưng tụ.

Mặt khác, khi sử dụng phương pháp ELISA hoặc phương pháp RIA, bằng cách cho dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy phản ứng trực tiếp với pha rắn được hấp phụ kháng nguyên và sử dụng các kháng thể tương ứng với các kiểu isotyp globulin miễn dịch khác nhau và các lớp phụ ở dạng kháng thể bậc hai, isotyp và lớp phụ của kháng thể đơn dòng có thể được nhận diện.

Ngoài ra, với phương pháp đơn giản hơn, kit nhận diện có bán trên thị trường (ví dụ, Mouse Typer Kit được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) hoặc phương pháp tương tự cũng có thể được sử dụng.

Tiếp theo, việc xác định định lượng protein có thể được thực hiện bằng phương pháp Folin Lowry và phương pháp tính dựa trên độ hấp thụ ở 280 nm ( $1,4 \text{ (OD 280)} = \text{globulin miễn dịch } 1 \text{ mg/ml}$ ).

Tiếp theo, ngay cả khi kháng thể đơn dòng được thu nhận một cách riêng rẽ và độc lập bằng cách thực hiện lại các bước từ (a) đến (h) trong (2), có thể thu được kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương tự với hoạt tính của kháng thể HER2 thu được ở bước (g). Làm ví dụ cho kháng thể này, kháng thể liên kết với cùng epitop như kháng thể HER2 thu được ở bước (g) có thể được lấy làm ví dụ. Nếu kháng thể đơn dòng được sản xuất mới liên kết với peptit một phần hoặc cấu trúc bậc ba một phần mà

kháng thể kháng HER2 liên kết với, có thể xác định rằng kháng thể đơn dòng này liên kết với cùng epitop như kháng thể kháng HER2. Ngoài ra, bằng cách xác nhận rằng kháng thể đơn dòng cạnh tranh với kháng thể kháng HER2 đối với liên kết với HER2 (tức là, kháng thể đơn dòng ức chế liên kết giữa kháng thể kháng HER2 và HER2), có thể xác định rằng kháng thể đơn dòng này liên kết với cùng epitop như kháng thể kháng HER2 ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc epitop cụ thể không xác định được. Khi xác nhận rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng epitop như kháng thể kháng HER2, kháng thể đơn dòng này rất được mong đợi là có ái lực liên kết kháng nguyên hoặc hoạt tính sinh học tương tự với ái lực liên kết kháng nguyên hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể kháng HER2.

### (3) Các kháng thể khác

Kháng thể theo sáng chế không chỉ bao gồm kháng thể đơn dòng kháng HER2 nêu trên mà còn cả các kháng thể tái tổ hợp thu được bằng sự cải biến nhân tạo cho mục đích làm giảm tính kháng nguyên khác loài ở người như kháng thể khảm, kháng thể được làm cho tương thích với người và kháng thể của người. Các kháng thể này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đã biết.

Làm kháng thể khảm, kháng thể trong đó vùng biến đổi và vùng không đổi của kháng thể thu được từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể khảm trong đó vùng biến đổi của kháng thể thu được từ chuột nhắt hoặc từ chuột cống được gắn với vùng không đổi của kháng thể thu được từ người có thể được lấy làm ví dụ (xem Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 31, 6851-6855, (1984)). Ví dụ về kháng thể khảm theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, kháng thể khảm 4D5 chứa vùng không đổi chuỗi nặng của IgG1 hoặc IgG2 của người.

Làm kháng thể được làm cho tương thích với người, kháng thể thu được bằng cách kết hợp chỉ vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) với kháng thể thu được từ người (xem Nature (1986) 321, pp. 522-525), và kháng thể thu được bằng cách ghép phần gốc axit amin của khung cũng như trình tự CDR với kháng thể của người bằng phương pháp ghép CDR (WO 90/07861), và kháng thể được làm cho tương thích với người sử dụng phương pháp gây đột biến chuyển hóa gen (US 5821337) có thể được lấy làm ví dụ.

Thuật ngữ "một vài" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ từ 1 đến 10, 1 đến 9,

1 đến 8, 1 đến 7, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2.

Để làm phần thể axit amin trong bản mô tả, phần thể axit amin bảo toàn được ưu tiên. Phần thể axit amin bảo toàn chỉ phần thể xuất hiện trong nhóm axit amin liên quan đến mạch bên axit amin. Các nhóm axit amin được ưu tiên là như sau: nhóm có tính axit (axit aspartic và axit glutamic); nhóm có tính bazơ (lysin, arginin, và histidin); nhóm không phân cực (alanin, valin, loxin, isoloxin, prolin, phenylalanin, methionin, và tryptophan); và họ phân cực không mang điện tích (glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, và tyrosin). Các nhóm axit amin được ưu tiên hơn là như sau: nhóm hydroxy béo (serin và threonin); nhóm chứa amit (asparagin và glutamin); nhóm béo (alanin, valin, loxin, và isoloxin); và nhóm thơm (phenylalanin, tryptophan, và tyrosin). Việc thay thế axit amin này tốt hơn là được thực hiện trong phạm vi không làm giảm các đặc tính của cơ chất có trình tự axit amin ban đầu.

Bằng cách kết hợp trình tự có độ tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trên với trình tự có độ tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trên, có thể chọn lọc kháng thể có hoạt tính sinh học tương tự với hoạt tính sinh học của mỗi trong số các kháng thể nêu trên. Độ tương đồng này thường là tương đồng 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là tương đồng 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là tương đồng 95% hoặc cao hơn, tốt nhất là tương đồng 99% hoặc cao hơn. Ngoài ra, bằng cách kết hợp trình tự axit amin trong đó từ một đến một vài gốc axit amin được thế, được xóa hoặc được bổ sung trong trình tự axit amin chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, cũng có thể chọn lọc kháng thể có hoạt tính sinh học tương tự với hoạt tính sinh học của mỗi trong số các kháng thể nêu trên. Thuật ngữ "độ tương đồng" như được sử dụng trong bản mô tả được sử dụng với nghĩa giống như "độ đồng nhất".

Độ tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định sử dụng các thông số mặc định của thuật toán Blast bản 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, và David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST và PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Thuật toán Blast có thể được sử dụng cả qua Internet bằng cách truy cập vào trang [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể của người liên kết với

HER2. Kháng thể của người kháng HER2 chỉ kháng thể của người chỉ có trình tự của kháng thể thu được từ bộ nhiễm sắc thể của người. Kháng thể của người kháng HER2 có thể thu được bằng phương pháp sử dụng chuột nhất sản xuất kháng thể của người có đoạn nhiễm sắc thể của người chứa các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của người (xem Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, pp. 722-727, v.v.).

Chuột nhất sản xuất kháng thể của người này có thể được tạo ra cụ thể như sau. Động vật biến đổi gen trong đó ở gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch nội sinh được làm gãy, và thay vào đó, ở gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch của người được đưa vào nhờ vector nhiễm sắc thể nhân tạo từ nấm men (YAC) hoặc tương tự được tạo ra bằng cách tạo ra động vật mang gen bất hoạt và động vật chuyển gen và cho các con vật này giao phối với nhau.

Ngoài ra, theo kỹ thuật ADN tái tổ hợp, bằng cách sử dụng cADN mã hóa mỗi trong số chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của người, và tốt hơn là vector chứa cADN, các tế bào có nhân chuẩn được biến nạp, và tế bào biến nạp sản xuất kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người được nuôi cấy, nhờ đó kháng thể còn có thể thu được từ dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy.

Trong bản mô tả, để làm vật chủ, ví dụ, các tế bào nhân chuẩn, tốt hơn là các tế bào động vật có vú như các tế bào CHO, lympho bào, hoặc các tế bào u tủy có thể được sử dụng.

Ngoài ra, phương pháp thu nhận kháng thể của người thu được từ việc bộc lộ trên thể thực khuẩn được chọn từ thư viện kháng thể của người (xem Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.) cũng đã biết.

Ví dụ, phương pháp bộc lộ trên thể thực khuẩn trong đó vùng biến đổi của kháng thể của người được biểu hiện trên bề mặt của thể thực khuẩn ở dạng kháng thể chuỗi



đơn (scFv), và thể thực khuẩn liên kết với kháng nguyên được chọn (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116) có thể được sử dụng.

Bằng cách phân tích gen của thể thực khuẩn đã được chọn dựa trên sự liên kết với kháng nguyên, có thể xác định trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi kháng thể của người liên kết với kháng nguyên.

Nếu trình tự ADN của scFv liên kết với kháng nguyên được xác định, có thể thu được kháng thể của người bằng cách chuẩn bị vector biểu hiện chứa trình tự này và đưa vector này vào vật chủ thích hợp để biểu hiện nó (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO95/15388; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

Một ví dụ về chỉ số khác để sử dụng trong việc so sánh các tính chất của kháng thể là độ ổn định của các kháng thể có thể được lấy làm ví dụ. Máy đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning calorimetry - DSC) là thiết bị có khả năng đo nhanh và chính xác nhiệt độ điểm giữa làm biến tính nhiệt ( $T_m$ ) được sử dụng làm chỉ số thích hợp của độ ổn định hình dạng tương đối của protein. Bằng cách đo các giá trị  $T_m$  sử dụng DSC và so sánh các giá trị này, sự chênh lệch về độ ổn định nhiệt có thể được so sánh. Được biết rằng độ ổn định bảo quản của các kháng thể cho thấy mối tương quan nhất định với độ ổn định nhiệt của các kháng thể (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, pp. 265- 273), và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn bằng cách sử dụng độ ổn định nhiệt làm chỉ số. Ví dụ về các chỉ số khác để chọn lọc các kháng thể bao gồm các dấu hiệu sau: hiệu suất trong tế bào chủ thích hợp cao; và tính kết tụ trong dung dịch nước thấp. Ví dụ, kháng thể thể hiện hiệu suất cao nhất không phải lúc nào cũng thể hiện độ ổn định nhiệt cao nhất, và do đó, cần chọn lọc kháng thể thích hợp nhất để sử dụng cho người bằng cách làm đánh giá toàn diện dựa trên các chỉ số nêu trên.

Theo sáng chế, biến thể được cải biến của kháng thể cũng được bao gồm. Biến thể được cải biến chỉ biến thể thu được bằng cách cải biến kháng thể theo sáng chế bằng phương pháp hóa học hoặc sinh học. Ví dụ về biến thể được cải biến hóa học bao gồm biến thể được cải biến hóa học bằng cách liên kết gốc hóa học với khung axit amin, biến thể được cải biến hóa học bằng chuỗi hydratcacbon liên kết ở vị trí N hoặc

liên kết ở vị trí O, v.v. Ví dụ về biến thể được cải biến sinh học bao gồm biến thể thu được bằng sự cải biến sau dịch mã (như glycosyl hóa liên kết ở vị trí N hoặc liên kết ở vị trí O, xử lý, khử amit, isome hóa đầu N hoặc đầu C của axit aspartic, hoặc oxy hóa methionin), và biến thể trong đó gốc methionin được bổ sung vào đầu N cần được biểu hiện trong tế bào chủ không nhân. Ngoài ra, kháng thể được đánh dấu để có thể phát hiện hoặc phân tách kháng thể hoặc kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ, kháng thể được đánh dấu bằng enzym, kháng thể được đánh dấu huỳnh quang, và kháng thể được đánh dấu ái lực cũng được bao gồm trong định nghĩa về biến thể được cải biến. Biến thể được cải biến của kháng thể theo sáng chế hữu ích để cải thiện độ ổn định và sự lưu lại trong máu của kháng thể, làm giảm tính kháng nguyên của nó, phát hiện hoặc phân tách kháng thể hoặc kháng nguyên, và tương tự.

Ngoài ra, bằng cách điều chỉnh sự cải biến glycan liên kết với kháng thể theo sáng chế (glycosyl hóa, khử fucosyl, v.v.), có thể tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Về kỹ thuật điều chỉnh sự cải biến glycan của kháng thể, WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, v.v. là đã biết. Tuy nhiên, kỹ thuật này không bị giới hạn ở đó. Trong kháng thể theo sáng chế, kháng thể trong đó sự cải biến glycan được điều chỉnh cũng được bao gồm.

Trong trường hợp kháng thể được tạo ra bằng cách trước tiên là phân tách gen kháng thể và sau đó đưa gen này vào vật chủ thích hợp, việc kết hợp vật chủ thích hợp và vector biểu hiện thích hợp có thể được sử dụng. Ví dụ cụ thể của gen kháng thể bao gồm sự kết hợp của gen mã hóa trình tự chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong bản mô tả và gen mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của nó. Khi tế bào chủ được biến nạp, có thể cài gen trình tự chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ vào cùng vector biểu hiện, và cả vào các vector biểu hiện riêng biệt khác.

Trong trường hợp các tế bào có nhân chuẩn được sử dụng làm vật chủ, các tế bào động vật, tế bào thực vật, và vi sinh vật có nhân chuẩn có thể được sử dụng. Đối với các tế bào động vật, các tế bào động vật có vú, ví dụ, các tế bào COS của khỉ (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), các nguyên bào sợi của chuột NIH3T3 (số ATCC CRL-1658), và chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. và Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) của các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61) có thể được lấy làm ví dụ.

Trong trường hợp các tế bào không nhân được sử dụng, ví dụ, *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* có thể được lấy làm ví dụ.

Bằng cách đưa gen của kháng thể mong muốn vào các tế bào này thông qua sự biến nạp, và nuôi cấy *in vitro* các tế bào được biến nạp này, có thể thu được kháng thể này. Trong phương pháp nuôi cấy nêu trên, đôi khi hiệu suất có thể thay đổi tùy vào trình tự của kháng thể, và do đó, có thể chọn lọc kháng thể được sản xuất dễ dàng ở dạng được phẩm bằng cách sử dụng hiệu suất làm chỉ số trong số các kháng thể có hoạt tính liên kết tương đương. Do đó, trong kháng thể theo sáng chế, kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể, được đặc trưng bởi việc bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ đã được biến nạp và bước thu gom kháng thể mong muốn từ sản phẩm nuôi cấy thu được trong bước nuôi cấy cũng được bao gồm.

Được biết rằng gốc lysin ở đầu carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra ở tế bào động vật có vú đã được nuôi cấy được xóa (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), và cũng biết rằng hai gốc axit amin (glyxin và lysin) ở đầu carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra ở tế bào động vật có vú được xóa và gốc prolin được bố trí mới ở đầu carboxyl được amit hóa (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Tuy nhiên, việc xóa và cải biến trình tự chuỗi nặng không ảnh hưởng đến ái lực liên kết kháng nguyên và chức năng thực hiện (sự hoạt hóa bổ thể, độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể, v.v.) của kháng thể. Do đó, trong kháng thể theo sáng chế, kháng thể được đưa qua bước cải biến và đoạn mang chức của kháng thể cũng được bao gồm, và biến thể xóa trong đó một hoặc hai axit amin được xóa ở đầu carboxyl của chuỗi nặng, biến thể thu được bằng bước amit hóa biến thể xóa (ví dụ, chuỗi nặng trong đó gốc prolin đầu carboxyl được amit hóa), và các biến thể tương tự cũng được bao gồm. Kiểu biến thể xóa có sự xóa ở đầu carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn ở các biến thể trên miễn là ái lực liên kết kháng nguyên và chức năng thực hiện được bảo toàn. Hai chuỗi nặng cấu thành nên kháng thể theo sáng chế có thể là một loại được chọn từ nhóm chứa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và biến thể xóa nêu trên, hoặc có thể là hai loại kết hợp được chọn từ đó. Tỷ lệ số lượng của mỗi biến thể xóa có thể được tác động bởi loại tế bào động vật có vú được nuôi cấy sản xuất kháng thể theo sáng chế và các điều kiện nuôi cấy, tuy nhiên, trường hợp một gốc axit amin ở đầu carboxyl được xóa ở cả hai chuỗi nặng chứa các thành phần chính trong kháng thể theo sáng chế có thể được lấy làm ví dụ.

Về isotyp của kháng thể theo sáng chế, ví dụ, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) có thể được lấy làm ví dụ, và tốt hơn là IgG1 hoặc IgG2 có thể được lấy làm ví dụ.

Về hoạt tính sinh học của kháng thể, thông thường, hoạt tính liên kết kháng nguyên, hoạt tính nhập nội vào các tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng cách liên kết với kháng nguyên, hoạt tính trung hòa hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính tăng cường hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và sự thực bào được điều biến bởi tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) có thể được lấy làm ví dụ. Hoạt tính sinh học của kháng thể theo sáng chế là hoạt tính liên kết với HER2, và tốt hơn là hoạt tính nhập nội vào các tế bào biểu hiện HER2 bằng cách liên kết với HER2. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể có hoạt tính ADCC, hoạt tính CDC, và/hoặc hoạt tính ADCP ngoài hoạt tính nhập nội vào các tế bào.

Kháng thể thu được có thể được tinh sạch đến mức đồng nhất. Việc phân tách và tinh sạch kháng thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp phân tách và tinh sạch protein truyền thống. Ví dụ, kháng thể có thể được phân tách và tinh sạch bằng cách lựa chọn và kết hợp một cách thích hợp phương pháp sắc ký cột, lọc, siêu lọc, kết tủa muối, thẩm tách, điện di gel polyacrylamit điều chế, điện di điểm đẳng điện, và phương pháp tương tự (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), nhưng phương pháp này không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ về sắc ký bao gồm sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký lọc gel, sắc ký pha đảo, và sắc ký hấp phụ.

Có thể thực hiện sắc ký này bằng cách sử dụng sắc ký lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Về cột được sử dụng trong sắc ký ái lực, cột Protein A và cột Protein G có thể được lấy làm ví dụ. Ví dụ, về cột sử dụng cột Protein A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia Corporation) và các cột tương tự có thể được lấy làm ví dụ.

Ngoài ra, bằng cách sử dụng chất mang có kháng nguyên được cố định trên đó, kháng thể cũng có thể được tinh sạch bằng cách sử dụng tính chất liên kết của kháng

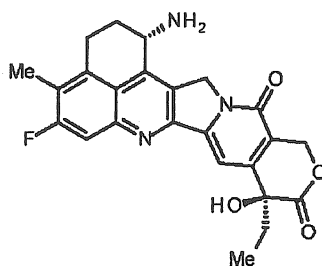
thể với kháng nguyên.

#### Hợp chất kháng u

Hợp chất kháng u được liên hợp với thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế được giải thích. Hợp chất kháng u được sử dụng theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể với điều kiện nó là hợp chất có tác dụng kháng u và nhóm phân tử thể hoặc cấu trúc một phần cho phép gắn với cấu trúc thành phần liên kết. Khi một phần hoặc toàn bộ thành phần liên kết bị cắt trong các tế bào khối u, gốc hợp chất kháng u được giải phóng để thể hiện tác dụng kháng u của hợp chất kháng u. Khi thành phần liên kết bị cắt ở vị trí gắn với dược chất, hợp chất kháng u được giải phóng trong cấu trúc không bị cải biến để thể hiện tác dụng kháng u bên trong của nó.

Về hợp chất kháng u được sử dụng trong sáng chế, tốt hơn là exatecan (((1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dione; được thể hiện trong công thức dưới đây), một trong số các dẫn xuất camptothecin, có thể được sử dụng.

(Công thức 14)



Mặc dù có tác dụng kháng u xuất sắc, exatecan vẫn không được bán trên thị trường làm thuốc kháng u. Hợp chất này có thể dễ dàng thu được bằng phương pháp đã biết và nhóm amin ở vị trí 1 tốt hơn là có thể được sử dụng làm vị trí gắn với cấu trúc thành phần liên kết. Ngoài ra, mặc dù exatecan cũng có thể được giải phóng trong các tế bào khối u trong khi một phần của thành phần liên kết vẫn gắn vào đó, nó là hợp chất thể hiện tác dụng kháng u xuất sắc ngay cả ở cấu trúc này.

Do exatecan có cấu trúc camptothecin, được biết rằng trong môi trường axit nước (ví dụ, pH = 3 hoặc tương tự) thì cân bằng dịch chuyển về phía cấu trúc có vòng lacton đóng (vòng đóng), nhưng trong môi trường bazơ nước (ví dụ, pH = 10 hoặc tương tự)

thì cân bằng lại dịch chuyển về phía cấu trúc có vòng lacton mở (vòng mở). Thê liên hợp thuốc được đưa vào bằng gốc exatecan tương ứng với cấu trúc vòng đóng và cấu trúc vòng mở cũng được mong đợi là có cùng tác dụng kháng u và không nhất thiết phải nói rằng cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

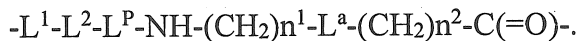
Ngoài ra, ví dụ về hợp chất kháng u có thể bao gồm doxorubicin, daunorubicin, mitomycin C, bleomycin, cyclophosphamide, vincristin, vinblastin, methotrexat, chất kháng u gốc platin (cisplatin hoặc các dẫn xuất của nó), taxol hoặc các dẫn xuất của nó, và các camptothecin khác hoặc các dẫn xuất của nó (chất kháng u được mô tả trong đơn sáng chế Nhật số 6-87746).

Đối với thê liên hợp kháng thể-dược chất, số lượng các phân tử dược chất liên hợp với mỗi phân tử kháng thể là yếu tố chủ chốt có ảnh hưởng đến tính hiệu quả và độ an toàn. Việc sản xuất thê liên hợp kháng thể-dược chất được thực hiện bằng cách xác định các điều kiện phản ứng bao gồm lượng nguyên liệu thô và chất phản ứng được sử dụng để phản ứng để có số lượng không đổi các phân tử dược chất liên hợp. Hỗn hợp chứa số lượng các phân tử dược chất liên hợp khác nhau thường thu được không giống như phản ứng hóa học của hợp chất có phân tử lượng thấp. Lượng dược chất được liên hợp trong phân tử kháng thể được biểu hiện hoặc được chỉ ra bởi giá trị trung bình, tức là, số phân tử dược chất liên hợp trung bình. Trừ khi được mô tả cụ thể khác, số lượng phân tử dược chất liên hợp nghĩa là giá trị trung bình loại trừ trường hợp trong đó nó là thê liên hợp kháng thể-dược chất có lượng cụ thể các phân tử dược chất liên hợp được bao gồm trong hỗn hợp thê liên hợp kháng thể-dược chất có số lượng các phân tử dược chất liên hợp khác nhau.

Số lượng các phân tử exatecan liên hợp với phân tử kháng thể là kiểm soát được, và ở dạng số phân tử dược chất liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể, khoảng 1 đến 10 exatecan có thể được gắn. Tốt hơn là, nó là 2 đến 8, và tốt hơn nữa là 3 đến 8. Trong khi đó, người có trình độ trong lĩnh vực này có thể thiết kế phản ứng liên hợp giữa số lượng phân tử dược chất cần thiết với phân tử kháng thể dựa trên mô tả về các ví dụ thực hiện sáng chế và có thể thu được thê liên hợp kháng thể-dược chất được liên hợp với số lượng các phân tử exatecan được kiểm soát.

Cấu trúc thành phần liên kết

Đối với thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế, cấu trúc thành phần liên kết để cho hợp chất kháng u liên hợp với kháng thể kháng HER2 được giải thích. Thành phần liên kết có cấu trúc có công thức như sau:

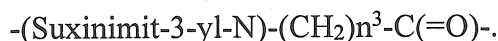


Kháng thể được gắn với đầu  $L^1$  (đầu đối diện với thành phần  $L^2$ ), và hợp chất kháng u được gắn với nhóm cacbonyl của gốc  $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6 và tốt hơn là số nguyên từ 1 đến 5, và tốt hơn nữa là từ 1 đến 3.

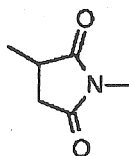
#### 1. $L^1$

$L^1$  được biểu diễn bằng cấu trúc sau:



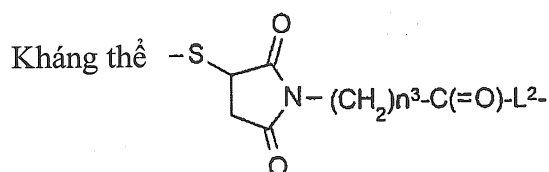
Trong cấu trúc trên,  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8, " $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-$ " có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 15)



Vị trí 3 của cấu trúc một phần nêu trên là vị trí liên kết với kháng thể kháng HER2. Liên kết với kháng thể ở vị trí 3 được đặc trưng bởi liên kết với sự hình thành thioete. Nguyên tử nitơ ở vị trí 1 của nhóm cấu trúc được gắn với nguyên tử cacbon của metylen có mặt trong thành phần liên kết bao gồm cấu trúc này. Cụ thể,  $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-$  là cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau (trong bản mô tả, "kháng thể-S-" thu được từ kháng thể).

(Công thức 16)



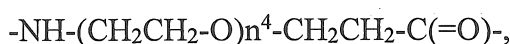
Trong công thức này,  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8, và tốt hơn là từ 2 đến 5.

Ví dụ cụ thể về  $L^1$  có thể bao gồm:

- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-, và
- (Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

## 2. $L^2$

$L^2$  được biểu diễn bằng cấu trúc sau:



$L^2$  có thể không có mặt, và trong trường hợp này,  $L^2$  là liên kết đơn.  $n^4$  là số nguyên từ 1 đến 6, và tốt hơn là từ 2 đến 4.  $L^2$  được gắn với  $L^1$  ở nhóm amin đầu tận của nó và được gắn với  $L^P$  ở nhóm cacbonyl của nó ở đầu còn lại.

Ví dụ cụ thể về  $L^2$  có thể bao gồm:

- NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

## 3. $L^P$

$L^P$  là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin. Cụ thể, nó chứa gốc oligopeptit trong đó 2 đến 7 axit amin được liên kết bởi liên kết peptit.  $L^P$  được gắn với  $L^2$  ở đầu N của nó và được gắn với nhóm amin của gốc -NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)- của thành phần liên kết ở đầu C của nó. Ở đây, thuật ngữ "gốc peptit" hoặc "gốc oligopeptit" là nhóm thu được từ peptit chứa hai hoặc nhiều gốc axit amin và chỉ nhóm hóa trị hai có đầu N và đầu C là các vị trí gắn.

Axit amin tạo nên  $L^P$  trong thành phần liên kết không bị giới hạn cụ thể, tuy nhiên, ví dụ của nó bao gồm L- hoặc D-axit amin, tốt hơn là L-axit amin. Và, nó có thể



là axit amin có cấu trúc như  $\beta$ -alanin, axit  $\epsilon$ -aminocaproic, hoặc axit  $\gamma$ -aminobutyric ngoài  $\alpha$ -axit amin, ngoài ra, nó có thể là axit amin kiểu không tự nhiên như axit amin N-metyl hóa.

Trình tự axit amin của  $L^P$  không bị giới hạn cụ thể, nhưng ví dụ về axit amin cấu trúc này bao gồm phenylalanin (Phe; F), tyrosin (Tyr; Y), loxin (Leu; L), glyxin (Gly; G), alanin (Ala; A), valin (Val; V), lysin (Lys; K), xitrullin (Cit), serin (Ser; S), axit glutamic (Glu; E), và axit aspartic (Asp; D). Trong số các axit amin này, các ví dụ được ưu tiên bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic. Từ các axit amin này,  $L^P$  có trình tự axit amin tùy ý được chọn có hoặc không có các phần chồng lấp có thể được tạo cấu trúc. Tùy vào kiểu axit amin, kiểu giải phóng được chất có thể được kiểm soát. Số axit amin có thể nằm trong khoảng từ 2 đến 7.

Ví dụ cụ thể về  $L^P$  có thể bao gồm

-GGF-,

-DGGF-,

-(D-)D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,

-SGGF-,

-KGGF-,

-DGGFG-,

-GGFGG-,

-DDGGFG-,

-KDGGFG-, và

-GGFGGGF-.

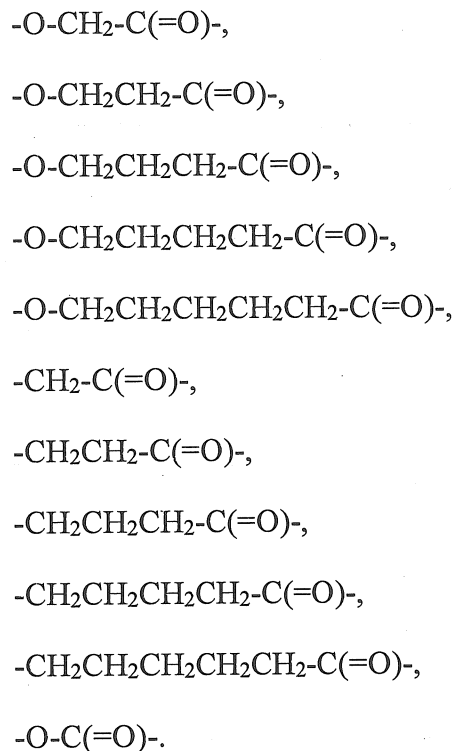
Trong các gốc nêu trên, "(D-)D" là axit D-aspartic.

Ví dụ được đặc biệt ưu tiên về  $L^P$  đối với thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế có thể bao gồm gốc tetrapeptit -GGFG-.

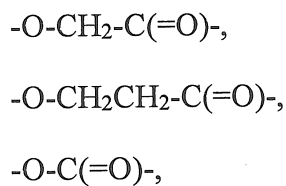
4.  $L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ 

$L^a$  trong  $L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$  là cấu trúc của  $-O-$  hoặc liên kết đơn.  $n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5, tốt hơn là từ 0 đến 3, và tốt hơn nữa là 0 hoặc 1.

Ví dụ về  $L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$  có thể bao gồm các cấu trúc sau:

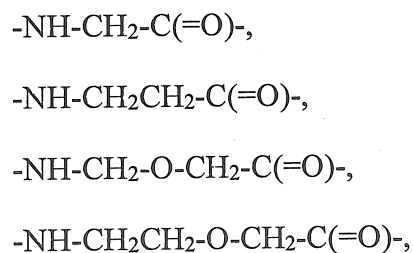


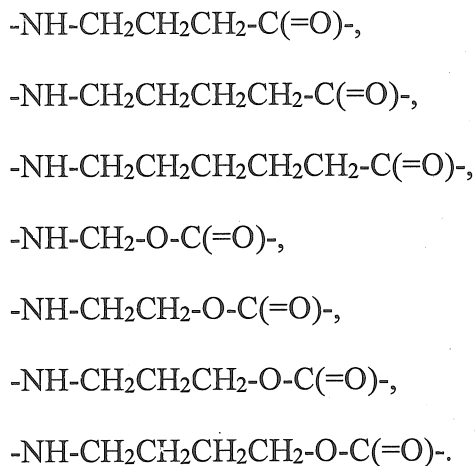
Trong số này,



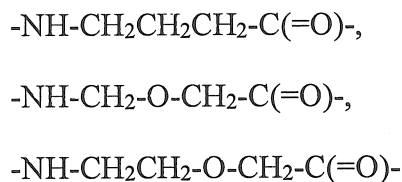
hoặc trường hợp trong đó  $L^a$  là liên kết đơn, và  $n^2$  bằng 0 được ưu tiên.

Ví dụ cụ thể về cấu trúc được biểu diễn bằng  $-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$  của thành phần liên kết có thể bao gồm:





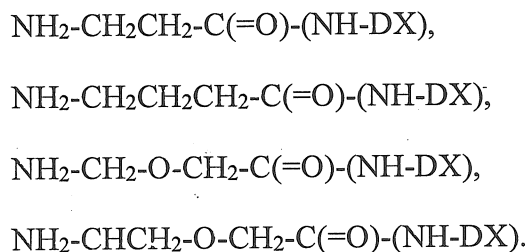
Trong số các cấu trúc này,



được ưu tiên hơn.

Trong thành phần liên kết, chiều dài mạch của  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$  tốt hơn là chiều dài mạch có từ 4 đến 7 nguyên tử, và tốt hơn nữa là chiều dài mạch có 5 hoặc 6 nguyên tử.

Với thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế, khi nó được chuyển vào bên trong các tế bào khối u, được cho thấy là gốc liên kết được cắt và dẫn xuất được chất có cấu trúc được biểu diễn bằng  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$  được giải phóng để biểu hiện tác dụng kháng u. Ví dụ về dẫn xuất kháng u thể hiện tác dụng kháng u bằng cách giải phóng từ thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế bao gồm dẫn xuất kháng u có nhóm cấu trúc trong đó đầu của cấu trúc này được biểu diễn bằng  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$  của thành phần liên kết có nhóm amin, và các cấu trúc được đặc biệt ưu tiên bao gồm các cấu trúc sau.



Trong khi đó, trường hợp là  $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ , được khẳng

định rằng, vì cấu trúc động vật trong phân tử này không ổn định, nó lần nữa bị tự phân ly để giải phóng nhóm  $\text{HO-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ . Các hợp chất này tốt hơn là cũng có thể được sử dụng làm chất trung gian sản xuất của thể liên hợp kháng thể- dược chất theo sáng chế.

Đối với thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế trong đó exatecan được sử dụng làm thuốc, ưu tiên nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết ( $-\text{L}^1\text{-L}^2\text{-L}^P\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}^{n^2}\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ) có cấu trúc sau được gắn với kháng thể. Số lượng nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết được liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể có thể bằng từ 1 đến 10. Tốt hơn là, số lượng này là từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa là từ 3 đến 8.

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$-(\text{Suxinimit-3-yl-N})\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-}$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ .

Trong số này, được ưu tiên hơn là các gốc sau.

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ .

Được đặc biệt ưu tiên là các gốc sau.

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,

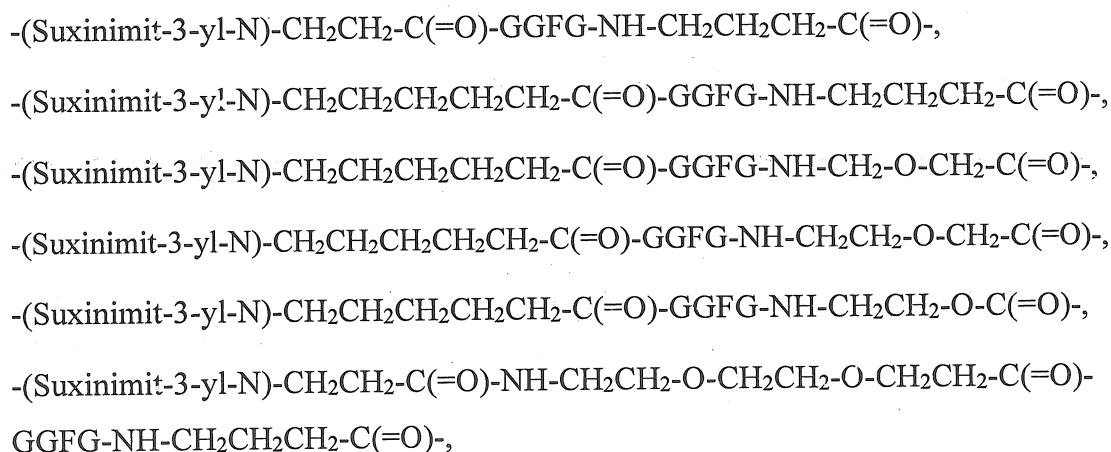
$\text{-(Suxinimit-3-yl-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ .

Với cấu trúc thành phần liên kết để liên hợp kháng thể kháng HER2 và dược chất trong thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế, thành phần liên kết được ưu tiên có thể được tạo cấu trúc bằng cách gắn các cấu trúc được ưu tiên được thể hiện với mỗi phần của thành phần liên kết đã được giải thích ở trên. Về cấu trúc thành phần liên kết, tốt hơn là các thành phần liên kết có cấu trúc sau đây có thể được sử dụng. Trong

đó, đầu bên trái của các cấu trúc này là vị trí liên kết với kháng thể và đầu bên phải là vị trí liên kết với dược chất.



Trong số này, được ưu tiên hơn là các gốc sau.



-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

Các gốc sau được đặc biệt ưu tiên:

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,

-(Suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

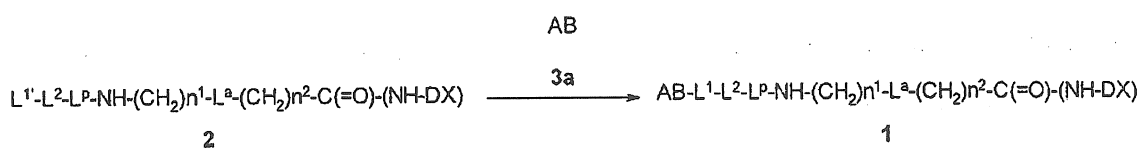
### Phương pháp sản xuất

Tiếp theo, các giải thích được đưa ra đối với phương pháp sản xuất tiêu biểu thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế hoặc hợp chất trung gian sản xuất của nó. Trong khi đó, các hợp chất được mô tả dưới đây với số hợp chất được thể hiện trong mỗi công thức phản ứng. Cụ thể, chúng được đề cập đến là "hợp chất có công thức (1)", "hợp chất (1)", hoặc tên gọi tương tự. Hợp chất có số khác số trên cũng được mô tả tương tự.

#### 1. Phương pháp sản xuất 1

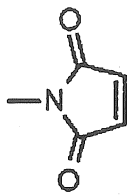
Thể liên hợp kháng thể-được chất được biểu diễn bằng công thức (1) trong đó kháng thể được gắn với cấu trúc được chất-thành phần liên kết qua thioete có thể được sản xuất bằng phương pháp sau, ví dụ.

(Công thức 17)



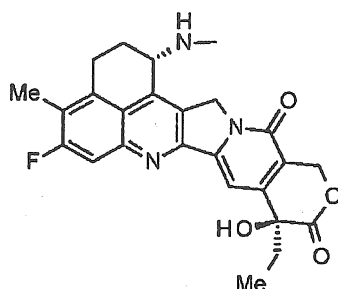
(Trong công thức, AB là kháng thể có nhóm sulfhydryl, và L<sup>1</sup> biểu diễn cấu trúc thành phần liên kết L<sup>1</sup> trong đó đầu thành phần liên kết là nhóm maleimityl (công thức được thể hiện dưới đây)

(Công thức 18)



(trong công thức này, nguyên tử nitơ là vị trí liên kết), và cụ thể là nhóm trong đó gốc  $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-$  trong  $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})-$  của  $\text{L}^1$  là nhóm maleimityl. Ngoài ra,  $-(\text{NH-DX})$  là cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 19)



và nó là nhóm thu được bằng cách loại bỏ một nguyên tử hydro của nhóm amin ở vị trí 1 của exatecan.)

Ngoài ra, hợp chất có công thức (1) trong công thức phản ứng nêu trên có thể được hiểu là cấu trúc trong đó một nhóm cấu trúc từ được chất tương ứng với đầu thành phần liên kết gắn với một kháng thể. Tuy nhiên, đây chỉ là mô tả được đưa ra nhằm mục đích cho sự thuận tiện, và thực tế là có nhiều trường hợp trong đó nhiều nhóm cấu trúc được gắn với một phân tử kháng thể. Cách hiểu này cũng được áp dụng để giải thích về phương pháp sản xuất được mô tả dưới đây.

Thế liên hợp kháng thể-được chất (1) có thể được sản xuất bằng cách cho hợp chất (2), thu được nhờ phương pháp được mô tả dưới đây, phản ứng với kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl.

Kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl có thể thu được bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Ví dụ bao gồm: chất phản ứng Traut được cho phản ứng với nhóm amin của kháng thể; N-suxinimetyl S-axetylthioalkanoat được cho phản ứng với nhóm amin của kháng thể sau đó cho phản ứng với hydroxylamin; sau khi phản ứng với N-suxinimetyl 3-(pyridyldithio)propionat, kháng thể được cho phản ứng với



chất khử; kháng thể được cho phản ứng với chất khử như dithiothreitol, 2-mercaptoetanol, và tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua (TCEP) để khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể để tạo ra nhóm sulfhydryl, nhưng không bị giới hạn ở nhóm này.

Cụ thể, bằng cách sử dụng 0,3 đến 3 đương lượng mol của TCEP làm chất khử với mỗi disulfua ở phần bản lề trong kháng thể và cho phản ứng với kháng thể trong dung dịch đệm chứa chất tạo chelat, kháng thể có disulfua được khử một phần hoặc hoàn toàn ở phần bản lề trong kháng thể có thể thu được. Ví dụ về chất tạo chelat bao gồm axit etylenđiamin tetraaxetic (EDTA) và axit dietylenetriamin pentaaxetic (DTPA). Có thể sử dụng chất này ở nồng độ từ 1 mM đến 20 mM. Ví dụ về dung dịch đệm có thể được sử dụng bao gồm dung dịch natri phosphat, natri borat, hoặc natri axetat. Cụ thể, bằng cách cho kháng thể phản ứng với TCEP ở nhiệt độ 4°C đến 37°C trong thời gian từ 1 đến 4 giờ, có thể thu được kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl được khử một phần hoặc hoàn toàn.

Trong khi đó, bằng cách tiến hành phản ứng bổ sung nhóm sulfhydryl vào gốc được chất-thành phần liên kết, gốc được chất-thành phần liên kết có thể được liên hợp bởi liên kết thioete.

Bằng cách sử dụng 2 đến 20 đương lượng mol của hợp chất (2) với mỗi kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl, thể liên hợp kháng thể-được chất (1) trong đó 2 đến 8 phân tử được chất được liên hợp với mỗi phân tử kháng thể có thể được tạo ra. Cụ thể, thích hợp là dung dịch chứa hợp chất (2) được hòa tan trong đó được bổ sung vào dung dịch đệm chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl để phản ứng. Trong bản mô tả, các ví dụ về dung dịch đệm có thể được sử dụng bao gồm dung dịch natri axetat, natri phosphat, và natri borat. pH phản ứng là 5 đến 9, và tốt hơn nữa là phản ứng được thực hiện ở độ pH gần 7. Ví dụ về dung môi để hòa tan hợp chất (2) bao gồm dung môi hữu cơ như dimetyl sulfoxit (DMSO), dimetylformamit (DMF), dimetyl axetamit (DMA), và N-metyl-2-pyridon (NMP).

Thích hợp là dung dịch dung môi hữu cơ chứa hợp chất (2) được hòa tan trong đó được bổ sung ở nồng độ 1 đến 20% thể tích vào dung dịch đệm chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl để phản ứng. Nhiệt độ phản ứng là từ 0 đến 37°C, tốt hơn nữa là từ 10 đến 25°C, và thời gian phản ứng là từ 0,5 đến 2 giờ. Có thể kết thúc phản ứng bằng

cách làm vô hoạt tính phản ứng của hợp chất chưa phản ứng (2) với chất phản ứng chứa thiol. Ví dụ về chất phản ứng chứa thiol bao gồm xystein và N-acetyl-L-xystein (NAC). Cụ thể, 1 đến 2 đương lượng mol của NAC được bổ sung vào hợp chất (2) được sử dụng và, bằng cách ủ ở nhiệt độ trong phòng trong từ 10 đến 30 phút, phản ứng có thể được kết thúc.

Thế liên hợp kháng thể-dược chất (1) đã sản xuất có thể, sau khi cô đặc, trao đổi đệm, tinh sạch, và đo nồng độ kháng thể và số lượng phân tử được chất liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể theo quy trình thông thường được nêu dưới đây, được đem đi nhận diện thế liên hợp kháng thể-dược chất (1).

Quy trình chung A: Nồng độ của dung dịch nước chứa kháng thể hoặc thế liên hợp kháng thể-dược chất

Bổ sung dung dịch kháng thể hoặc thế liên hợp kháng thể-dược chất vào vật chứa Amicon Ultra (50.000 MWCO, Millipore Co.) và dung dịch kháng thể hoặc thế liên hợp kháng thể-dược chất được cô bằng ly tâm (ly tâm trong 5 đến 20 phút ở tốc độ 2000 G đến 3800 G) bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Quy trình chung B: Đo nồng độ kháng thể

Bằng cách sử dụng đầu dò UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), việc đo nồng độ kháng thể được thực hiện theo phương pháp được xác định bởi nhà sản xuất. Ở thời điểm đó, hệ số hấp thụ ở 280 nm khác nhau với mỗi kháng thể được sử dụng ( $1,3 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  đến  $1,8 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Quy trình chung C-1: Trao đổi đệm đối với kháng thể

Cột NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) sử dụng chất mang Sephadex G-25 được làm cân bằng bằng đệm phosphat (10 mM, pH = 6,0; được đề cập đến là PBS6.0/EDTA trong bản mô tả) chứa natri clorua (137 mM) và axit etylen diamin tetraaxetic (EDTA, 5 mM) theo phương pháp được xác định bởi nhà sản xuất. Dung dịch nước chứa kháng thể được sử dụng ở lượng bằng 2,5 mL cho cột đơn NAP-25, và sau đó phần (3,5 mL) được rửa giải bằng 3,5 mL PBS6.0/EDTA được thu gom. Phần thu được được cô bằng quy trình chung A. Sau khi đo nồng độ kháng thể bằng cách sử dụng quy trình chung B, nồng độ kháng thể được điều chỉnh đến 10

mg/mL sử dụng PBS6.0/EDTA.

Quy trình chung C-2: Trao đổi đệm đối với kháng thể

Cột NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) sử dụng chất mang Sephadex G-25 được làm cân bằng bằng đệm phosphat (50 mM, pH = 6,5; được đề cập đến là PBS6.5/EDTA trong bản mô tả) chứa natri clorua (50 mM) và EDTA (2 mM) theo phương pháp được xác định bởi nhà sản xuất. Dung dịch nước chứa kháng thể được sử dụng ở lượng bằng 2,5 mL cho cột đơn NAP-25, và sau đó phần (3,5 mL) được rửa giải bằng 3,5 mL PBS6.5/EDTA được thu gom. Phần thu được được cô bằng quy trình chung A. Sau khi đo nồng độ kháng thể sử dụng quy trình chung B, nồng độ kháng thể được điều chỉnh đến 20 mg/mL sử dụng PBS6.5/EDTA.

Quy trình chung D: Tinh sạch thể liên hợp kháng thể-được chất

Cột NAP-25 được làm cân bằng bằng đệm bất kỳ được chọn từ đệm phosphat (PBS7.4, Cat. No. 10010-023, Invitrogen), đệm natri phosphat (10 mM, pH = 6,0; được đề cập đến là PBS6.0) chứa natri clorua (137 mM), và đệm axetat chứa sorbitol (5%) (10 mM, pH = 5,5; được đề cập đến là ABS trong bản mô tả) có bán trên thị trường. Dung dịch nước chứa phản ứng thể liên hợp kháng thể-được chất được sử dụng với lượng bằng khoảng 1,5 mL cho cột NAP-25, và sau đó được rửa giải bằng đệm với lượng được xác định bởi nhà sản xuất để gom phần kháng thể. Phần đã gom được sử dụng lần nữa cho cột NAP-25 và, bằng cách lặp lại tổng cộng 2 đến 3 lần quy trình tinh sạch lọc gel để rửa giải bằng đệm, thể liên hợp kháng thể-được chất ngoại trừ thành phần liên kết được chất không liên hợp và hợp chất phân tử lượng thấp (tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua (TCEP), N-acetyl-L-cysteine (NAC), và dimethyl sulfoxit) được thu nhận.

Quy trình chung E: Đo nồng độ kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-được chất và số phân tử được chất liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể (1).

Nồng độ được chất liên hợp trong thể liên hợp kháng thể-được chất có thể được tính bằng cách đo độ hấp thụ UV của dung dịch nước chứa thể liên hợp kháng thể-được chất ở hai bước sóng 280 nm và 370 nm, sau đó thực hiện các tính toán như được thể hiện dưới đây.

Do độ hấp thụ tổng ở bước sóng bất kỳ bằng tổng độ hấp thụ của mọi loại hóa chất hấp thụ ánh sáng có trong hệ (tính chất cộng của độ hấp thụ), khi hệ số hấp thụ mol của kháng thể và dược chất vẫn giống nhau trước và sau khi kháng thể liên hợp với dược chất, nồng độ kháng thể và nồng độ dược chất trong thể liên hợp kháng thể-dược chất được biểu diễn bằng các phương trình sau.

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \varepsilon_{D,280}C_D + \varepsilon_{A,280}C_A \quad \text{Phương trình (I)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \varepsilon_{D,370}C_D + \varepsilon_{A,370}C_A \quad \text{Phương trình (II)}$$

Trong phương trình nêu trên,  $A_{280}$  là độ hấp thụ của dung dịch nước chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất ở bước sóng 280 nm,  $A_{370}$  là độ hấp thụ của dung dịch nước chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất ở bước sóng 370 nm,  $A_{A,280}$  là độ hấp thụ của kháng thể ở bước sóng 280 nm,  $A_{A,370}$  là độ hấp thụ của kháng thể ở bước sóng 370 nm,  $A_{D,280}$  là độ hấp thụ của tiền chất liên hợp ở bước sóng 280 nm,  $A_{D,370}$  là độ hấp thụ của tiền chất liên hợp ở bước sóng 370 nm,  $\varepsilon_{A,280}$  là hệ số hấp thụ mol của kháng thể ở bước sóng 280 nm,  $\varepsilon_{A,370}$  là hệ số hấp thụ mol của kháng thể ở bước sóng 370 nm,  $\varepsilon_{D,280}$  là hệ số hấp thụ mol của tiền chất liên hợp ở bước sóng 280 nm,  $\varepsilon_{D,370}$  là hệ số hấp thụ mol của tiền chất liên hợp ở bước sóng 370 nm,  $C_A$  là nồng độ kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-dược chất, và  $C_D$  là nồng độ dược chất trong thể liên hợp kháng thể-dược chất.

Đối với  $\varepsilon_{A,280}$ ,  $\varepsilon_{A,370}$ ,  $\varepsilon_{D,280}$ , và  $\varepsilon_{D,370}$  trong phương trình ở trên, các giá trị thu được trước đó (các giá trị ước lượng dựa trên việc tính toán hoặc giá trị đo thu được bằng phép đo UV của các hợp chất) được sử dụng. Ví dụ,  $\varepsilon_{A,280}$  có thể được ước lượng từ trình tự axit amin của kháng thể sử dụng phương pháp tính đã biết (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423).  $\varepsilon_{A,370}$  thường bằng 0. Trong các ví dụ thực hiện sáng chế, đối với hệ số hấp thụ mol của trastuzumab,  $\varepsilon_{A,280} = 215400$  (giá trị ước lượng dựa vào phương pháp tính) và  $\varepsilon_{A,370} = 0$  được sử dụng.  $\varepsilon_{D,280}$  và  $\varepsilon_{D,370}$  có thể thu được dựa vào định luật Lambert-Beer (Độ hấp thụ = nồng độ mol x hệ số hấp thụ mol x chiều dài đường đi tế bào) bằng cách đo độ hấp thụ của dung dịch trong đó tiền chất liên hợp được sử dụng được hòa tan ở nồng độ mol nhất định. Đối với hệ số hấp thụ mol của thành phần liên kết dược chất trong các ví dụ thực hiện sáng chế,  $\varepsilon_{D,280} = 5000$  (giá trị trung bình đo được) và  $\varepsilon_{D,370} = 19000$  (giá trị trung bình đo được) được sử dụng, trừ khi có quy định khác. Bằng cách đo  $A_{280}$  và  $A_{370}$  của dung dịch nước chứa thể liên hợp

kháng thể-được chất và giải các phương trình đồng thời (I) và (II) sử dụng các giá trị này, có thể thu được  $C_A$  và  $C_D$ . Ngoài ra, bằng cách lấy  $C_D$  chia cho  $C_A$ , có thể thu được số phân tử được chất liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể.

Quy trình chung F: Đo (2) số phân tử được chất liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-được chất.

Số phân tử được chất liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-được chất còn có thể được xác định bằng phép phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng phương pháp dưới đây ngoài quy trình chung E đã nêu ở trên.

#### F-1. Chuẩn bị mẫu để phân tích HPLC (khử thể liên hợp kháng thể-được chất)

Dung dịch thể liên hợp kháng thể-được chất (khoảng 1 mg/mL, 60  $\mu$ L) được trộn với dung dịch nước chứa dithiothreitol (DTT) (100 mM, 15  $\mu$ L). Mẫu trong đó liên kết disulfua giữa chuỗi L và chuỗi H của thể liên hợp kháng thể-được chất được cắt bằng cách ủ hỗn hợp trong 30 phút ở 37°C được sử dụng trong phân tích HPLC.

#### F-2. Phân tích HPLC

Phân tích HPLC được thực hiện trong các điều kiện đo sau:

Hệ HPLC: hệ HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)

Đầu dò: máy đo phổ hấp thụ cực tím (bước sóng đo: 280 nm)

Cột: PLRP-S (2,1 x 50 mm, 8  $\mu$ m, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802)

Nhiệt độ cột: 80°C

Pha động A: dung dịch nước chứa axit trifloaxetic (TFA) 0,04%

Pha động E: dung dịch axetonitril chứa TFA 0,04%

Chương trình gradien: 29%-36% (0-12,5 phút), 36%-42% (12,5-15 phút), 42%-29% (15-15,1 phút), và 29%-29% (15,1-25 phút)

Thể tích phun mẫu: 15  $\mu$ L

#### F-3. Phân tích số liệu

(F-3-1) So với các chuỗi L ( $L_0$ ) và H ( $H_0$ ) của kháng thể không được liên hợp, các

chuỗi L (chuỗi L được gắn với một phân tử được chất:  $L_1$ ) và H (chuỗi H được gắn với một phân tử được chất:  $H_1$ , chuỗi H được gắn với hai phân tử được chất:  $H_2$ , chuỗi H được gắn với ba phân tử được chất:  $H_3$ ) được liên hợp với được chất thể hiện tính kỵ nước cao hơn cân xứng với số phân tử được chất liên hợp và do đó có thời gian lưu lớn hơn. Do đó, các chuỗi này được rửa giải theo thứ tự  $L_0$  và  $L_1$  hoặc  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$ , và  $H_3$ . Các pic dò có thể được quy cho bất kỳ trong số  $L_0$ ,  $L_1$ ,  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$ , và  $H_3$  bằng cách so sánh các thời gian lưu với  $L_0$  và  $H_0$ .

(F-3-2) Vì thành phần liên kết được chất có sự hấp thụ UV, các giá trị vùng pic được hiệu chỉnh để đáp ứng với số thành phần liên kết phân tử được chất liên hợp theo biểu thức sau sử dụng hệ số hấp thụ mol của chuỗi L hoặc H và thành phần liên kết được chất.

(Biểu thức 1)

Giá trị vùng pic được hiệu chỉnh của chuỗi L ( $L_i$ )

= Vùng pic x

Hệ số hấp thụ mol của chuỗi L

Hệ số hấp thụ mol của chuỗi L + số phân tử được chất liên hợp x hệ số hấp thụ mol của thành phần liên kết được chất

(Biểu thức 2)

Giá trị vùng pic được hiệu chỉnh của chuỗi H ( $H_i$ )

= Vùng pic x

Hệ số hấp thụ mol của chuỗi H

Hệ số hấp thụ mol của chuỗi H + số phân tử được chất liên hợp x hệ số hấp thụ mol của thành phần liên kết được chất

Ở đây, đối với hệ số hấp thụ mol (280 nm) của chuỗi L hoặc H của mỗi kháng thể, giá trị được ước lượng từ trình tự axit amin của chuỗi L hoặc H của mỗi kháng thể bằng phương pháp tính đã biết (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411- 2423) có thể được sử dụng. Trong trường hợp là trastuzumab, hệ số hấp thụ mol bằng 26150 và hệ số hấp thụ mol bằng 81290 lần lượt được sử dụng làm các giá trị ước lượng đối với các chuỗi L và H, theo trình tự axit amin của nó. Đối với hệ số hấp thụ mol (280 nm) của thành phần liên kết được chất, hệ số hấp thụ mol thu được (280 nm) của hợp chất trong đó nhóm maleimide được chuyển hóa thành succinimide thioether bởi phản ứng của mỗi thành phần liên kết được chất với mercaptoethanol hoặc N-acetylcysteine được sử dụng.

(F-3-3) Tỷ lệ vùng pic (%) của mỗi chuỗi được tính cho tổng các giá trị vùng pic đã hiệu chỉnh theo biểu thức sau.

(Biểu thức 3)

$$\text{Tỷ lệ vùng pic của chuỗi L} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ vùng pic của chuỗi H} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

Giá trị đã hiệu chỉnh của các vùng pic tương ứng của  $A_{Li}$ ,  $A_{Hi}$ ;  $L_i$ ,  $H_i$

(F-3-4) Số phân tử được chất liên hợp trung bình với mỗi phân tử kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-được chất được tính theo biểu thức sau.

Số phân tử được chất liên hợp trung bình = (tỷ lệ vùng pic  $L_0 \times 0$  + tỷ lệ vùng pic  $L_0 \times 1$  + tỷ lệ vùng pic  $H_0 \times 0$  + tỷ lệ vùng pic  $H_1 \times 1$  + tỷ lệ vùng pic  $H_2 \times 2$  + tỷ lệ vùng pic  $H_3 \times 3$ ) /  $100 \times 2$

Hợp chất trung gian sản xuất được sử dụng trong phương pháp sản xuất 1 được mô tả dưới đây. Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (2) trong phương pháp sản xuất 1 là hợp chất được thể hiện bằng công thức sau:



Trong công thức này,

$n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8,

$L^2$  là  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$  hoặc liên kết đơn,

trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 1 đến 6,

$L^P$  là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic,

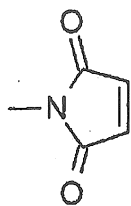
$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6,

$n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5,

$L^a$  là  $-\text{O}-$  hoặc liên kết đơn,

(maleimide-N-yl)- là nhóm maleimityl (2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl) được thể hiện bằng công thức sau:

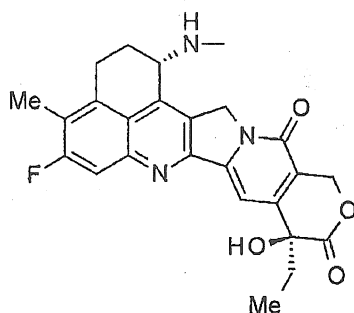
(Công thức 20)



trong đó, nguyên tử nitơ là vị trí liên kết, và

-(NH-DX) là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 21)



trong đó, nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 là vị trí liên kết.

Khi  $L^2$  là liên kết đơn hoặc  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ , nó được ưu tiên dùng làm chất trung gian sản xuất mà  $n^4$  cần phải là số nguyên từ 2 đến 4.

Đối với gốc peptit của  $L^P$ , hợp chất có gốc peptit gồm axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic được ưu tiên dùng làm chất trung gian sản xuất. Trong số các gốc peptit đó, hợp chất trong đó  $L^P$  là gốc peptit chứa 4 axit amin được ưu tiên làm chất trung gian sản xuất. Cụ thể hơn, hợp chất trong đó  $L^P$  là gốc tetrapeptit  $-\text{GGFG}-$  được ưu tiên làm chất trung gian sản xuất.

Ngoài ra, đối với  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-$ , hợp chất có  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ , hoặc  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  được ưu tiên làm chất trung gian sản xuất. Hợp chất có  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ , hoặc  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2$  được ưu tiên hơn.

Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (2) trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5,  $L^2$  là liên kết đơn, và  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-$  là  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ , hoặc  $-\text{NH}-$



$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$  được ưu tiên làm chất trung gian sản xuất. Hợp chất trong đó  $\text{-NH-}(\text{CH}_2)_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2)_{n^2}\text{-}$  là  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ , hoặc  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$  được ưu tiên hơn. Hợp chất trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 hoặc 5 được ưu tiên hơn nữa.

Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (2) trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5,  $\text{L}^2$  là  $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{-O)}_{n^4}\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,  $n^4$  là số nguyên từ 2 đến 4, và  $\text{-NH-(CH}_2)_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2)_{n^2}\text{-}$  là  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ , hoặc  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$  được ưu tiên làm chất trung gian sản xuất. Hợp chất trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 2 hoặc 4 được ưu tiên hơn. Hợp chất trong đó  $\text{-NH-(CH}_2)_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2)_{n^2}\text{-}$  là  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ , hoặc  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$  được ưu tiên hơn nữa.

Ví dụ được ưu tiên của chất trung gian hữu ích để sản xuất hợp chất theo sáng chế có thể bao gồm các chất sau.

(maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ ,  
 (maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

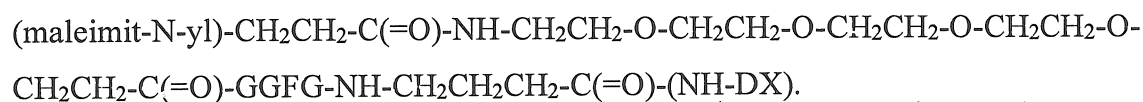
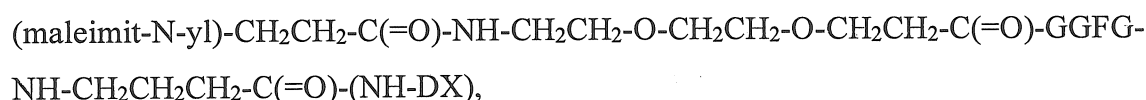
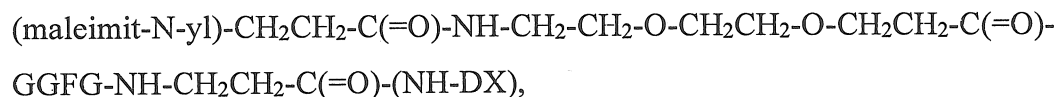
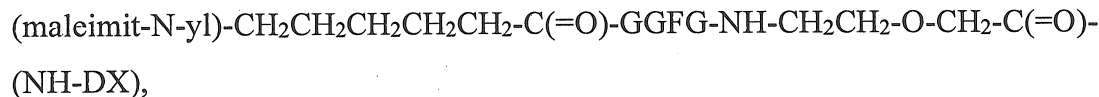
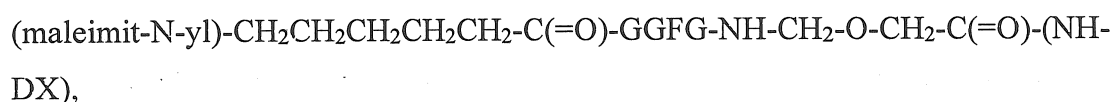
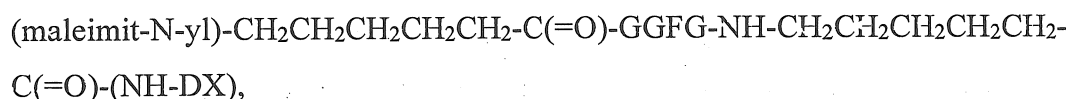
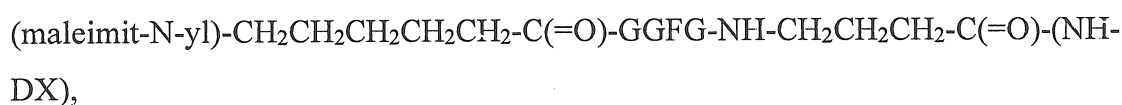
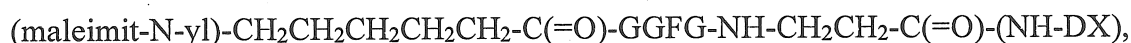
(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

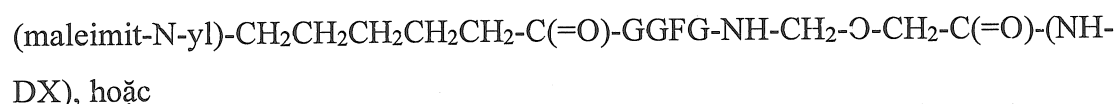
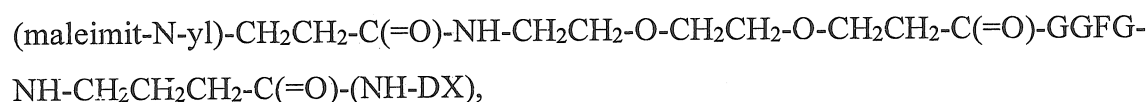
Thế liên hợp kháng thể kháng HER2-dược chất theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách cho dược chất-hợp chất liên kết được chọn từ nhóm hợp chất trung gian sản xuất được nêu ở trên phản ứng với kháng thể kháng HER2 hoặc dẫn xuất có tính phản ứng của nó để từ đó tạo ra liên kết thioete ở vị trí liên kết disulfua có mặt

trong phần bản lề của kháng thể kháng HER2. Trong trường hợp này, tốt hơn là dẫn xuất có tính phản ứng của kháng thể kháng HER2 được sử dụng, và dẫn xuất có tính phản ứng này thu được bằng cách khử kháng thể kháng HER2 được đặc biệt ưu tiên.

Các hợp chất dưới đây là hợp chất được ưu tiên hơn để làm chất trung gian sản xuất.



Trong số nhóm hợp chất trung gian được nêu ở trên, hợp chất được thể hiện bằng công thức sau:



(maleimide-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
(NH-DX),

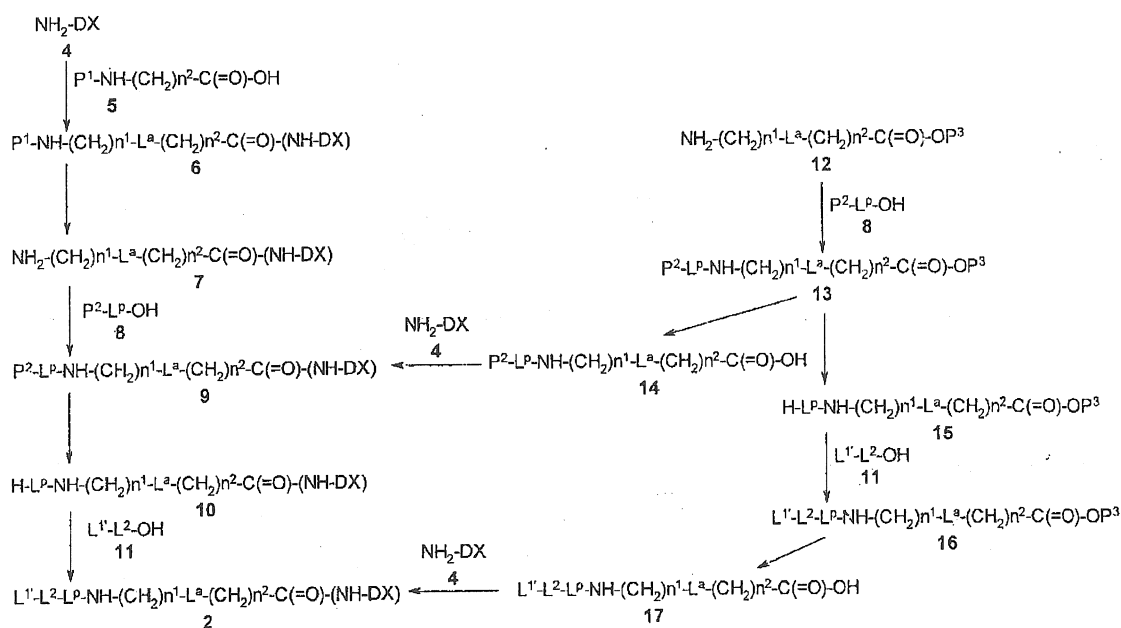
là hợp chất được ưu tiên hơn nữa.

Để đảm bảo số lượng thể liên hợp, nhiều thể liên hợp thu được ở các điều kiện sản xuất tương tự để có số lượng được chất tương đương (ví dụ, khoảng  $\pm 1$ ) có thể được trộn để thu được nhiều lô mới. Trong trường hợp này, số lượng được chất trung bình rơi vào giữa số lượng được chất trung bình trong các thể liên hợp trước khi trộn.

## 2. Phương pháp sản xuất 2

Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (2) làm chất trung gian được sử dụng trong phương pháp sản xuất trước đó và muối được dụng của nó có thể được sản xuất theo phương pháp dưới đây, ví dụ.

(Công thức 22)



Trong công thức này, L<sup>1'</sup> là nhóm maleimetyl đầu tận, và mỗi P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, và P<sup>3</sup> là nhóm bảo vệ.

Hợp chất (6) có thể được sản xuất bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (5) thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, axit halogenua, hoặc hợp chất tương tự và cho nó phản ứng với NH<sub>2</sub>-DX(4) hoặc muối được dụng của nó. NH<sub>2</sub>-DX (4) chỉ exatecan (tên hóa học: (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-flo-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-metyl-

1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dion).

Chất phản ứng và điều kiện thường được sử dụng để tổng hợp peptit có thể được sử dụng cho phản ứng này. Có nhiều loại este hoạt tính khác nhau. Ví dụ, nó có thể được tạo ra bằng cách cho các phenol như p-nitrophenol, N-hydroxy benzotriazol, N-hydroxy suxinimit, hoặc chất tương tự, phản ứng với axit carboxylic (5) sử dụng chất ngưng tụ như N,N'-dixyclohexylcarbodiimit hoặc 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua. Ngoài ra, este hoạt tính còn có thể được tạo ra bằng phản ứng của axit carboxylic (5) với pentaflorophenyl trifloaxetat hoặc chất tương tự; phản ứng của axit carboxylic (5) với 1-benzotriazolyl oxytripyrrolidinophosphoni hexaflorophosphit; phản ứng của axit carboxylic (5) với dietyl xyanophosphonat (phương pháp muối hóa (salting-in)); phản ứng của axit carboxylic (5) với triphenylphosphin và 2,2'-dipyridyl disulfua (phương pháp Mukaiyama); phản ứng của axit carboxylic (5) với dẫn xuất triazin như 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (DMTMM); hoặc chất tương tự. Ngoài ra, phản ứng cũng có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp axit halogenua nhờ đó axit carboxylic (5) được xử lý với axit halogenua như thionyl clorua và oxalyl clorua khi có mặt bazơ.

Bằng cách cho este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, hoặc axit halogenua của axit carboxylic (5) thu được như trên phản ứng với hợp chất (4) khi có mặt bazơ thích hợp trong dung môi trơ ở nhiệt độ -78°C đến 150°C, hợp chất (6) có thể được tạo ra. (trong đó, "dung môi trơ" chỉ dung môi không ức chế phản ứng trong đó dung môi được sử dụng.)

Ví dụ cụ thể về bazơ được sử dụng cho mỗi bước nêu trên bao gồm cacbonat, alkoxit, hydroxit hoặc hydrua của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ như natri cacbonat, kali cacbonat, natri etoxit, kali butoxit, natri hydroxit, kali hydroxit, natri hydrua, và kali hydrua; bazơ hữu cơ chứa kim loại là alkyl lithi như n-butyl lithi, hoặc dialkylamino lithi như lithi diisopropylamit; bazơ hữu cơ chứa kim loại của bissilylamin như lithi bis(trimetylsilyl)amit; và bazơ hữu cơ bao gồm amin bậc ba hoặc hợp chất dị vòng chứa nitơ như pyridin, 2,6-lutidin, colidin, 4-dimethylaminopyridin, trietylamin, N-metyl morpholin, diisopropyletylamin, và diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU).

Ví dụ về dung môi trơ được sử dụng cho phản ứng theo sáng chế bao gồm dung môi hydrocacbon được halogen hóa như diclometan, cloroform, và cacbon tetraclorea; dung môi ete như tetrahydrofuran, 1,2-dimetoxyetan, và dioxan; dung môi hydrocacbon thơm như benzen và toluen; và dung môi amit như N,N-dimetylformamit, N,N-dimetylaxetamit, và N-metylpyrolidin-2-on. Ngoài các dung môi này ra, dung môi sulfoxit như dimetyl sulfoxit và sulfolan; và dung môi keton như axeton và metyl etyl keton và dung môi rượu như metanol và etanol có thể được sử dụng trong một số trường hợp. Ngoài ra, dung môi hỗn hợp của chúng cũng có thể được sử dụng.

Đối với nhóm bảo vệ P<sup>1</sup> cho nhóm amin đầu tận của hợp chất (6), nhóm bảo vệ cho nhóm amin thường được sử dụng để tổng hợp peptit, ví dụ, nhóm tert-butyloxy cacbonyl, nhóm 9-florenylmetyloxy cacbonyl, hoặc nhóm benzyloxy cacbonyl, có thể được sử dụng. Ví dụ về các nhóm bảo vệ khác cho nhóm amin bao gồm nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm alkoxycacbonyl như nhóm metoxycacbonyl và nhóm etoxycacbonyl; nhóm arylmetoxy cacbonyl như nhóm parametoxibenzyloxy cacbonyl, và nhóm para (hoặc ortho)nitrobenzyloxy cacbonyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl và nhóm triphenyl metyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm aryl sulfonyl như nhóm 2,4-dinitrobenzen sulfonyl và nhóm orthonitrobenzen sulfonyl. Nhóm bảo vệ P<sup>1</sup> có thể được chọn tùy vào, ví dụ, tính chất của hợp chất có nhóm amin cần được bảo vệ.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P<sup>1</sup> đối với nhóm amin đầu tận của hợp chất (6) thu được, có thể tạo ra hợp chất (7). Ở bước khử bảo vệ này, các chất phản ứng và các điều kiện có thể được chọn tùy vào nhóm bảo vệ.

Hợp chất (9) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất peptit axit carboxylic (8) có đầu N được bảo vệ bằng P<sup>2</sup> thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (7) thu được. Các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trơ được sử dụng để tạo ra liên kết peptit nằm giữa peptit axit carboxylic (8) và hợp chất (7) có thể được chọn thích hợp từ các chất được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ P<sup>2</sup> có thể được chọn thích hợp từ các nhóm được mô tả đối với nhóm bảo vệ của hợp chất (6), và việc lựa chọn có thể được thực hiện dựa trên, ví dụ, các tính chất của hợp chất có nhóm amin cần được bảo vệ. Vì nó thường được sử dụng để tổng hợp peptit, bằng cách lặp lại lần lượt phản ứng gắn và

khử bảo vệ axit amin hoặc peptit tạo nên peptit axit carboxylic (8) để kéo dài, hợp chất (9) cũng có thể được tạo ra.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P<sup>2</sup> đối với nhóm amin của hợp chất (9) thu được, có thể tạo ra hợp chất (10). Ở bước khử bảo vệ này, các chất phản ứng và các điều kiện có thể được chọn tùy vào nhóm bảo vệ.

Có thể tạo ra hợp chất (2) bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (11) thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (10) thu được. Các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo ra liên kết peptit giữa axit carboxylic (11) và hợp chất (10) có thể được chọn thích hợp từ các điều kiện, chất phản ứng, bazơ và dung môi được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

Hợp chất (9) cũng có thể được tạo ra bằng, ví dụ, phương pháp sau đây.

Hợp chất (13) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất cho peptit axit carboxylic (8) có đầu N được bảo vệ bằng P<sup>2</sup> thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, hoặc chất tương tự và cho nó phản ứng khi có mặt bazơ với hợp chất amin (12) có nhóm carboxy được bảo vệ bằng P<sup>3</sup>. Các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo ra liên kết peptit giữa peptit axit carboxylic (8) và hợp chất (12) có thể được chọn thích hợp từ các điều kiện, chất phản ứng, bazơ và dung môi trợ đã được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ P<sup>2</sup> cho nhóm amin của hợp chất (13) không bị giới hạn cụ thể miễn nó là nhóm bảo vệ thường được sử dụng.

Cụ thể, các ví dụ về nhóm bảo vệ đối với nhóm hydroxyl có thể bao gồm nhóm alkoxymetyl như nhóm metoxymetyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl, nhóm 4-metoxybenzyl, và nhóm triphenylmetyl; nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm silyl như nhóm tert-butyl diphenylsilyl. Nhóm carboxy có thể được bảo vệ, ví dụ, dưới dạng este bằng nhóm alkyl như nhóm methyl, nhóm etyl, và nhóm tert-butyl, nhóm alyl, hoặc nhóm arylmetyl như nhóm benzyl. Ví dụ về nhóm bảo vệ đối với nhóm amin có thể bao gồm: nhóm alkyloxy cacbonyl như nhóm tert-butyloxy cacbonyl, nhóm metoxycarbonyl, và nhóm etoxycarbonyl; nhóm alyloxy carbonyl, hoặc nhóm arylmetoxy carbonyl như nhóm 9-floenylmetyloxy carbonyl, nhóm benzyloxy carbonyl, nhóm parametoxibenzyloxy carbonyl, và nhóm

para (hoặc ortho)nitrobenzyloxy carbonyl; nhóm alkanoyl như nhóm acetyl; nhóm arylmethyl như nhóm benzyl và nhóm triphenyl methyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm aryl sulfonyl như nhóm 2,4-dinitrobenzen sulfonyl hoặc nhóm orthonitrobenzen sulfonyl.

Đối với nhóm bảo vệ  $P^3$  cho nhóm carboxy, nhóm bảo vệ thường được sử dụng làm nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy trong hóa tổng hợp hữu cơ, cụ thể, quy trình tổng hợp peptit có thể được sử dụng. Cụ thể, nó có thể được chọn một cách thích hợp từ các nhóm bảo vệ nêu trên, ví dụ, các este có nhóm alkyl như nhóm methyl, nhóm ethyl, hoặc tert-butyl, các allyl este, và benzyl este.

Trong các trường hợp này, nhóm bảo vệ cho nhóm amin và nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy tốt hơn là có thể được loại bỏ bằng phương pháp khác nhau hoặc các điều kiện khác nhau. Ví dụ, ví dụ tiêu biểu bao gồm dạng kết hợp trong đó  $P^2$  là nhóm tert-butyloxy carbonyl và  $P^3$  là nhóm benzyl. Các nhóm bảo vệ có thể được chọn từ các nhóm nêu trên tùy vào, ví dụ, đặc tính của các hợp chất có nhóm amin và nhóm carboxy cần được bảo vệ. Để loại bỏ nhóm bảo vệ, có thể lựa chọn chất phản ứng và điều kiện tùy vào nhóm bảo vệ này.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ  $P^3$  của nhóm carboxy của hợp chất (13) thu được, hợp chất (14) có thể được tạo ra. Ở bước khử bảo vệ, chất phản ứng và điều kiện được chọn tùy vào nhóm bảo vệ.

Hợp chất (9) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất từ hợp chất (14) thu được thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (4) khi có mặt bazơ. Để phản ứng, chất phản ứng và điều kiện phản ứng thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng có thể được chọn thích hợp từ điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

Hợp chất (2) cũng có thể được tạo ra bằng, ví dụ, phương pháp sau đây.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ  $P^2$  cho nhóm amin của hợp chất (13), hợp chất (15) có thể được tạo ra. Ở bước khử bảo vệ, chất phản ứng và điều kiện có thể được chọn tùy vào nhóm bảo vệ.



Hợp chất (16) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất từ dẫn xuất axit carboxylic (11) thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (15) đã thu được khi có mặt bazơ. Điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo ra liên kết amit giữa peptit axit carboxylic (11) và hợp chất (15) có thể được chọn thích hợp từ điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

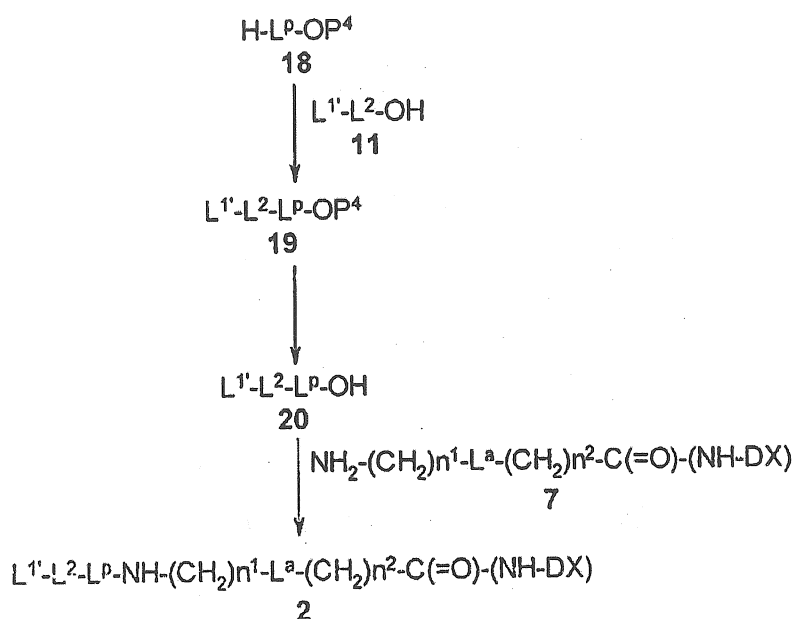
Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy của hợp chất (16) đã thu được, hợp chất (17) có thể được tạo ra. Bước khử bảo vệ có thể được tiến hành tương tự với bước khử bảo vệ ở nhóm carboxy để tạo ra hợp chất (14).

Hợp chất (2) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (17) thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (4) khi có mặt bazơ. Để phản ứng, chất phản ứng và điều kiện phản ứng thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng có thể được chọn thích hợp từ điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

### 3. Phương pháp sản xuất 3

Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (2) của chất trung gian cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp sau.

(Công thức 23)



Trong công thức trên,  $L^{1'}$  tương ứng với  $L^1$  có cấu trúc trong đó đầu được chuyển hóa thành nhóm maleimityl, và  $P^4$  là nhóm bảo vệ.

Hợp chất (19) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (11) thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với peptit của axit carboxylic (18) có đầu C được bảo vệ bằng  $P^4$  khi có mặt bazơ. Điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trơ được sử dụng để tạo ra liên kết peptit giữa peptit của axit carboxylic (18) và hợp chất (11) có thể được chọn thích hợp từ điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trơ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ  $P^4$  cho nhóm carboxy của hợp chất (18) có thể được chọn thích hợp từ nhóm bảo vệ nêu trên.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy của hợp chất (19) đã thu được, hợp chất (20) có thể được tạo ra. Bước khử bảo vệ có thể được thực hiện tương tự với bước khử bảo vệ ở nhóm carboxy để tạo ra hợp chất (14).

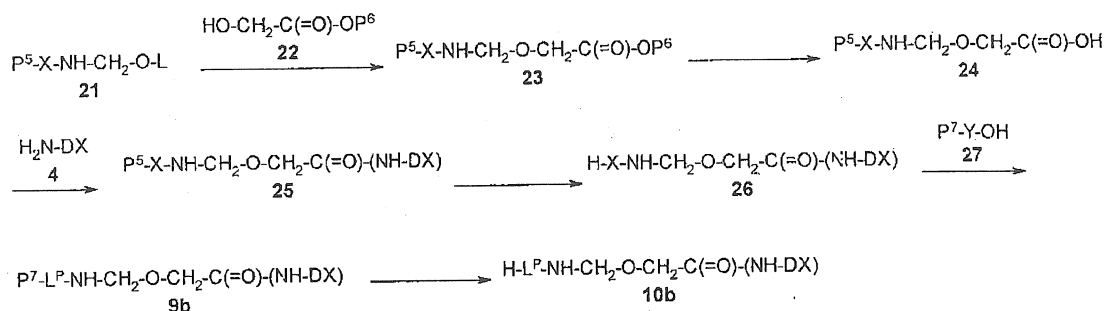
Hợp chất (2) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (20) đã thu được thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (7). Để phản ứng, chất phản ứng và điều kiện phản ứng thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trơ được sử dụng cho phản ứng có thể được chọn thích hợp từ điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trơ được mô tả để tổng hợp hợp chất

(6).

## 4. Phương pháp sản xuất 4

Dưới đây, phương pháp tạo ra hợp chất (10b) có  $n^1 = 1$ ,  $L^a = O$  trong chất trung gian sản xuất (10) được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 được mô tả chi tiết. Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (10b), muối hoặc solvat của nó có thể được tạo ra theo phương pháp sau đây, ví dụ.

(Công thức 24)



Trong công thức trên,  $L^p$  như được định nghĩa ở trên, L là nhóm axyl mà là nhóm alkanoyl như nhóm axetyl hoặc nhóm aroyl như nhóm benzoyl, hoặc nguyên tử hydro, mỗi X và Y là oligopeptit chứa từ 1 đến 3 axit amin, mỗi  $P^5$  và  $P^7$  là nhóm bảo vệ cho nhóm amin, và  $P^6$  là nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy.

Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (21) có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hoặc áp dụng phương pháp được nêu trong đơn sáng chế Nhật số 2002- 60351 hoặc tài liệu (J. Org. Chem., Vol. 51, page 3196, 1986), và bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ hoặc cải biến các nhóm chức, nếu cần. Hơn nữa, cũng có thể thu được hợp chất này bằng cách xử lý axit amin với nhóm amin đầu tận được bảo vệ hoặc axit amit của oligopeptit có nhóm amin được bảo vệ với aldehyt hoặc keton.

Bằng cách cho hợp chất (21) phản ứng với hợp chất (22) có nhóm hydroxyl ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ điều kiện dưới nhiệt độ làm mát đến nhiệt độ trong phòng trong dung môi trơ khi có mặt axit hoặc bazơ, hợp chất (23) có thể được tạo ra.

Ở đây, ví dụ về axit có thể được sử dụng bao gồm axit vô cơ như axit flohydric, axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và axit boric; axit hữu cơ như axit axetic, axit xitric, axit paratoluen sulfonic, và axit metansulfonic; và axit Lewis như tetrafloroborat, kẽm clorua, thiếc clorua, nhôm clorua, và sắt clorua. Trong số này, axit sulfonic, cụ thể, axit paratoluen sulfonic được ưu tiên. Đối với bazơ, bất kỳ một

trong số các bazơ đã nêu có thể được chọn thích hợp và được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên của nó bao gồm alkoxit kim loại kiềm như kali tert-butoxit, hydroxit kim loại kiềm như natri hydroxit và kali hydroxit; hydrua kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ như natri hydrua và kali hydrua; bazơ hữu cơ chứa kim loại được biểu diễn bằng dialkylamino lithi như lithi diisopropylamit; và bazơ hữu cơ chứa kim loại của bisilylamin như lithi bis(trimetylsilyl)amit.

Ví dụ về dung môi cần được sử dụng cho phản ứng bao gồm dung môi ete như tetrahydrofuran và 1,4-dioxan; và dung môi hydrocacbon thơm như benzen và toluen. Các dung môi này có thể thu được dưới dạng hỗn hợp với nước.

Ngoài ra, nhóm bảo vệ cho nhóm amin như được lấy làm ví dụ bởi P<sup>5</sup> không bị giới hạn cụ thể với điều kiện nó là nhóm thường được sử dụng để bảo vệ cho nhóm amin. Ví dụ tiêu biểu bao gồm các nhóm bảo vệ cho nhóm amin được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Tuy nhiên, trong phản ứng này, có thể có trường hợp trong đó nhóm bảo vệ cho nhóm amin như được lấy làm ví dụ bởi P<sup>5</sup> bị cắt đứt. Trong trường hợp như vậy, nhóm bảo vệ có thể được đưa vào lần nữa bằng cách thực hiện một cách thích hợp phản ứng với chất phản ứng thích hợp để bảo vệ nhóm amin khi cần.

Hợp chất (24) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>6</sup> của hợp chất (23). Ở đây, ví dụ tiêu biểu về nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy như được lấy làm ví dụ bởi P<sup>6</sup> được mô tả trong phương pháp sản xuất 2, và nó có thể được chọn thích hợp từ các nhóm này. Trong hợp chất (23), trong trường hợp này được mong đợi là nhóm bảo vệ P<sup>5</sup> cho nhóm amin và nhóm bảo vệ P<sup>6</sup> cho nhóm carboxy là nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ bằng phương pháp khác hoặc điều kiện khác. Ví dụ, ví dụ tiêu biểu bao gồm hỗn hợp trong đó P<sup>5</sup> là nhóm 9-florenylmetyloxy cacbonyl và P<sup>6</sup> là nhóm benzyl. Nhóm bảo vệ có thể được chọn tùy vào, ví dụ, đặc tính của hợp chất có nhóm amin và nhóm carboxy cần được bảo vệ. Để loại bỏ nhóm bảo vệ, chất phản ứng và điều kiện được chọn tùy vào nhóm bảo vệ.

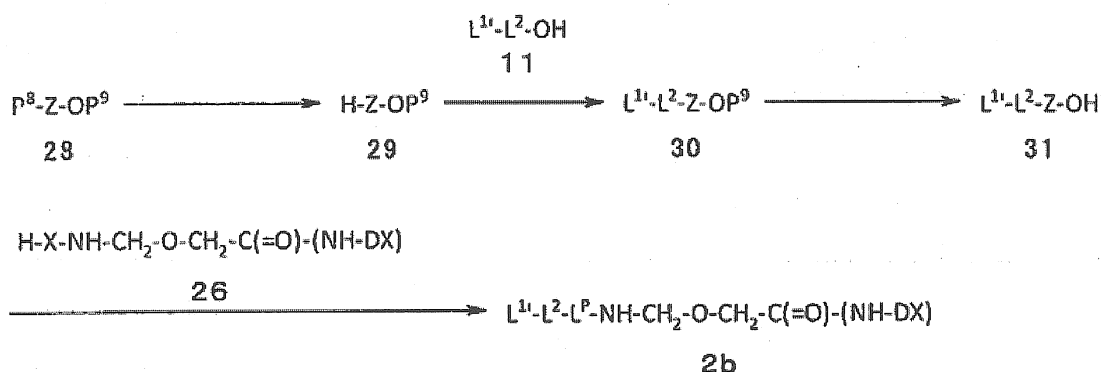
Hợp chất (26) có thể được tạo ra bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (24) thành este hoạt tính, axit anhydrua được trộn, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (4) hoặc muối được dùng của nó để tạo ra hợp chất (25) sau đó loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>5</sup> của hợp chất (25) đã thu được. Đối với phản ứng giữa hợp chất (4) và axit carboxylic (24) và phản ứng để loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>6</sup>, các chất phản ứng và điều kiện phản ứng giống như được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 có thể được sử dụng.

Hợp chất (10b) có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất (26) phản ứng với axit amin có nhóm amin đầu được bảo vệ hoặc oligopeptit (27) có nhóm amin được bảo vệ để tạo ra hợp chất (9b) và loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>7</sup> của hợp chất 9b) đã thu được. Nhóm bảo vệ cho nhóm amin như được biểu diễn bằng P<sup>7</sup> không bị giới hạn cụ thể với điều kiện nó thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amin. Ví dụ tiêu biểu của nó bao gồm nhóm bảo vệ cho nhóm amin được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Để loại bỏ nhóm bảo vệ, chất phản ứng và điều kiện được chọn tùy vào nhóm bảo vệ. Đối với phản ứng giữa hợp chất (26) và hợp chất (27), chất phản ứng và điều kiện phản ứng thường được sử dụng để tổng hợp peptit có thể được sử dụng. Hợp chất (10b) được tạo ra bằng phương pháp nêu trên có thể được tạo dẫn xuất thành hợp chất (1) theo sáng chế theo phương pháp nêu trên.

### 5. Phương pháp sản xuất 5

Dưới đây, phương pháp tạo ra hợp chất (2) có n<sup>1</sup> = 1, n<sup>2</sup> = 1, L<sup>a</sup> = O trong chất trung gian sản xuất (2) được nêu trong phương pháp sản xuất 2 được mô tả chi tiết. Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (2), muối hoặc solvat của nó có thể được tạo ra theo phương pháp sau đây, ví dụ.

(Công thức 25)



Trong công thức nêu trên, L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>P</sup> như được xác định ở trên, Z là oligopeptit chứa từ 1 đến 3 axit amin, P<sup>8</sup> là nhóm bảo vệ cho nhóm amin, và P<sup>9</sup> là nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy.

Hợp chất (30) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>8</sup> của axit amin hoặc oligopeptit (28) có nhóm amin đầu được bảo vệ và nhóm carboxy để tạo ra hợp chất (29) và cho dạng amin thu được này (29) phản ứng với hợp chất (11). Nhóm bảo vệ cho nhóm amin như được biểu diễn bằng P<sup>8</sup> không bị giới hạn cụ thể với điều kiện

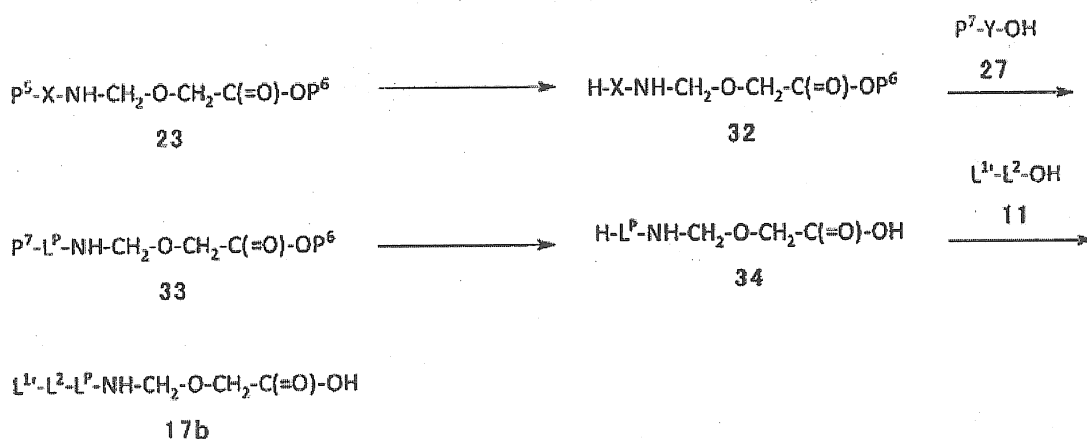
nó là nhóm thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amin. Ví dụ tiêu biểu bao gồm nhóm bảo vệ cho nhóm amin được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Ngoài ra, để loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>8</sup>, chất phản ứng và điều kiện có thể được chọn tùy vào nhóm bảo vệ. Đối với phản ứng giữa hợp chất (29) và axit carboxylic (11), chất phản ứng và điều kiện phản ứng tương tự như được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 có thể được sử dụng.

Chất trung gian sản xuất (2b) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>9</sup> của hợp chất (30) để tạo ra hợp chất (31) và cho axit carboxylic thu được (31) phản ứng với hợp chất (26). Ví dụ tiêu biểu của nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy như được biểu diễn bằng P<sup>8</sup> được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Đối với phản ứng khử bảo vệ của nó, chất phản ứng và điều kiện phản ứng tương tự như được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 có thể được sử dụng. Đối với phản ứng giữa hợp chất (26) và axit carboxylic (31), chất phản ứng và điều kiện phản ứng thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng. Hợp chất (2b) được tạo ra bằng phương pháp nêu trên có thể được tạo dẫn xuất thành hợp chất (1) theo sáng chế theo phương pháp nêu trên.

## 6. Phương pháp sản xuất 6

Dưới đây, phương pháp tạo ra hợp chất (17b) có  $n^1 = 1$ ,  $n^2 = 1$ ,  $L^a = O$  trong chất trung gian sản xuất (17) được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 được mô tả chi tiết. Hợp chất được biểu diễn bằng công thức (17b), muối hoặc solvat của nó cũng có thể được tạo ra theo phương pháp sau đây, ví dụ.

(Công thức 26)



Trong công thức này  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^P$ , X, Y,  $P^5$ ,  $P^6$ , và  $P^7$  là như được xác định ở trên.

Hợp chất (33) có thể được tạo ra bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ  $P^5$  cho nhóm amin của hợp chất (23) có nhóm amin và nhóm carboxy đầu tận được bảo vệ để tạo ra hợp chất (32) và cho dẫn xuất amin thu được (32) phản ứng với oligopeptit (27) có nhóm amin đầu tận được bảo vệ hoặc nhóm amin được bảo vệ. Nhóm bảo vệ cho nhóm amin như được biểu diễn bằng  $P^5$  không bị giới hạn cụ thể với điều kiện nó là nhóm thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amin. Ví dụ tiêu biểu bao gồm nhóm bảo vệ cho nhóm amin được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Ngoài ra, để loại bỏ nhóm bảo vệ  $P^5$ , chất phản ứng và điều kiện có thể được chọn tùy vào nhóm bảo vệ. Ở đây, mặc dù các ví dụ tiêu biểu về nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy như được biểu diễn bằng  $P^6$  và nhóm bảo vệ cho nhóm amin như được biểu diễn bằng  $P^7$  bao gồm nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy và nhóm amin được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Được mong đợi là trong hợp chất (33), nhóm bảo vệ  $P^6$  cho nhóm carboxy và nhóm bảo vệ  $P^7$  cho nhóm amin là nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ bằng cùng phương pháp hoặc cùng điều kiện. Ví dụ, ví dụ tiêu biểu bao gồm hỗn hợp trong đó  $P^6$  là nhóm benzyl este và  $P^7$  là nhóm benzyloxy cacbonyl.

Hợp chất (34) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ  $P^6$  cho nhóm carboxy của hợp chất (33) và nhóm bảo vệ  $P^7$  cho nhóm amin của hợp chất (33). Hợp chất (37) cũng có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ lần lượt nhóm bảo vệ  $P^6$  cho nhóm carboxy và nhóm bảo vệ  $P^7$  cho nhóm amin, và hơn nữa, hợp chất (34) có thể được tạo ra một cách đơn giản bằng cách loại bỏ đồng thời cả hai nhóm bảo vệ  $P^6$  và  $P^7$  mà có thể được loại bỏ bằng cùng phương pháp hoặc cùng điều kiện.

Hợp chất (17b) có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất thu được (34) phản ứng với hợp chất (11). Đối với phản ứng giữa hợp chất (34) và hợp chất (11), chất phản ứng và điều kiện phản ứng giống như được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 có thể được sử dụng.

Thể liên hợp kháng thể kháng HER2-dược chất theo sáng chế, khi nó ở lại trong không khí hoặc được tái kết tinh hoặc được tinh sạch, có thể hút ẩm hoặc có nước thẩm hút hoặc chuyển lại thành hydrat, và các hợp chất hoặc muối chứa nước này cũng được bao gồm trong sáng chế.

Hợp chất được đánh dấu bằng nhiều chất đồng vị phóng xạ hoặc không phóng xạ

cũng được bao gồm trong sáng chế. Một hoặc nhiều nguyên tử tạo nên thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế có thể chứa chất đồng vị nguyên tử ở tỷ lệ không tự nhiên. Ví dụ về chất đồng vị nguyên tử bao gồm đơteri ( $^2\text{H}$ ), triti ( $^3\text{H}$ ), iot-125 ( $^{125}\text{I}$ ), và cacbon-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được đánh dấu phóng xạ bằng chất đồng vị phóng xạ như triti ( $^3\text{H}$ ), iodin-125 ( $^{125}\text{I}$ ), cacbon-14 ( $^{14}\text{C}$ ), đồng-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), ziriconi-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ), iodin-124 ( $^{124}\text{I}$ ), flo-18 ( $^{18}\text{F}$ ), indi-111 ( $^{111}\text{I}$ ), cacbon-11 ( $^{11}\text{C}$ ) và iot-131 ( $^{131}\text{I}$ ). Hợp chất được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ hữu ích để làm chất trị liệu hoặc chất phòng ngừa, chất phản ứng để nghiên cứu như chất phản ứng phân tích và chất để chẩn đoán như chất chẩn đoán bằng hình ảnh in vivo. Không bị ràng buộc ở hoạt tính phóng xạ, loại biến thể chất đồng vị bất kỳ của thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế nằm trong phạm vi của sáng chế.

### Thuốc

Thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế thể hiện hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào ung thư, và do đó, nó có thể được sử dụng làm thuốc, cụ thể là làm chất điều trị và/hoặc chất phòng ngừa đối với bệnh ung thư.

Tức là, thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế có thể được sử dụng chọn lọc làm thuốc cho phương pháp hóa trị liệu, là phương pháp điều trị ung thư chính, và do đó, có thể làm chậm sự phát triển của các tế bào ung thư, ức chế sự phát triển của nó, và hơn nữa là tiêu diệt tế bào ung thư. Điều này có thể cho phép bệnh nhân ung thư tránh được các triệu chứng do bệnh ung thư gây ra hoặc có được sự cải thiện QOL của bệnh nhân ung thư và đạt được hiệu quả điều trị bằng cách duy trì sự sống của bệnh nhân ung thư. Ngay cả khi thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế không tiêu diệt được tế bào ung thư, nó có thể đạt được QOL cao hơn ở bệnh nhân ung thư trong khi có được khả năng sống sót trong thời gian lâu hơn, bằng cách ức chế hoặc kiểm soát sự phát triển của tế bào ung thư.

Trong phương pháp điều trị bằng thuốc này, có thể sử dụng một mình thuốc này và ngoài ra, có thể sử dụng thuốc kết với liệu pháp bổ sung trong liệu pháp tá dược và có thể kết hợp với phẫu thuật, xạ trị, điều trị bằng hormon, hoặc phương pháp tương tự. Hơn nữa, cũng có thể sử dụng làm thuốc cho liệu pháp bằng thuốc trong liệu pháp tá dược mới.

Ngoài việc sử dụng để điều trị như nêu trên, tác dụng ức chế sự phát triển của tế



bào ung thư di căn nhỏ và hơn nữa là tiêu diệt chúng cũng có thể được mong đợi. Cụ thể, khi sự biểu hiện của HER2 được xác nhận trong tế bào ung thư sơ cấp, việc ức chế sự di căn ung thư hoặc tác dụng phòng ngừa có thể được mong đợi bằng cách sử dụng thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế. Ví dụ, tác dụng ức chế và tiêu diệt tế bào ung thư trong dịch cơ thể ở giai đoạn di căn hoặc tác dụng, ví dụ, ức chế và tiêu diệt tế bào ung thư nhỏ ngay sau khi cấy ghép vào mô bất kỳ có thể được mong đợi. Do đó, việc ức chế sự di căn ung thư hoặc tác dụng phòng ngừa có thể được mong đợi, cụ thể, sau khi phẫu thuật loại bỏ ung thư.

Thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế có thể được mong đợi là đem lại tác dụng điều trị bệnh bằng cách sử dụng liệu pháp theo đường toàn thân cho bệnh nhân, và ngoài ra, bằng cách sử dụng khu trú đối với mô ung thư.

Ví dụ về loại ung thư được sử dụng thể liên hợp kháng thể kháng HER2- được chất theo sáng chế có thể bao gồm ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư vú, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, u mô đệm đường tiêu hóa, ung thư cổ tử cung, ung thư thực quản, carcinom tế bào vảy, ung thư màng bụng, ung thư gan, ung thư tế bào gan, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư đại trực tràng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tử cung, ung thư tuyến nước bọt, ung thư thận, ung thư âm hộ, ung thư tuyến giáp, hoặc ung thư dương vật. Đối tượng điều trị của thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế là tế bào ung thư biểu hiện, trong tế bào ung thư dùng làm đối tượng điều trị, protein HER2 mà kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-được chất có thể nhận diện được. Thuật ngữ "ung thư biểu hiện protein HER2" như được sử dụng trong bản mô tả là ung thư chứa các tế bào có protein HER2 trên bề mặt tế bào của chúng. Protein HER2 được biểu hiện quá ở nhiều khối u khác nhau của người và có thể được đánh giá sử dụng phương pháp thường được tiến hành trong lĩnh vực này, như phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch (IHC) để đánh giá sự biểu hiện quá protein HER2, hoặc phương pháp lai in situ phát huỳnh quang (fluorescence in situ hybridization - FISH) để đánh giá sự khuếch đại của gen HER2.

Ngoài ra, thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế thể hiện tác dụng kháng u bằng cách nhận biết, thông qua kháng thể kháng HER2 của nó, protein HER2 được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư và nhập nội vào tế bào ung thư. Do đó, đối tượng điều trị của thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được

chất theo sáng chế không bị giới hạn ở "ung thư biểu hiện protein HER2" và cũng có thể là, ví dụ, bệnh bạch cầu, u lympho ác tính, u tương bào, u tủy, hoặc sarcom.

Thế liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế tốt hơn là có thể dùng được cho động vật có vú, còn tốt hơn nữa là dùng được cho người.

Các chất được sử dụng trong dược phẩm chứa thế liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế có thể được chọn thích hợp và được áp dụng từ các chất phụ gia chế phẩm hoặc tương tự thường được sử dụng trong lĩnh vực này, về liều dùng hoặc nồng độ sử dụng.

Thế liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế có thể được dùng làm dược phẩm chứa ít nhất một thành phần thích hợp trong lĩnh vực dược phẩm. Ví dụ, dược phẩm nói trên thường chứa ít nhất một chất mang được (ví dụ, chất lỏng vô trùng). Ở đây, chất lỏng bao gồm, ví dụ, nước và dầu (dầu hỏa và dầu có nguồn gốc động vật, nguồn gốc thực vật, hoặc nguồn gốc tổng hợp. Dầu này có thể là, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, hoặc dầu mè. Nước là chất mang điển hình hơn khi dược phẩm ở trên được sử dụng trong tĩnh mạch. Dung dịch nước muối, dung dịch dextroza chứa nước, và dung dịch glyxerol chứa nước cũng có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể, cho dung dịch tiêm. Chất dẫn thuốc được dùng có thể được chọn từ các chất đã biết trong lĩnh vực này. Nếu muốn, dược phẩm trên cũng có thể chứa lượng vết của chất tạo ẩm, chất nhũ hóa, hoặc chất đệm pH. Ví dụ về chất mang được dùng được nêu trong "Remington's Pharmaceutical Sciences" bởi E. W. Martin. Các chế phẩm này tương ứng với cách thức sử dụng.

Nhiều hệ thống phân phối khác nhau là đã biết và chúng có thể được sử dụng để đưa thế liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất theo sáng chế vào. Ví dụ về con đường sử dụng có thể bao gồm trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, và các con đường dưới da, nhưng không bị giới hạn ở các con đường này. Việc sử dụng có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ tiêm hoặc tiêm tĩnh mạch nhanh (tiêm 1 liều lớn). Theo phương án ưu tiên cụ thể, việc sử dụng thế liên hợp kháng thể-được chất được thực hiện bằng cách tiêm. Sử dụng theo đường ngoài đường tiêu hóa là con đường sử dụng được ưu tiên.

Theo phương án đại diện, dược phẩm được kê, dưới dạng được dùng để sử dụng qua đường trong tĩnh mạch cho người, theo các quy trình chung. Chế phẩm để dùng

qua đường trong tĩnh mạch thường là dung dịch trong dung dịch đệm chứa nước vô trùng và đẳng trương. Nếu cần, thuốc có thể chứa chất hòa tan và chất gây tê tại chỗ để làm dịu cơn đau ở vị trí tiêm (ví dụ, lignocain). Thông thường, thành phần nêu trên được cung cấp riêng rẽ ở dạng bất kỳ trong số bột được làm khô lạnh hoặc chất cô khan có trong vật chứa thu được bằng cách bịt kín trong ampun hoặc trong gói nhỏ có lượng chất hoạt tính hoặc ở dạng hỗn hợp ở dạng liều đơn vị. Khi thuốc được sử dụng bằng cách tiêm, nó có thể được sử dụng từ chai tiêm chứa nước hoặc nước muối ở mức vô trùng được lý. Khi thuốc được sử dụng bằng cách tiêm, ampun chứa nước hoặc nước muối vô trùng để tiêm có thể được cung cấp sao cho các thành phần nêu trên được trộn với nhau trước khi sử dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể là dược phẩm chỉ chứa thể liên hợp kháng thể kháng HER2-dược chất theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa thể liên hợp kháng thể kháng HER2-dược chất và ít nhất một chất điều trị ung thư không phải thể liên hợp này. Thể liên hợp kháng thể kháng HER2-dược chất theo sáng chế có thể được sử dụng với chất điều trị ung thư khác. Tác dụng chống ung thư do đó có thể được tăng cường. Các chất chống ung thư khác được sử dụng cho mục đích này có thể được dùng riêng rẽ đồng thời với, riêng biệt với, hoặc lần lượt với thể liên hợp kháng thể-dược chất, và có thể được sử dụng trong khi làm thay đổi khoảng thời gian nghỉ giữa mỗi lần sử dụng với mỗi chất. Ví dụ về chất điều trị ung thư bao gồm 5-FU, pertuzumab, paclitaxel, carboplatin, cisplatin, gemcitabine, capecitabine, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastin, vinorelbine, everolims, tanespimyxin, bevacizumab, oxaliplatin, lapatinib, ado-trastuzumab emtansin (T-DM1), hoặc các thuốc được mô tả trong công bố quốc tế số WO 2003/038043, các thể tương đồng LH-RH (leuprorelin, goserelin, hoặc chất tương tự), estramustin phosphat, các chất đối kháng estrogen (tamoxifen, raloxifene, hoặc chất tương tự), và các chất ức chế aromatase (anastrozol, letrozol, exemestan, hoặc chất tương tự), nhưng không bị giới hạn miễn chúng là thuốc có hoạt tính kháng u.

Dược phẩm có thể được bào chế theo công thức thành chế phẩm khô lạnh hoặc chế phẩm lỏng ở dạng chế phẩm có hợp phân mong muốn và độ tinh sạch được yêu cầu. Khi được bào chế theo công thức ở dạng chế phẩm khô lạnh, nó có thể là chế phẩm chứa chất phụ gia chế phẩm thích hợp được sử dụng trong lĩnh vực này. Cũng vậy với chế phẩm lỏng, nó có thể được bào chế theo công thức ở dạng chế phẩm lỏng

chứa nhiều chất phụ gia chế phẩm khác nhau được sử dụng trong lĩnh vực này.

Hợp phần và nồng độ được phẩm có thể thay đổi tùy vào phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thể liên hợp kháng thể kháng HER2-được chất có trong được phẩm theo sáng chế có thể thể hiện tác dụng được lý ngay cả ở liều nhỏ khi thể liên hợp kháng thể-được chất có ái lực cao hơn đối với kháng nguyên, tức là, ái lực cao (= giá trị  $K_d$  thấp) về mặt hằng số phân ly (tức là, giá trị  $K_d$ ) đối với kháng nguyên. Do đó, để xác định liều dùng của thể liên hợp kháng thể-được chất, liều dùng này có thể được xác định trong trường hợp liên quan đến ái lực giữa thể liên hợp kháng thể-được chất và kháng nguyên. Khi thể liên hợp kháng thể-được chất theo sáng chế được sử dụng cho người, ví dụ, khoảng 0,001 đến 100 mg/kg có thể được sử dụng một lần hoặc vài lần với khoảng nghỉ là từ 1 đến 180 ngày.

#### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sáng chế được mô tả cụ thể bằng các ví dụ được thể hiện dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này. Ngoài ra, sáng chế không nên được hiểu theo nghĩa giới hạn. Ngoài ra, trừ khi được mô tả khác một cách cụ thể, chất phản ứng, dung môi, và vật liệu bắt đầu được mô tả trong bản mô tả có thể thu được dễ dàng từ nhà cung cấp thương mại.

#### **Ví dụ tham khảo 1. Điều chế trastuzumab**

14 lọ nhỏ chứa 440 mg Herceptin /lọ (Genentech, Inc.) được hòa tan trong 2L đệm sắc ký trao đổi cation A (đệm xitrat 25mM, NaCl 30mM, pH = 5,0) và được lọc qua bộ lọc 0,2  $\mu$ m (Millipore Corp.: Stericup 0,22  $\mu$ m, màng GVPVDF). Các mẫu được gữa lên cột sắc ký trao đổi cation (SP Sepharose HP 240 ml, cột XK50), sau đó rửa giải trong điều kiện gradien tuyến tính nồng độ NaCl từ 30mM đến 500 mM sử dụng đệm sắc ký trao đổi cation B (đệm xitrat 25 mM, NaCl 500 mM, pH = 5,0) để tách các phần monome IgG. Các mẫu monome có độ tinh sạch cao hơn 98% bằng phân tích sắc ký loại trừ kích cỡ được kết hợp và được cô bằng UF30K (Millipore Corp.: PELLICON XL Filter, BIOMAX 30K, PXB030A50), và đệm được thay bằng đệm CBS (xitrat 10 mM/NaCl 140 mM, pH = 6,0). Mẫu được thay bằng đệm CBS được lọc qua bộ lọc 0,2  $\mu$ m (Sartorius AG: Minisart-Plus 0,2 $\mu$ m, 17823K).

#### **Ví dụ tham khảo 2. Sản xuất trastuzumab emtansin T-DM1**

Tạo dẫn xuất SMCC của kháng thể: Bằng cách sử dụng quy trình chung C-2 (PBS6.5/EDTA được sử dụng làm dung dịch đệm), quy trình chung A, và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,37 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng) được mô tả trong phương pháp sản xuất 1, việc thay thế đệm bằng PBS6.5/EDTA được thực hiện trên trastuzumab đã được tạo ra trong Ví dụ tham khảo 1 để điều chế dung dịch chứa trastuzumab (160,0 mg) đã được hòa tan trong PBS6.5/EDTA (7,60 mL) trong ống polypropylen 15 mL. Sau đó, SMCC (1,84 mg) dung dịch DMSO (0,40 mL; tương ứng với khoảng 5,1 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh để có nồng độ kháng thể là 20mg/mL, và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng máy quay ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS ONE Corporation) trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng này được đem đi tinh sạch theo quy trình chung D-2 (PBS6.5/EDTA được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 12 mL dung dịch chứa 154,9 mg kháng thể được tạo dẫn xuất SMCC.

Thế liên hợp giữa kháng thể và thành phần liên kết được chất: Bổ sung PBS6.5/EDTA (2,56 mL) và  $\text{N}^2$ -deacetyl- $\text{N}^2$ -(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin (4,67 mg; DM1, Journal of Medicinal Chemistry, 2006, Vol. 49, No. 14, p. 4392), dung dịch DMA (dimethylacetamide) (0,93 mL; tương ứng với khoảng 5,8 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể được tạo dẫn xuất SMCC) vào dung dịch thu được ở trên trong ống polypropylen 50 mL ở nhiệt độ trong phòng, dung dịch phản ứng được điều chỉnh đến nồng độ kháng thể là 10 mg/mL, và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng máy quay ống trong 16,5 giờ.

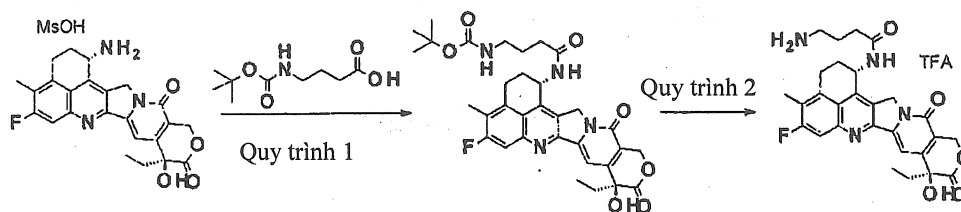
Quy trình tinh sạch: Dung dịch nêu trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 sử dụng dung dịch đệm natri phosphat (10 mM, pH = 6,5) chứa natri clorua (137 mM) để tạo ra 35 mL dung dịch chứa hợp chất của ví dụ tham khảo đích.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E sử dụng độ hấp thụ UV ở hai bước sóng 252 nm và 280 nm, các giá trị đặc trưng sau được thu nhận.

Nồng độ kháng thể: 4,14 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 144,9 mg (91%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 3,0.

Ví dụ 1. Hợp chất trung gian (1)

(Công thức 27)



Quy trình 1: tert-Butyl (4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)cacbamamit

Axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic (0,237 g, 1,13 mmol) được hòa tan trong diclometan (10 mL), N-hydroxysuccinimide (0,130 g, 1,13 mmol) và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (0,216 g, 1,13 mmol) được bổ sung và khuấy trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch N,N-dimethylformamide (10 mL) đã được nạp muối axit metansulfonic của exatecan (0,500 g, 0,94 mmol) và triethylamin (0,157 mL, 1,13 mmol), và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 ngày. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - chloroform : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,595 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,31 (9H, s), 1,58 (1H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,66 (2H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,82-1,89 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t,  $J=6,5$  Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,24 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t,  $J=6,3$  Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 8,40 (1H, d,  $J=8,6$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 621 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

Quy trình 2: 4-Amino-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]butanamit

Hợp chất (0,388 g, 0,61 mmol) thu được trong quy trình 1 nêu trên được hòa tan trong diclometan (9 mL). Axit trifloaxetic (9 mL) được bổ sung và nó được khuấy trong 4 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - lớp hữu cơ được chia phần của chloroform: metanol: nước = 7: 3: 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] để tạo ra trifloaxetat của hợp chất

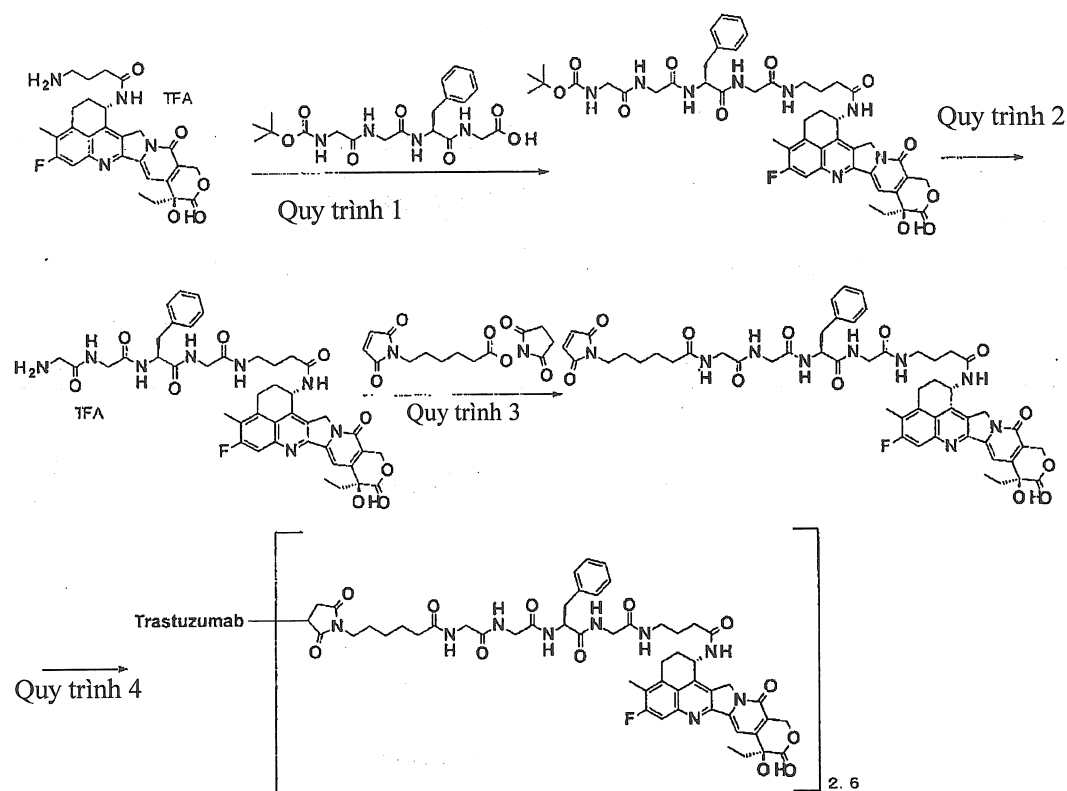
nêu trong tiêu đề (0,343 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t,  $J=7,0$  Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,26 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,72 (3H, brs), 7,82 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 8,54 (1H, d,  $J=8,6$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 521 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

Ví dụ 2. Thử liên hợp kháng thể-dược chất (2)

(Công thức 28)



Quy trình 1: N-(tert-Butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{{(1S,9S)- 9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)glyxinamit

N-(tert-butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanylglyxin (0,081 g, 0,19 mmol) được hòa tan trong diclometan (3 mL), bổ sung N-hydroxysuxinimit (0,021 g, 0,19

mmol) và 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua (0,036 g, 0,19 mmol) và sau đó khuấy trong 3,5 giờ. Dung dịch phản ứng được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch N,N-dimethylformamid (1,5 mL) đã được nạp hợp chất (0,080 g, 0,15 mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 1, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,106 g, 73%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J=7,4$  Hz), 1,36 (9H, s), 1,71 (2H, m), 1,86 (2H, t,  $J=7,8$  Hz), 2,15-2,19 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,77 (1H, dd,  $J=12,7, 8,8$  Hz), 3,02 (1H, dd,  $J=14,1, 4,7$  Hz), 3,08-3,11 (2H, m), 3,16-3,19 (2H, m), 3,54 (2H, d,  $J=5,9$  Hz), 3,57-3,77 (4H, m), 4,46-4,48 (1H, m), 5,16 (1H, d,  $J=19,2$  Hz), 5,25 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (1H, t,  $J=6,3$  Hz), 7,17-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 7,80 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 7,92 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,15 (1H, d,  $J=8,2$  Hz), 8,27 (1H, t,  $J=5,5$  Hz), 8,46 (1H, d,  $J=8,2$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 939 (M+H) $^+$

Quy trình 2: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)glyxinamid

Hợp chất (1,97 g, 2,10 mmol) thu được từ quy trình 1 ở trên được hòa tan trong diclometan (7 mL). Sau khi bổ sung axit trifloaxetic (7 mL), hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn được nạp toluen trong quá trình chưng cất đẳng phí. Cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ đã chia phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra trifloaxetat của hợp chất nêu trong tiêu đề (1,97 g, 99%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J=7,4$  Hz), 1,71-1,73 (2H, m), 1,82-1,90 (2H, m), 2,12-2,20 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,75 (1H, dd,  $J=13,7, 9,4$  Hz), 3,03-3,09 (3H, m), 3,18-3,19 (2H, m), 3,58-3,60 (2H, m), 3,64 (1H, d,  $J=5,9$  Hz), 3,69 (1H, d,  $J=5,9$  Hz), 3,72 (1H, d,  $J=5,5$  Hz), 3,87 (1H, dd,  $J=16,8, 5,9$  Hz), 4,50-4,56 (1H, m), 5,16 (1H, d,  $J=19,2$  Hz), 5,25 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 7,17-7,27 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,78-7,81 (2H, m), 7,95-7,97 (3H, m), 8,33-8,35 (2H, m), 8,48-8,51 (2H, m).



MS (APCI)  $m/z$ : 839 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexan-1-yl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino)-4-oxobutylglyxinamit

Bổ sung dung dịch chứa hợp chất (337 mg, 0,353 mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên, triethylamin (44,3 mL, 0,318 mmol) và N-suxinimetyl 6-maleimithexanoat (119,7 mg, 0,388 mmol) vào N,N-dimetylformamit (1,2 mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 5 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (278,0 mg, 76%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,66-1,76 (2H, m), 1,80-1,91 (2H, m), 2,05-2,21 (6H, m), 2,39 (3H, s), 2,79 (1H, dd, J=14,0, 9,8 Hz), 2,98-3,21 (5H, m), 3,55-3,77 (8H, m), 4,41-4,48 (1H, m), 5,15 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,40 (1H, d, J=17,1 Hz), 5,44 (1H, d, J=17,1 Hz), 5,54-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,20-7,27 (5H, m), 7,30 (1H, s), 7,70 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,8 Hz), 8,08 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,14 (1H, d, J=7,9 Hz), 8,25 (1H, t, J=6,1 Hz), 8,46 (1H, d, J=8,5 Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 1032 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 4: Thể liên hợp kháng thể-dược chất (2)

Khử kháng thể: trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm, 1,37 mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> được sử dụng) được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (3,0 mL) được đặt vào trong ống polypropylen 15 mL và được nạp dung dịch nước chứa tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua 10mM (TCEP, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0934 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,150 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH = 7,4  $\pm$  0,1, liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi ủ dung dịch trên ở 22°C trong 10 phút, dung dịch DMSO (0,187 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa 10 mM hợp chất thu được trong quy trình 3 được bổ sung vào đó và ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0374 mL; 18,4 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa N-acetylcysteine (NAC, Sigma-Aldrich Co. LLC) được bổ sung vào đó và ủ ở 22°C để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

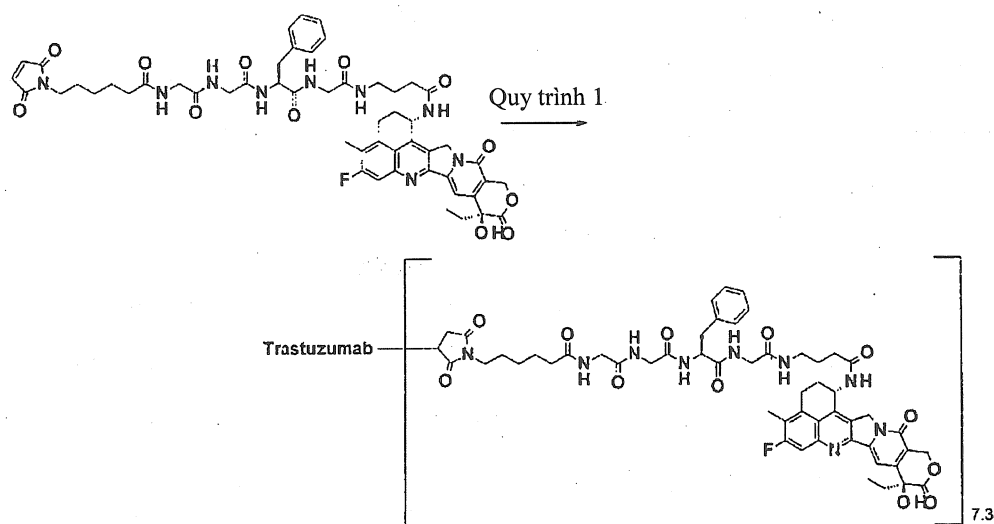
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (PBS6.0 được sử dụng làm dung dịch đệm) được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề. Sau đó, dung dịch được cô bằng quy trình chung A.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 3,21 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 22,5 mg (75%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 2,6.

Ví dụ 3. Thể liên hợp kháng thể-được chất (3)

(Công thức 29)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (3)

Khử kháng thể: trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10 mg/mL bằng cách thay môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm, 1,487 mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> được sử dụng). Dung dịch (1,25 mL) được đặt vào ống

polypropylen 1,5 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,039 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydrophosphat 1M (0,0625 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có  $pH = 7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^{\circ}C$  trong 1 giờ.

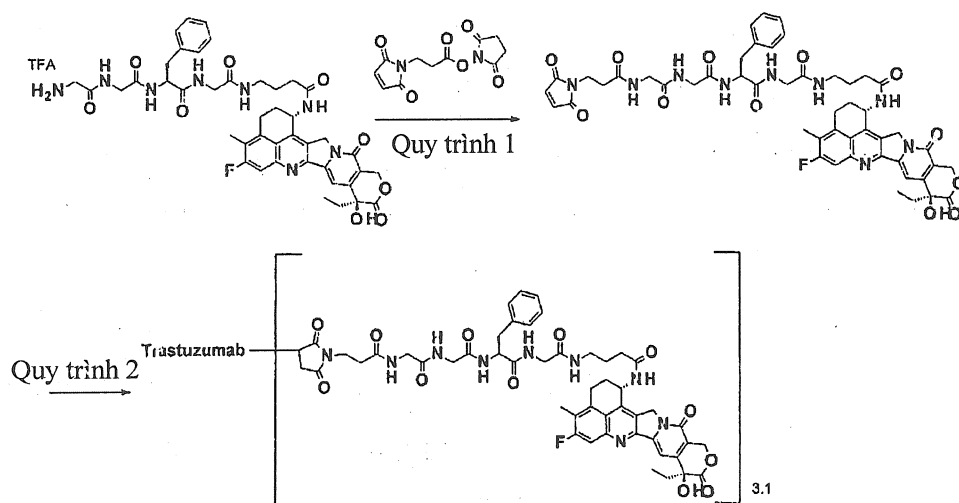
Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung DMSO (0,072 mL) và dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất của quy trình 3 từ ví dụ 2 (0,078 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được khuấy bằng cách sử dụng máy quay ống để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0155 mL; 18,4 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm. Dung dịch này được cô thêm bằng quy trình chung A. Sau đó, bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 9,85 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 6,9 mg (55%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 7,3.

Ví dụ 4. Thể liên hợp kháng thể-được chất (4)

(Công thức 30)



Quy trình 1: N-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)propanoyl]glyxylglyxyl- L-phenylalanyl-N-(4-{{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)glyxinamit

Hợp chất (80 mg, 0,084 mmol) của ví dụ 1 được cho phản ứng theo cùng cách thức như ở quy trình 3 của ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-suxinimetyl 3-maleimit propioat (24,6 mg, 0,0924 mmol) thay cho N-suxinimetyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (60,0 mg, 73%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,89 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,70-1,78 (2H, m), 1,81-1,94 (2H, m), 2,12-2,23 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,81 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,01-3,15 (3H, m), 3,16-3,23 (2H, m), 3,30-3,35 (1H, m), 3,58-3,71 (6H, m), 3,71-3,79 (1H, m), 4,44-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,0 Hz), 5,27 (1H, d, J=19,0 Hz), 5,43 (1H, d, J=17,6 Hz), 5,47 (1H, d, J=17,6 Hz), 5,57-5,63 (1H, m), 6,56 (1H, s), 7,02 (2H, s), 7,17-7,22 (1H, m), 7,22-7,30 (5H, m), 7,34 (1H, s), 7,73 (1H, t, J=5,6 Hz), 7,83 (1H, d, J=10,7 Hz), 8,08 (1H, t, J=5,6 Hz), 8,15 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,30 (2H, dt, J=18,7, 5,7 Hz), 8,49 (1H, d, J=8,8 Hz).

MS (APCI) m/z: 990 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 2: Thẻ liên hợp kháng thể-được chất (4)

Khử kháng thể: trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm, 1,48 mL.mg<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> được sử dụng). Dung dịch (1 mL) được đặt vào ống polypropylen 1,5 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (0,0155 mL; 2,3 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydrophosphat 1M (0,050 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH = 7,4 ± 0,1, liên kết disulfua ở phần bản lề in kháng thể được khử bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung DMSO (0,072 mL) và dung dịch DMSO chứa 10mM hợp chất của quy trình 3 từ Ví dụ 2 (0,031 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được khuấy bằng cách sử dụng máy quay ống để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp

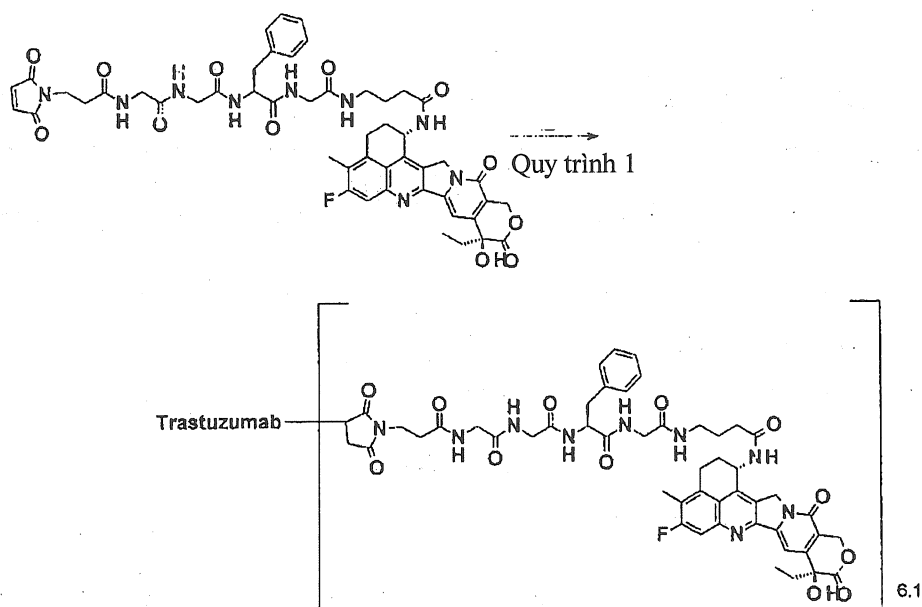
theo, dung dịch nước (0,0078 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 6 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm. Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,32 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,9 mg (79%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 3,1.

Ví dụ 5. Thể liên hợp kháng thể-được chất (5)

(Công thức 31)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (5)

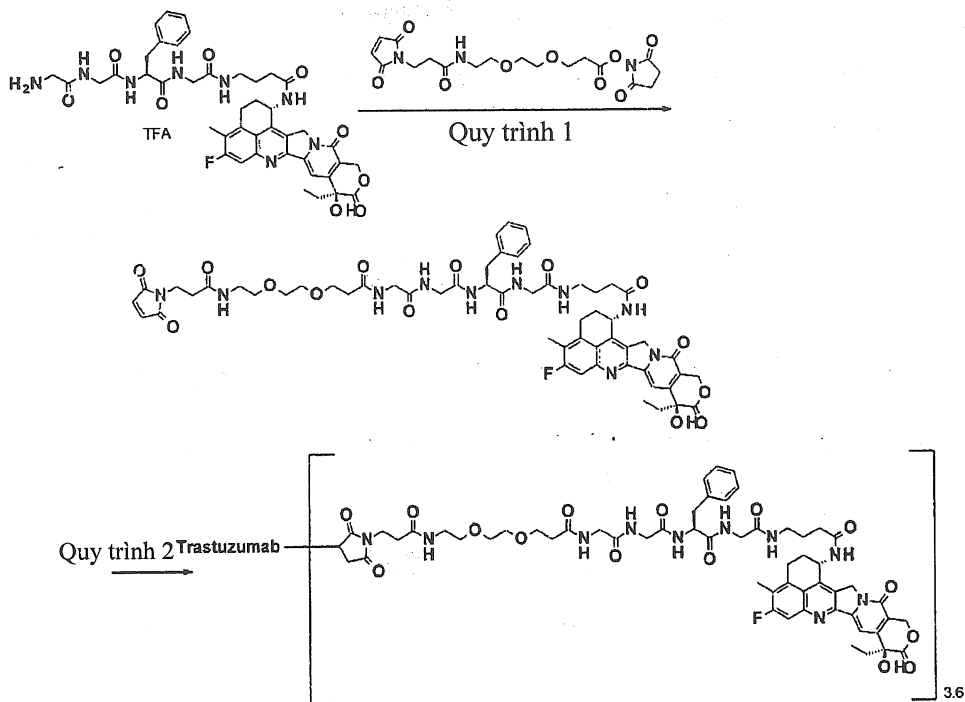
Lượng dung dịch nước chứa TCEP 10 mM được điều chỉnh sao cho tỷ lệ mol của TCEP với kháng thể ở bước khử kháng thể là 4,6. Và lượng dung dịch thành phần liên kết được chất 10 mM được bổ sung được điều chỉnh sao cho tỷ lệ mol của hợp chất của quy trình 1 từ ví dụ 4 với kháng thể ở bước liên hợp thành phần liên kết được chất là 9,2. Sau đó, lượng dung dịch nước chứa NAC 100 mM được bổ sung được điều chỉnh sao cho tỷ lệ mol của NAC với kháng thể khi kết thúc phản ứng là 18,4. Bằng cùng quy trình như quy trình 2 từ ví dụ 4, thu được 6 mL dung dịch chứa thể liên hợp

kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề, và thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,23 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,4 mg (74%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 6,1.

Ví dụ 6: Thể liên hợp kháng thể-được chất (6)

(Công thức 32)



Quy trình 1: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)propanoyl]amino}etoxy)etoxy]propanoyl}glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)glyxinamit

Hợp chất (100 mg, 0,119 mmol) thu được trong quy trình 2 từ ví dụ 2 được cho phản ứng theo cùng cách thức như ở quy trình 3 từ ví dụ 2 bằng cách sử dụng diisopropyletylamin (20,8  $\mu$ L, 0,119 mmol) thay cho trietylamin và N-suxinimetyl 3-(2-(2-(3-maleinimitepropanamit)etoxy)etoxy)propanoat (50,7 mg, 0,119 mmol) thay cho N-suxinimetyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (66,5 mg, 48%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,85 (3H, t,  $J=7,4$  Hz), 1,65-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,07-2,19 (4H, m), 2,30 (2H, t,  $J=7,2$  Hz), 2,33-2,36 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,76 (1H, dd,  $J=13,7, 9,8$  Hz), 2,96-3,18 (9H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,53-3,76 (10H, m), 4,43 (1H, td,  $J=8,6, 4,7$  Hz), 5,14 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,23 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,38 (1H, d,  $J=17,2$  Hz), 5,42 (1H, d,  $J=17,2$  Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (2H, s), 7,12-7,17 (1H, m), 7,18-7,25 (4H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t,  $J=5,5$  Hz), 7,78 (1H, d,  $J=11,3$  Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,11 (1H, d,  $J=7,8$  Hz), 8,16 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,23 (1H, t,  $J=5,9$  Hz), 8,44 (1H, d,  $J=9,0$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 1149 ( $M+H$ ) $^+$

#### Quy trình 2: Thẻ liên hợp kháng thể-được chất (6)

Khử kháng thể: trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (1,25 mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,019 mL; 2,3 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,0625 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung DMSO (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,109 mL) và dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất của quy trình 1 (0,039 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, nó được khuấy bằng cách sử dụng máy quay ống để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,008 mL) chứa NAC 100mM được bổ sung vào đó và được khuấy nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm.

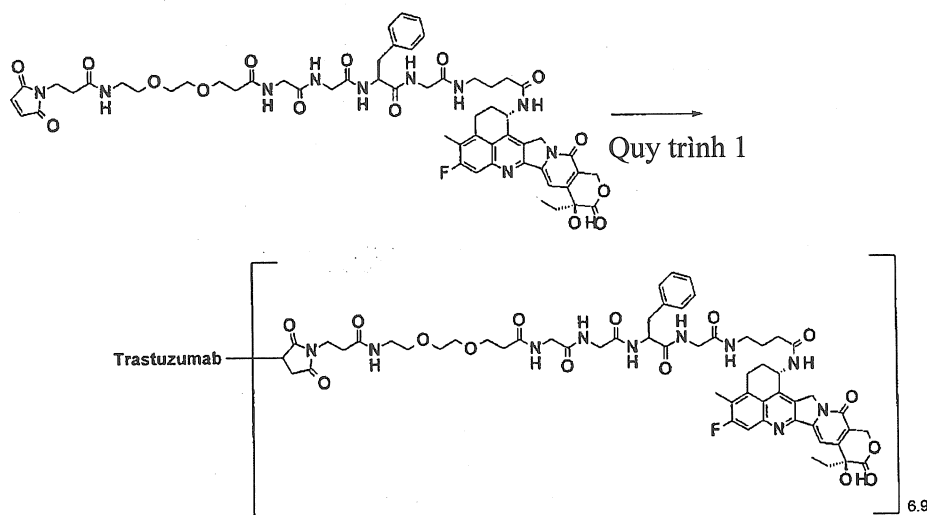
Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc

trung sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,76 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,6 mg (85%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 3,6.

Ví dụ 7. Thể liên hợp kháng thể-được chất (7)

(Công thức 33)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (7)

Khử kháng thể: trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (1,25 mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,039 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,0625 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung DMSO (0,072 mL) và dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất của quy trình 1 từ ví dụ 6 (0,078 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, nó được khuấy bằng cách sử dụng máy quay ống để cho thành phần liên



kết được chất liên hợp với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0155 mL) NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

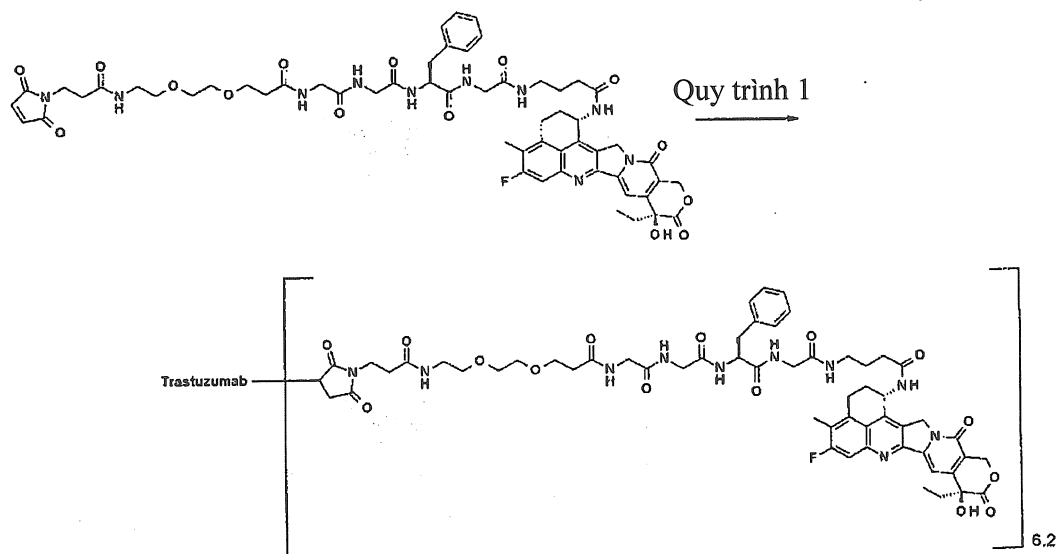
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 6 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,93 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 11,6 mg (93%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 6,9.

Ví dụ 8. Thử liên hợp kháng thể-được chất (8)

(Công thức 34)



Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-được chất (8)

Khử kháng thể: trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (1,25 mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM

(0,039 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,0625 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH = 7,4  $\pm$  0,1, liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung DMSO (0,072 mL) và DMSO dung dịch chứa 10 mM hợp chất của quy trình 1 từ ví dụ 6 (0,078 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được khuấy bằng cách sử dụng máy quay ống để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0155 mL) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được khuấy nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

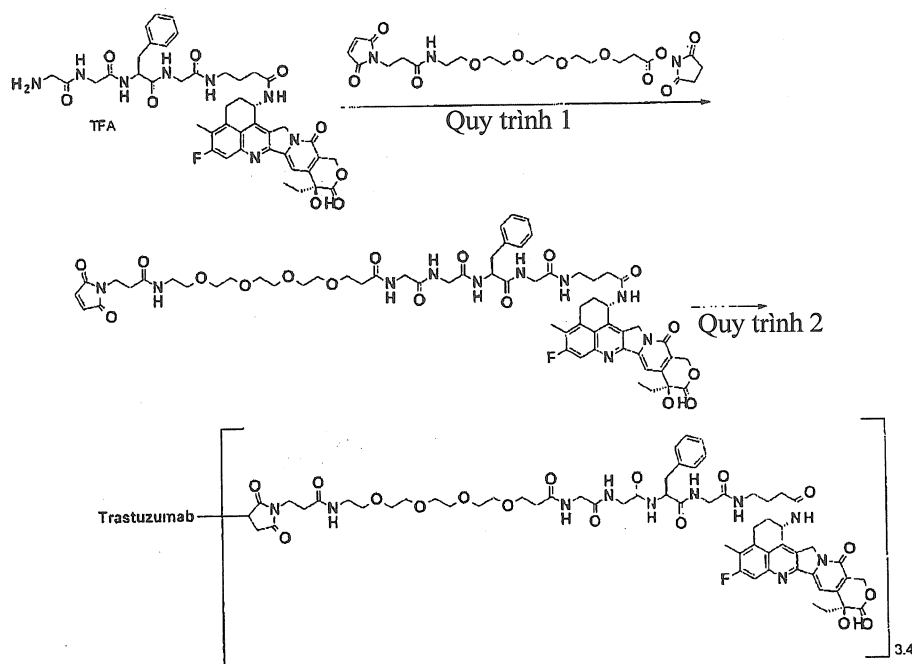
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 5,7 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,50 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,55 mg (86%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 6,2.

Ví dụ 9. Thử liên hợp kháng thể-được chất (9)

(Công thức 35)



Quy trình 1: N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxo-16-azanonadecan-1-oyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino)-4-oxobutyl)glyxinamit

Hợp chất (90 mg, 0,107 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 2 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 bằng cách sử dụng diisopropyletylamin (18,7  $\mu$ L, 0,107 mmol) thay cho trietylamin và N-suxinimetyl 1-maleinimit-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oat (55,1 mg, 0,107 mmol) thay cho N-suxinimetyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (50 mg, 37%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,85 (3H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,64-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,06-2,19 (4H, m), 2,27-2,32 (2H, m), 2,33-2,37 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,72-2,80 (3H, m), 2,96-3,19 (6H, m), 3,39-3,48 (10H, m), 3,52-3,75 (10H, m), 4,39-4,48 (1H, m), 5,14 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,23 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,38 (1H, d,  $J=17,0$  Hz), 5,42 (1H, d,  $J=17,0$  Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (1H, s), 7,13-7,24 (5H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t,  $J=5,5$  Hz), 7,78 (1H, d,  $J=10,9$  Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,10 (1H, d,  $J=7,8$  Hz), 8,16 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,23 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,44 (1H, d,  $J=8,6$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 1237 (M+H)<sup>+</sup>

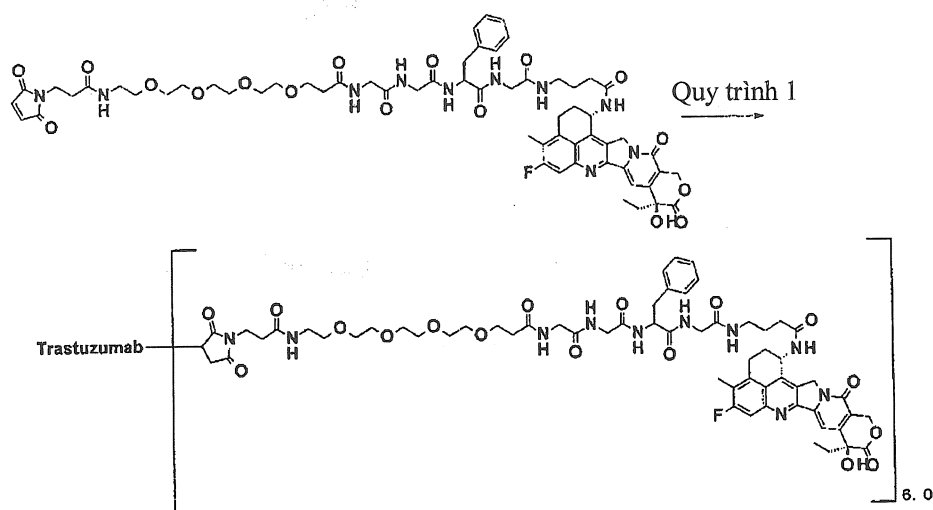
Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-độc chất (9)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1, thể liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6.

Nồng độ kháng thể: 1,75 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,5 mg (84%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 10 Thể liên hợp kháng thể-độc chất (10)

(Công thức 36)



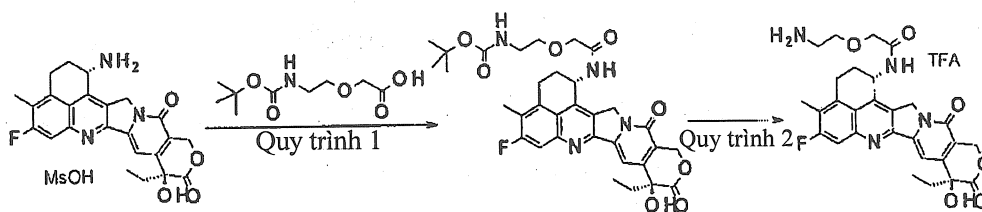
Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-độc chất (10)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 của ví dụ 9, thể liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,79 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,7 mg (85%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 6,0.

Ví dụ 11. Hợp chất trung gian (11)

(Công thức 37)



Quy trình 1: tert-Butyl [2-(2-[[[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13- dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)etyl]cacbammat

Muối metansulfonic của exatecan (3,10 g, 5,47 mol) được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit {2-[(tert-butoxycacbonyl)amino]etoxy}axetic (J. Med. Chem., 1992, vol. 35, pp. 292; 1,55 g, 6,01 mmol) thay cho axit 4-(tert-butoxycacbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (2,56 g, 73%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d, J=15,1 Hz), 4,05 (1H, d, J=15,1 Hz), 5,14 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,22 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,40 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,44 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t, J=5,4 Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J=9,1 Hz).

MS (APCI) m/z: 637 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 2: 2-(2-Aminoetoxy)-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]axetamit

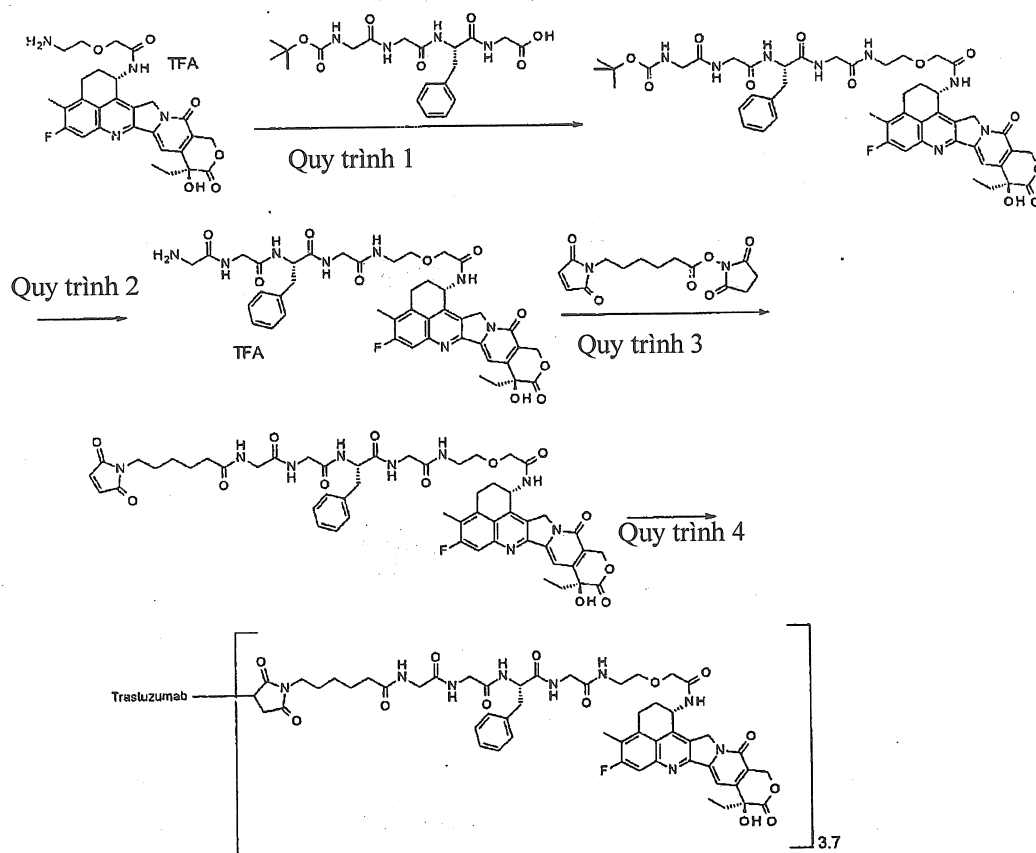
Hợp chất (1,50 g, 2,36 mol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 1 để tạo ra muối axit trifloaxetic của hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (1,50 g, định lượng).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,5 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,15-2,23 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,05 (2H, t, J=5,1 Hz), 3,15-3,23 (2H, m), 3,71 (2H, t, J=5,1 Hz), 4,10 (2H, s), 5,19 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,43 (2H, s), 5,58-5,66 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,73-7,84 (4H, m), 8,55 (1H, d, J=9,1 Hz).

MS (APCI) m/z: 537 (M+H)<sup>+</sup>

Ví dụ 12. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (12)

(Công thức 38)



Quy trình 1: N-(tert-Butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoethoxy)ethyl]glyxinamit

Hợp chất (554 mg, 0,85 mmol) của quy trình 2 của ví dụ 11 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (775 mg, 95%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,85 (3H, t,  $J=7,3$  Hz), 1,36 (9H, s), 1,78-1,89 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd,  $J=13,4, 9,8$  Hz), 2,95 (1H, dd,  $J=13,4, 4,3$  Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,23-3,32 (2H, m), 3,40-3,62 (8H, m), 3,73 (1H, dd,  $J=16,5, 5,5$  Hz), 4,03 (2H, s), 4,39-4,47 (1H, m), 5,17 (1H, d,  $J=18,9$  Hz), 5,25 (1H, d,  $J=18,9$  Hz), 5,41 (1H, d,  $J=16,8$  Hz), 5,45 (1H, d,  $J=16,8$  Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,54 (1H, s), 6,99 (1H, t,  $J=5,8$  Hz), 7,13-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,76-7,82

(2H, m), 7,90 (1H, t, J=5,2 Hz), 8,13 (1H, d, J=7,9 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,8 Hz), 8,49 (1H, d, J=8,5 Hz).

MS (APCI) m/z: 955 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 2: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano([3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoethoxy)ethyl]glyxinamit

Hợp chất (630 mg, 0,659 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 2 để tạo ra muối axit trifloaxetic của hợp chất nêu trong tiêu đề (588 mg, 92%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J=13,4, 10,1 Hz), 2,99 (1H, dd, J=13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,24-3,32 (3H, m), 3,41-3,71 (7H, m), 3,86 (1H, dd, J=16,8, 5,8 Hz), 4,04 (2H, s), 4,52 (1H, td, J=9,0, 4,1 Hz), 5,17 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J=16,5 Hz), 5,45 (1H, d, J=16,5 Hz), 5,56-5,65 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,13-7,26 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,87-8,01 (4H, m), 8,29-8,36 (2H, m), 8,46-8,55 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 855 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(2-(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano([3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoethoxy)ethyl]glyxinamit

Hợp chất (240 mg, 0,247 mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (162 mg, 62%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J=7,6 Hz), 1,13-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,78-1,90 (2H, m), 2,09 (2H, t, J=7,6 Hz), 2,14-2,21 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,74 (1H, dd, J=13,6, 9,7 Hz), 2,96 (1H, dd, J=13,6, 4,5 Hz), 3,08-3,24 (1H, m), 3,24-3,30 (1H, m), 3,33-3,40 (4H, m), 3,47-3,68 (7H, m), 3,72 (1H, dd, J=16,6, 5,7 Hz), 4,03 (2H, s), 4,42 (1H, td, J=8,6, 4,2 Hz), 5,17 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,25 (1H, d,

$J=18,7$  Hz), 5,40 (1H, d,  $J=17,2$  Hz), 5,44 (1H, d,  $J=17,2$  Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,25 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,81 (2H, m), 7,99 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,03-8,11 (2H, m), 8,22 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,47 (1H, d,  $J=9,1$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 1048 (M+H)<sup>+</sup>

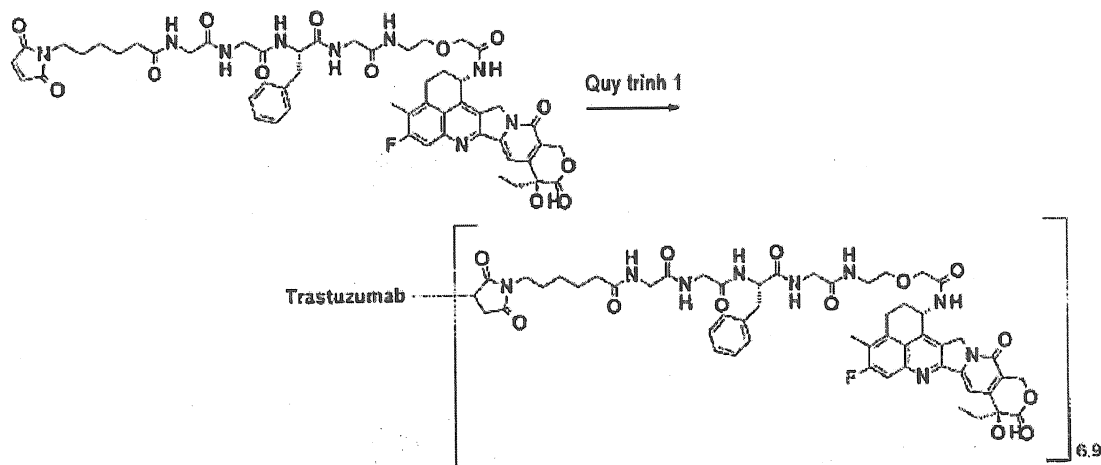
#### Quy trình 4: Thể liên hợp kháng thể-độc chất (12)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 3, thể liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6. Dung dịch được cô thêm bằng quy trình chung A. Sau đó, bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 10,77 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,5 mg (60%), và số phân tử độc chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

#### Ví dụ 13. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (13)

(Công thức 39)



#### Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-độc chất (13)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 3 của ví dụ 12, thể liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7. Dung dịch được cô thêm bằng quy trình chung A. Sau đó, bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

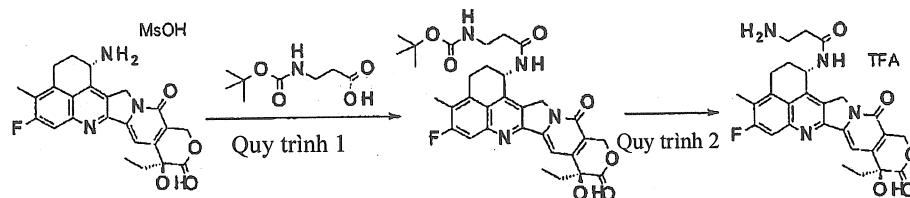
Nồng độ kháng thể: 10,69 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,5 mg (60%), và số phân tử



được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 6,9.

Ví dụ 14. Hợp chất trung gian (14)

(Công thức 40)



Quy trình 1: tert-Butyl (3-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-3-oxopropyl)cacbamam

Muối axit metansulfonic của exatecan (500 mg, 0,941 mmol) được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 1 bằng cách sử dụng N-(tert-butoxycarbonyl)-β-alanin thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nâu (616 mg, định lượng).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,29 (9H, s), 1,86 (2H, dt, J=15,1, 7,3 Hz), 2,04-2,22 (2H, m), 2,31 (2H, t, J=6,8 Hz), 2,40 (3H, s), 3,10-3,26 (4H, m), 5,15 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,26 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,42 (2H, dd, J=18,8, 16,4 Hz), 5,57 (1H, dt, J=8,5, 4,2 Hz), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,30 (1H, s), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,46 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 607 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 2: N-[(1S,9S)-9-Etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

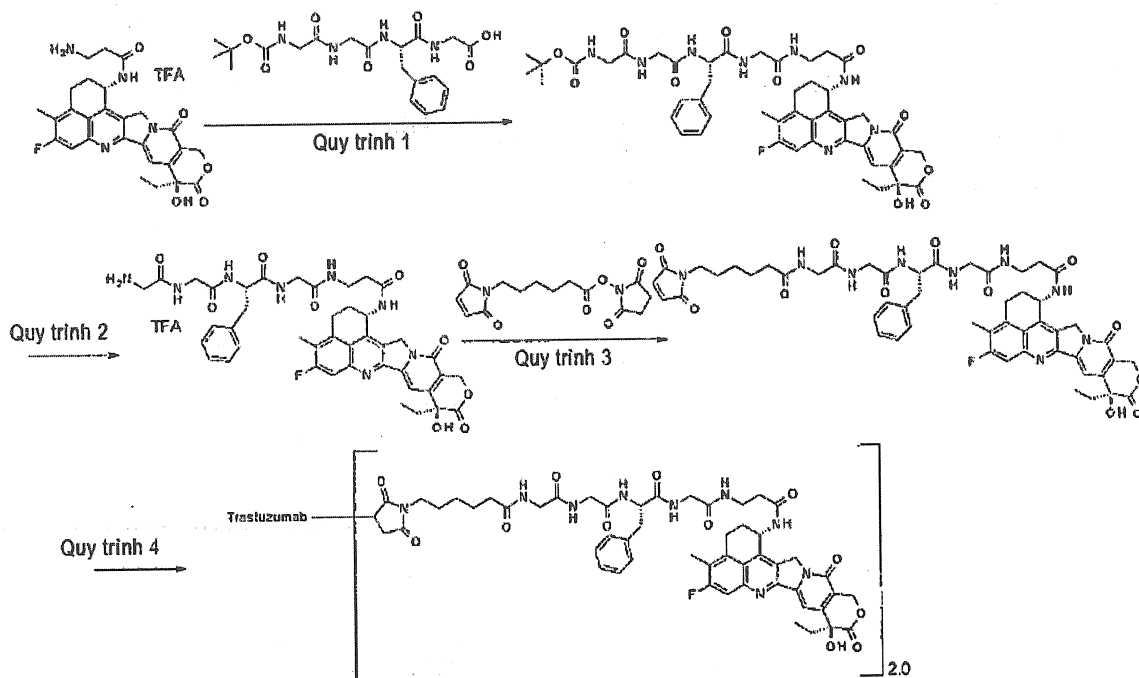
Hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 1 để tạo ra muối axit trifloaxetic của hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng (499 mg, 86%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,86 (2H, dquin, J=14,6, 7,2, 7,2, 7,2, 7,2 Hz), 2,06-2,27 (1H, m), 2,41 (3H, s), 2,46-2,57 (2H, m), 3,08 (2H, t, J=6,8 Hz), 3,14-3,24 (2H, m), 5,22 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,29 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,58 (1H, dt, J=8,5, 4,5 Hz), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,74 (3H, brs), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,67 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI)  $m/z$ : 507 (M+H)<sup>+</sup>

Ví dụ 15. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (15)

(Công thức 41)



Quy trình 1: N-(tert-Butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-glyxyl-N- [(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

Hợp chất (484 mg, 0,780 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 14 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (626 mg, 87%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,27-1,42 (9H, m), 1,77-1,93 (2H, m), 2,06-2,22 (2H, m), 2,36 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3H, d, J=1,6 Hz), 2,44-2,54 (2H, m), 2,76 (1H, dd, J=14,5, 10,2 Hz), 3,02 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,12-3,22 (2H, m), 3,52 (6H, d, J=6,3 Hz), 4,42-4,54 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,4 Hz), 5,42 (1H, dd, J=18,4, 16,4 Hz), 5,57 (1H, dt, J=8,7, 4,4 Hz), 6,53 (1H, s), 6,98 (1H, t, J=5,9 Hz), 7,14-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,77-7,84 (1H, m), 7,91 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,16 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,1 Hz), 8,52 (1H, d, J=9,0 Hz).

Quy trình 2: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-glyxyl-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-

benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit trifloaxetat

Hợp chất (624 mg, 0,675 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng (626 mg, 92%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,86 (2H, tt, J=14,5, 7,2 Hz), 2,07-2,22 (2H, m), 2,36 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3H, s), 2,44-2,54 (2H, m), 2,75 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,04 (1H, dd, J=13,7, 4,3 Hz), 3,12-3,22 (2H, m), 3,58 (2H, d, J=4,7 Hz), 3,69 (3H, td, J=11,2, 5,7 Hz), 3,87 (1H, dd, J=17,0, 5,7 Hz), 4,54 (1H, m, J=17,8, 4,5 Hz), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,51-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,14-7,29 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,81 (1H, d, J=10,9 Hz), 7,88 (1H, t, J=5,7 Hz), 7,97 (3H, brs), 8,29-8,38 (2H, m), 8,50 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,55 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 825 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-glyxyl-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

Hợp chất (60,0 mg, 0,0646 mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn (14,0 mg, 21%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,39-1,51 (4H, m), 1,79-1,91 (2H, m), 2,02-2,20 (2H, m), 2,07 (2H, t, J=7,4 Hz), 2,30-2,42 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J=14,1, 9,4 Hz), 3,02 (1H, dd, J=14,7, 4,9 Hz), 3,12-3,21 (2H, m), 3,26-3,42 (2H, m), 3,50-3,80 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,6 Hz), 5,26 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,51-5,62 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,84 (2H, m), 8,01 (1H, t, J=5,3 Hz), 8,06 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,14 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,25 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,53 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 1018 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 4: Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất (15)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình

chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,37 \text{ mLmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (1,0 mL) được gom vào ống 2 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,0155 mL; 2,3 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,050 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi ủ dung dịch ở  $22^\circ\text{C}$  trong 10 phút, dung dịch DMSO (0,0311 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa 10 mM hợp chất thu được trong quy trình 3 được bổ sung vào đó và được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở  $22^\circ\text{C}$  trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,00622 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM được bổ sung vào đó và được ủ ở  $22^\circ\text{C}$  để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

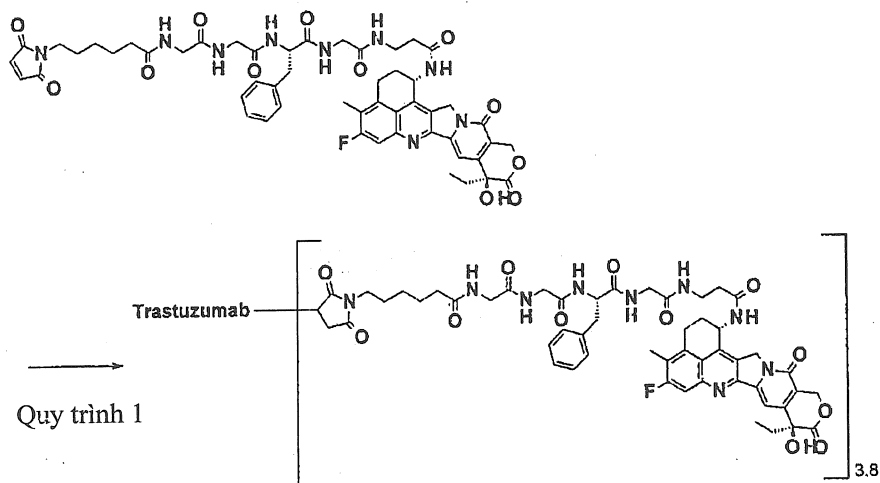
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (PBS6.0 được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 6 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,18 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,08 mg (71%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 2,0.

Ví dụ 16. Thể liên hợp kháng thể-được chất (16)

(Công thức 42)



### Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (16)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm, 1,37 mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> được sử dụng). Dung dịch (1,0 mL) được gom vào ống 2 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,0311 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,050 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH = 7,4 ± 0,1, liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi ủ dung dịch ở 22°C trong 10 phút, dung dịch DMSO (0,0622 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của ví dụ 15 được bổ sung vào đó và được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0124 mL; 18,4 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM được bổ sung vào đó và được ủ ở 22°C để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

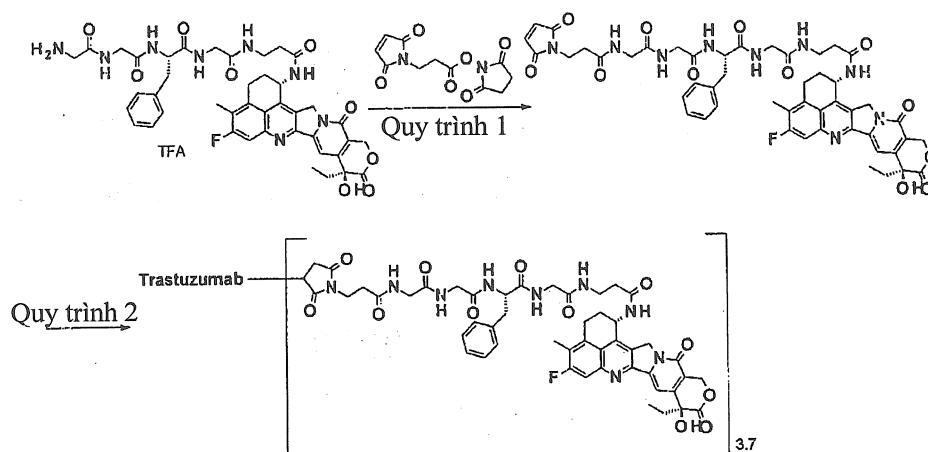
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (PBS6.0 được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 6 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,03 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 6,18 mg (62%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 3,8.

### Ví dụ 17. Thể liên hợp kháng thể-được chất (17)

(Công thức 43)



Quy trình 1: N-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)propanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanylglyxyl-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9'-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizinc[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

Hợp chất (60,0 mg, 0,0646 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 15 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-suxinimetyl 3-maleimetyl propionat thay cho N-suxinimetyl 6-maleimetyl hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (36,0 mg, 57%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,85 (2H, dt, J=14,4, 7,5 Hz), 2,05-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,30-2,44 (5H, m), 2,73-2,84 (1H, m), 3,02 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,17 (3H, d, J=5,1 Hz), 3,26-3,40 (2H, m), 3,41-3,81 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,52-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,80 (2H, d, J=10,2 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,12 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,20-8,31 (2H, m), 8,52 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 976 (M+H)<sup>+</sup>

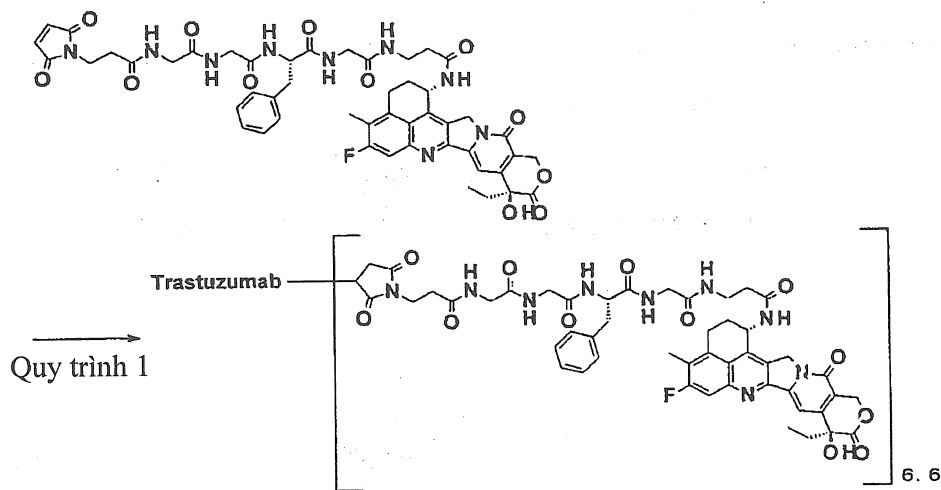
Quy trình 2: Thử liên hợp kháng thể-dược chất (17)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên, thử liên hợp kháng thể-dược chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6.

Nồng độ kháng thể: 1,74 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,4 mg (33%), và số phân tử dược chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

Ví dụ 18. Thể liên hợp kháng thể-dược chất (18)

(Công thức 44)



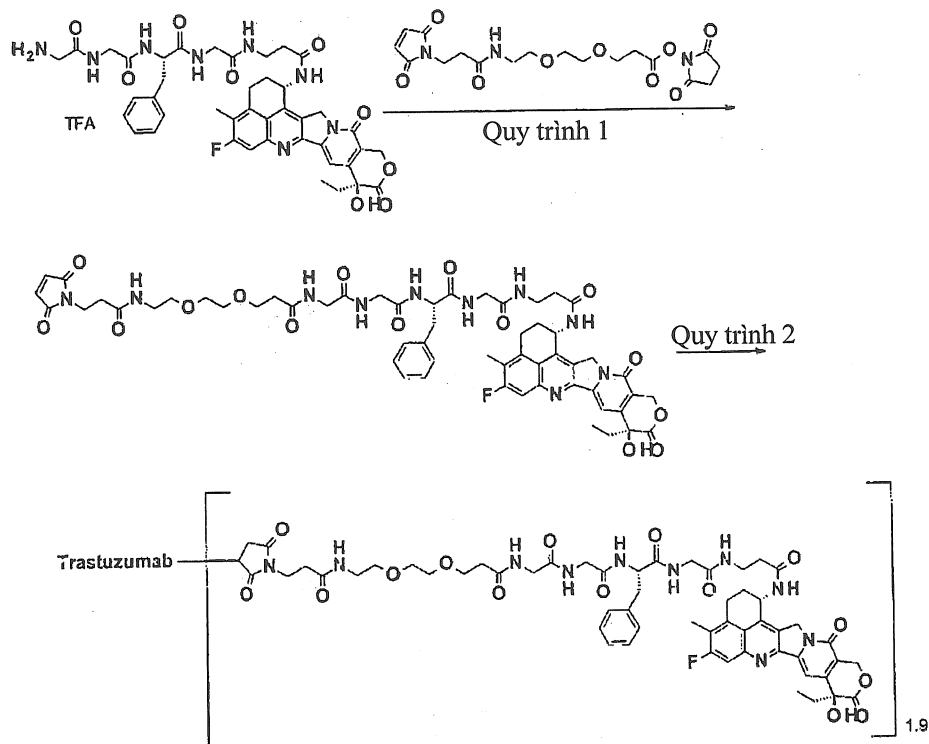
Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-dược chất (18)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 của ví dụ 17, thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,98 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 11,9 mg (95%), và số phân tử dược chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 6,6.

Ví dụ 19. Thể liên hợp kháng thể-dược chất (19)

(Công thức 45)



Quy trình 1: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)propanoyl]amino})ethoxy]propanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl]glyxyl-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

Hợp chất (60,0 mg, 0,0646 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 15 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-suxinimetyl 3-(2-(2-(3-maleinimitpropanamit)ethoxy)ethoxy)propanoat thay cho N-suxinimetyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn (23,0 mg, 31%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,86 (3H, t,  $J=7,4$  Hz), 1,77-1,92 (2H, m), 2,07-2,21 (2H, m), 2,27-2,42 (6H, m), 2,40 (3H, s), 2,74-2,84 (1H, m), 2,97-3,06 (1H, m), 3,09-3,21 (4H, m), 3,25-3,39 (6H, m), 3,45 (4H, s), 3,50-3,80 (8H, m), 4,41-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d,  $J=18,4$  Hz), 5,26 (1H, m,  $J=18,4$  Hz), 5,42 (2H, brs), 5,51-5,61 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,87 (2H, m), 7,93-8,07 (2H, m), 8,09-8,21 (2H, m), 8,26 (1H, brs), 8,54 (1H, d,  $J=8,6$  Hz).

MS (ESI)  $m/z$ : 1135 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$



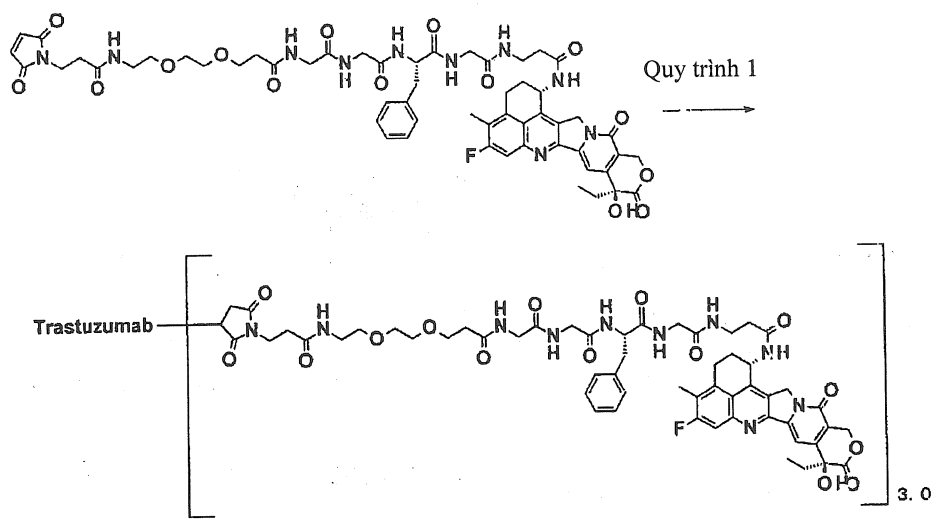
### Quy trình 2: Thở liên hợp kháng thể-được chất (19)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên, thở liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6.

Nồng độ kháng thể: 1,60 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,6 mg (77%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 1,9.

### Ví dụ 20. Thở liên hợp kháng thể-được chất (20)

(Công thức 46)



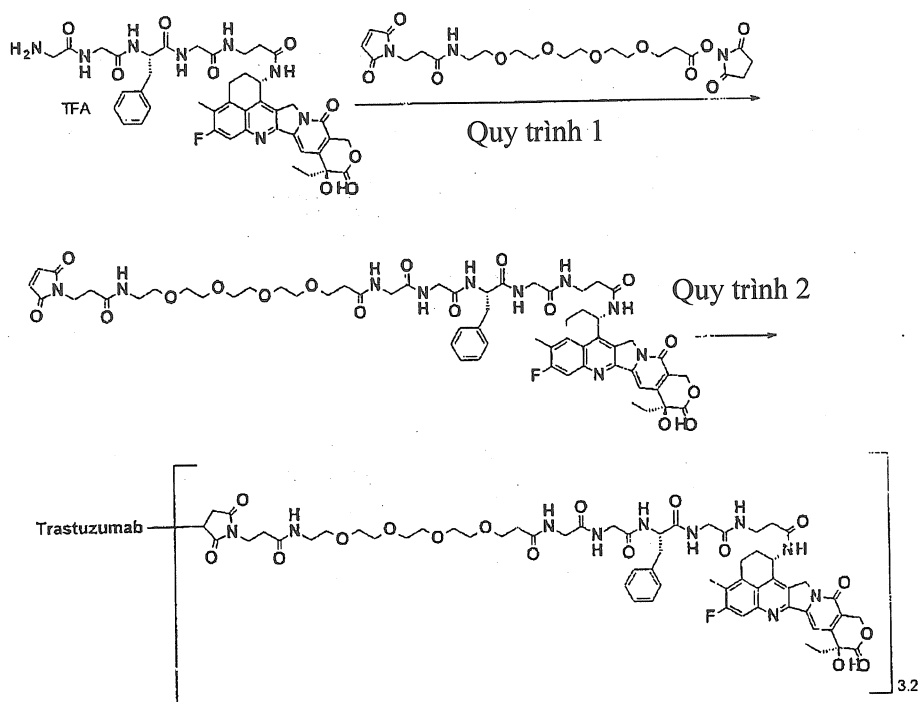
### Quy trình 1: Thở liên hợp kháng thể-được chất (20)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 của ví dụ 19, thở liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,69 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,1 mg (81%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 3,0.

### Ví dụ 21. Thở liên hợp kháng thể-được chất (21)

(Công thức 47)



Quy trình 1: N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanylglyxyl-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

Hợp chất (60,0 mg, 0,0646 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 15 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-suxinimetyl 1-maleinimit-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecanoat thay cho N-suxinimetyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn (23,0 mg, 29%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J=7,0 Hz), 1,85 (2H, tt, J=14,6, 7,1 Hz), 2,06-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,28-2,43 (6H, m), 2,78 (1H, dd, J=13,7, 9,4 Hz), 3,02 (1H, dd, J=14,1, 3,9 Hz), 3,09-3,22 (4H, m), 3,27-3,41 (4H, m), 3,47 (12H, d, J=8,6 Hz), 3,53-3,81 (10H, m), 4,41-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,53-5,61 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,12-7,29 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,85 (2H, m), 8,03 (2H, d, J=6,6 Hz), 8,11-8,21 (2H, m), 8,27 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,54 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 1224 (M+H)<sup>+</sup>

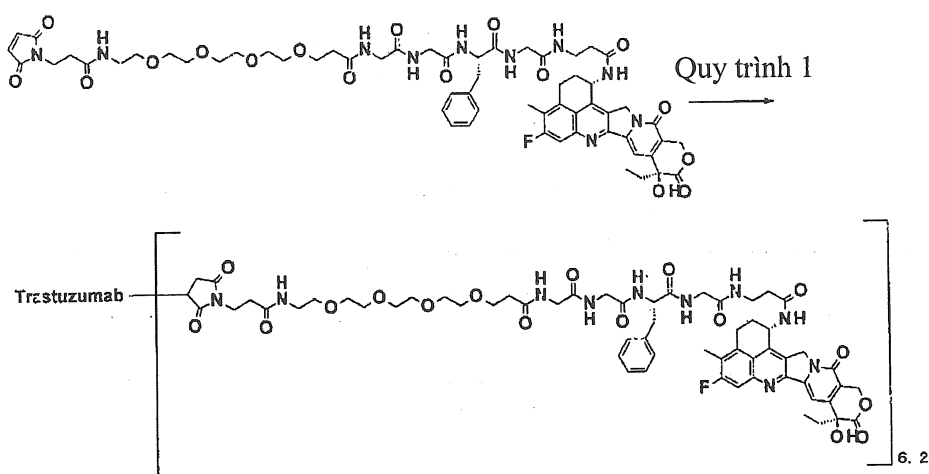
### Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-độc chất (21)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1, thể liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6.

Nồng độ kháng thể: 1,77 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,6 mg (85%), và số phân tử độc chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 3,2.

### Ví dụ 22. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (22)

(Công thức 48)



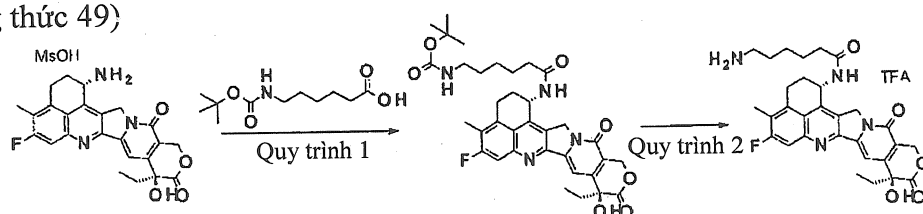
### Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-độc chất (22)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 của ví dụ 21, thể liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,89 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 11,3 mg (90%), và số phân tử độc chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 6,2.

### Ví dụ 23 Hợp chất trung gian (23)

(Công thức 49)



Quy trình 1: tert-Butyl (6-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-6-oxohexyl)cacbamate

Muối axit metansulfonic của exatecan (0,500 g, 0,882 mmol) được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 6-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoic thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,620 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,83 (3H, t,  $J=7,8$  Hz), 1,14-1,28 (2H, m), 1,31 (9H, s), 1,47-1,61 (2H, m), 1,75-1,89 (2H, m), 2,04-2,17 (4H, m), 2,35 (3H, s), 2,81-2,88 (2H, m), 3,09-3,16 (2H, m), 5,10 (1H, d,  $J=19,4$  Hz), 5,16 (1H, d,  $J=19,4$  Hz), 5,39 (2H, s), 5,48-5,55 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,73-6,78 (1H, m), 7,26 (1H, s), 7,74 (1H, d,  $J=10,9$  Hz), 8,39 (1H, d,  $J=9,0$  Hz).

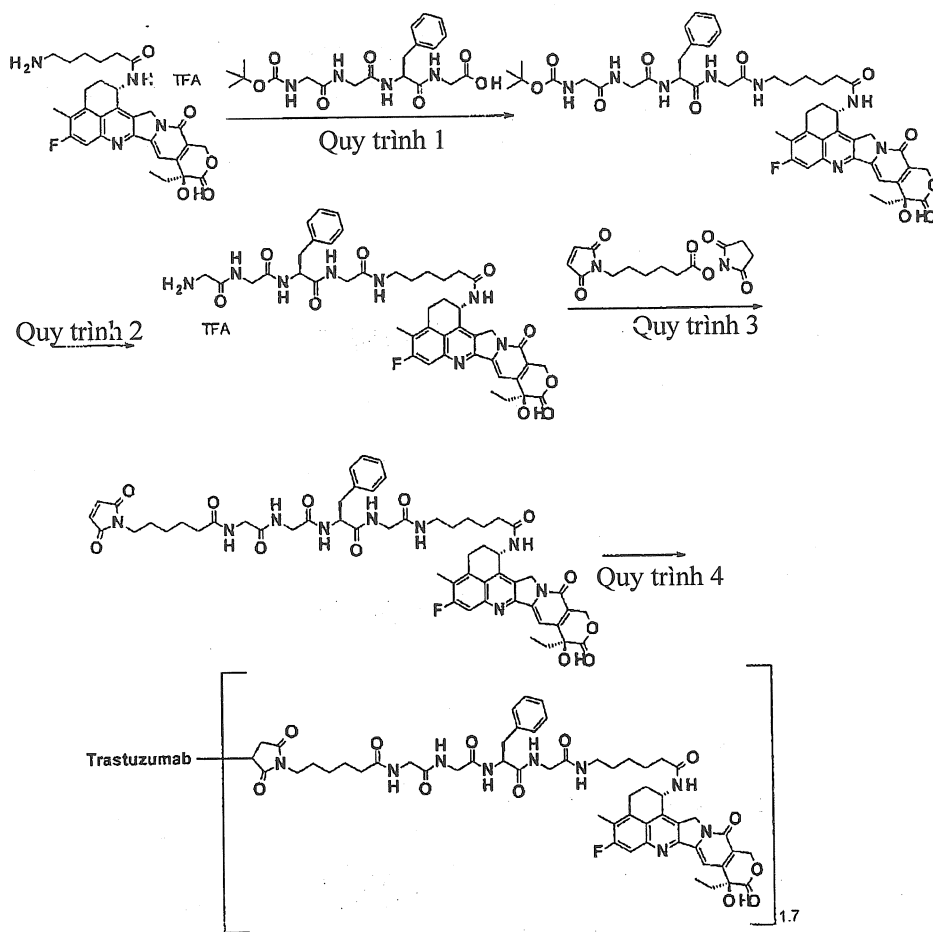
Quy trình 2: 6-Amino-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]hexanamide

Hợp chất (0,397 g, 0,611 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 1 để tạo ra muối axit trifloaxetic của hợp chất nêu trong tiêu đề (0,342 g, 84%).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,88 (3H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,31-1,41 (2H, m), 1,52-1,70 (4H, m), 1,80-1,94 (2H, m), 2,05-2,18 (2H, m), 2,21 (2H, t,  $J=7,4$  Hz), 2,40 (3H, s), 2,81 (2H, t,  $J=7,4$  Hz), 3,10-3,25 (2H, m), 3,33 (2H, brs), 5,18 (1H, d,  $J=19,8$  Hz), 5,22 (1H, d,  $J=19,8$  Hz), 5,41 (2H, d,  $J=16,6$  Hz), 5,45 (2H, d,  $J=16,6$  Hz), 5,53-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d,  $J=10,9$  Hz), 8,49 (1H, d,  $J=9,2$  Hz).

Ví dụ 24. Thử nghiệm liên hợp kháng thể-dược chất (24)

(Công thức 50)



Quy trình 1: N-(tert-Butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(6-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-6-oxohexyl)glyxinamit

Hợp chất (0,170 g, 0,516 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 23 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,225 g, 91%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,88 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,43-1,70 (6H, m), 1,87 (2H, td, J=15,0, 7,4 Hz), 2,10-2,22 (3H, m), 2,28-2,37 (1H, m), 2,42 (3H, s), 2,78-2,85 (1H, m), 3,01-3,10 (3H, m), 3,15-3,22 (2H, m), 3,54-3,61 (5H, m), 3,62-3,69 (1H, m), 4,44-4,53 (1H, m), 5,17 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,45 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,02 (1H, t, J=6,1 Hz), 7,11-7,28 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,63-7,69 (1H, m), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,90-7,96 (1H, m), 8,17 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,28

(1H, t, J=5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J=9,0 Hz).

Quy trình 2: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(6-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-6-oxohexyl)glyxinamit

Hợp chất (0,105 g, 0,108 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,068 mg, 65%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,89 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,15-1,67 (6H, m), 1,79-1,97 (2H, m), 2,08-2,24 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,76-2,82 (1H, m), 3,00-3,10 (5H, m), 3,19 (1H, s), 3,50-3,63 (2H, m), 3,64-3,76 (3H, m), 3,84-3,92 (1H, m), 4,51-4,59 (1H, m), 5,17 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,24 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,44 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, brs), 7,15-7,29 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,72-7,78 (1H, m), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,96-8,08 (2H, m), 8,30-8,38 (2H, m), 8,46-8,56 (2H, m).

Quy trình 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(6-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-6-oxohexyl)glyxinamit

Hợp chất (58 mg, 0,060 mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (39 mg, 62%).

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 0,99 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,27 (2H, td, J=11,6, 6,1 Hz), 1,38-1,44 (2H, m), 1,50-1,63 (6H, m), 1,65-1,80 (2H, m), 1,89-1,98 (2H, m), 2,17-2,25 (3H, m), 2,26-2,36 (3H, m), 2,40 (3H, s), 2,95 (1H, dd, J=14,3, 9,2 Hz), 3,12 (1H, dd, J=13,7, 5,7 Hz), 3,15-3,25 (4H, m), 3,44 (2H, t, J=7,2 Hz), 3,65 (1H, d, J=17,2 Hz), 3,76 (1H, d, J=17,2 Hz), 3,79-3,86 (4H, m), 4,43 (1H, dd, J=8,9, 6,0 Hz), 5,10 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,35 (1H, d, J=16,6 Hz), 5,56 (1H, d, J=16,0 Hz), 5,60-5,64 (1H, m), 6,76 (2H, s), 7,12-7,24 (6H, m), 7,58 (1H, s), 7,60 (1H, d, J=10,9 Hz), 7,68 (1H, t, J=5,7 Hz).

MS (ESI) m/z: 1060 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 4: Thử liên hợp kháng thể-được chất (24)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,37 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (9,0 mL) được gom vào ống 50 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,140 mL; 2,3 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,450 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi ủ dung dịch ở  $22^\circ\text{C}$  trong 10 phút, dung dịch DMSO (0,280 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa 10 mM hợp chất ở quy trình 3 được bổ sung vào đó và được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở  $22^\circ\text{C}$  trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0559 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được ủ ở  $22^\circ\text{C}$  để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

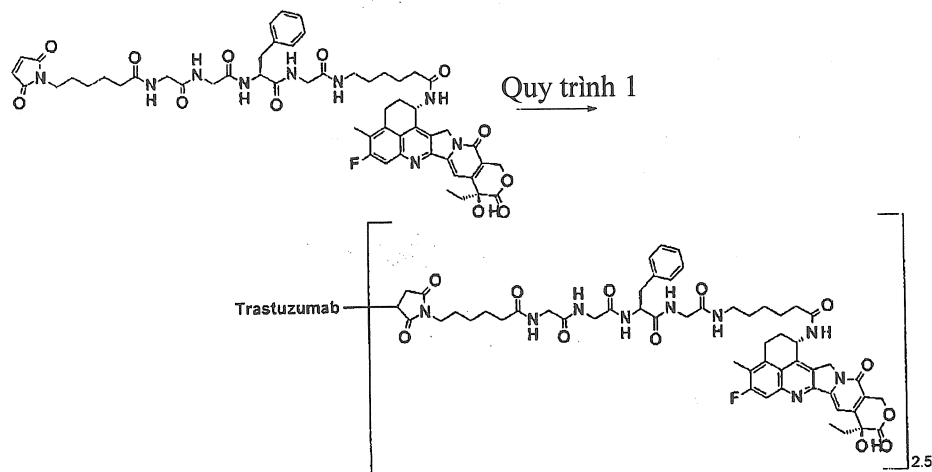
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (PBS7.4 được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 3,30 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 53,5 mg (59%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 1,7.

Ví dụ 25. Thể liên hợp kháng thể-được chất (25)

(Công thức 51)



#### Quy trình 1: Thẻ liên hợp kháng thể-được chất (25)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm, 1,37 mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> được sử dụng). Dung dịch (9,0 mL) được gom vào ống 50 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,280 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1 M (0,450 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH = 7,4 ± 0,1, liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi ủ dung dịch ở 22°C trong 10 phút, dung dịch DMSO (0,559 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa 10 mM hợp chất trong quy trình 3 của ví dụ 24 được bổ sung vào đó và được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,112 mL; 18,4 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được ủ ở 22°C để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (PBS6.0 được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra dung dịch chứa thẻ liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

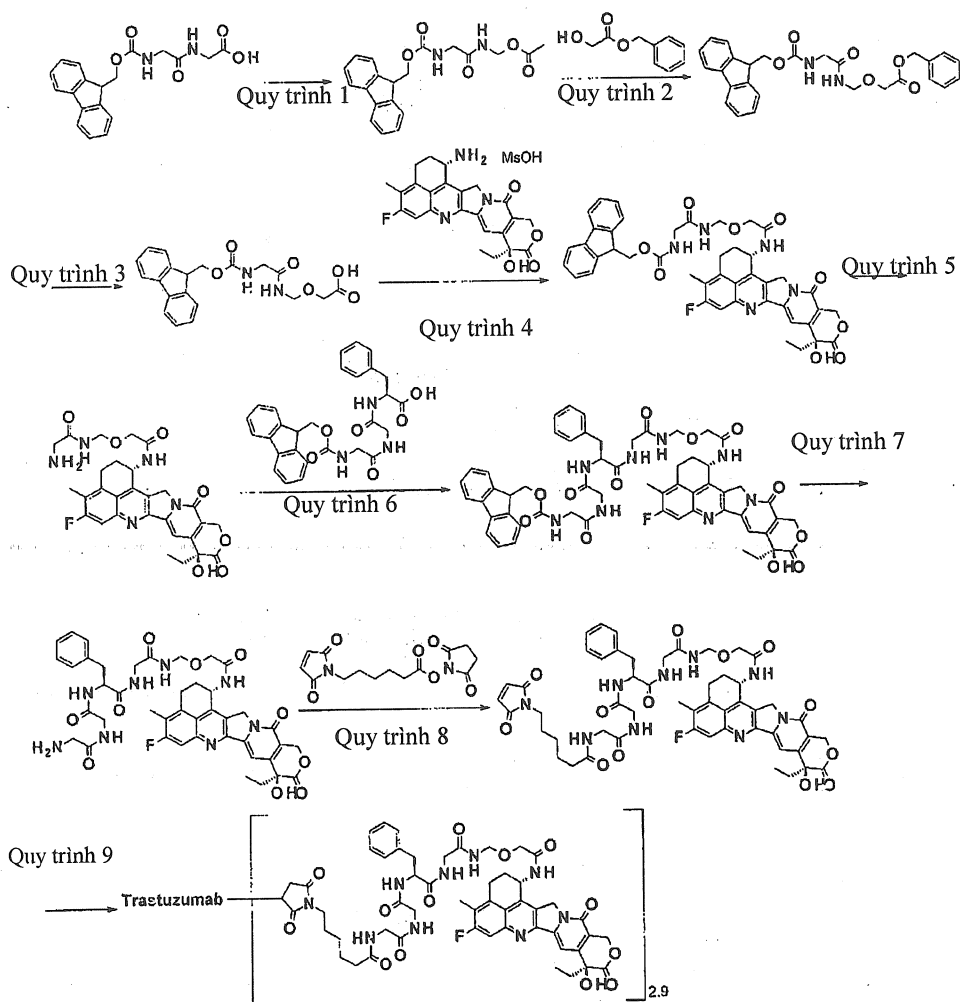
Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.



Nồng độ kháng thể: 10,65 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 55,1 mg (61%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 2,5.

Ví dụ 26. Thê liên hợp kháng thể-được chất (26)

(Công thức 52)



Quy trình 1: ((N-[(9H-Floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxyl}amino)metyl axetat.

Bổ sung pyridin (1,16 ml, 14,7 mmol) và chì tetraaxetat (6,84 g, 14,7 mmol) vào hỗn hợp chứa N-9-florenylmetoxycacbonylglyxylglyxin (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahydrofuran (THF; 120 ml) và toluen (40,0 ml) và gia nhiệt hồi lưu trong 5 giờ. Sau khi dung dịch phản ứng được làm mát xuống nhiệt độ trong phòng, chất không tan được loại bỏ bằng cách lọc qua xe-lit, và được cô dưới áp suất giảm. Cặn thu được được hòa tan trong etyl axetat và rửa bằng nước và nước muối bão hòa, và sau đó lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan. Sau khi dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (hexan : etyl axetat =

9 : 1 (thể tích/thể tích) - etyl axetat) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (3,00 g, 67%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,07 (3H, s), 3,90 (2H, d,  $J=5,1$  Hz), 4,23 (1H, t,  $J=7,0$  Hz), 4,46 (2H, d,  $J=6,6$  Hz), 5,26 (2H, d,  $J=7,0$  Hz), 5,32 (1H, brs), 6,96 (1H, brs), 7,32 (2H, t,  $J=7,3$  Hz), 7,41 (2H, t,  $J=7,3$  Hz), 7,59 (2H, d,  $J=7,3$  Hz), 7,77 (2H, d,  $J=7,3$  Hz).

Quy trình 2: Benzyl [(N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxyl}amino)metoxy]axetat

Bổ sung kali tert-butoxit (2,24 g, 20,0 mmol) vào dung dịch THF (40,0 mL) chứa hợp chất (3,68 g, 10,0 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên và benzyl glycolat (4,99 g, 30,0 mmol) ở  $0^\circ\text{C}$  và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Dung dịch phản ứng được nạp etyl axetat và nước ở  $0^\circ\text{C}$  và được chiết bằng etyl axetat và cloroform. Lớp hữu cơ thu được được làm khô trên natri sulfat và được lọc. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Cặn thu được được hòa tan trong dioxan (40,0 mL) và nước (10,0 mL), được nạp natri hydro cacbonat (1,01 g, 12,0 mmol) và 9-florenylmetyl cloroformat (2,59 g, 10,0 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp nước và được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ thu được được làm khô trên natri sulfat và được lọc. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (hexan : etyl axetat = 100 : 0 (thể tích/thể tích) - 0 : 100) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất dầu không màu (1,88 g, 40%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,84 (2H, d,  $J=5,5$  Hz), 4,24 (3H, t,  $J=6,5$  Hz), 4,49 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 4,88 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 5,15-5,27 (1H, m), 5,19 (2H, s), 6,74 (1H, brs), 7,31-7,39 (7H, m), 7,43 (2H, t,  $J=7,4$  Hz), 7,61 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 7,79 (2H, d,  $J=7,4$  Hz).

Quy trình 3: axit [(N-[(9H-Floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxyl}amino)metoxy]axetic

Hợp chất (1,83 g, 3,96 mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên được hòa tan trong etanoi (40,0 mL) và etyl axetat (20,0 mL). Sau khi bổ sung chất xúc tác paladi cacbon (376 mg), nó được khuấy trong môi trường hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Chất không tan được loại bỏ bằng cách lọc qua xelit, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu

(1,52 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3,62 (2H, d,  $J=6,3$  Hz), 3,97 (2H, s), 4,18-4,32 (3H, m), 4,60 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 7,29-7,46 (4H, m), 7,58 (1H, t,  $J=5,9$  Hz), 7,72 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 7,90 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 8,71 (1H, t,  $J=6,5$  Hz).

Quy trình 4: 9H-Floren-9-ylmetyl(2- $\{[(2-[(1S,9S)-9\text{-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]$ indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)metyl]amino}-2-oxoetyl)cacbamit

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, bổ sung N,N-diisopropyletylamin (92,9  $\mu\text{L}$ , 0,533 mmol) và N,N'-dixyclohexylcarbodiimide (0,143 g, 0,693 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (10,0 mL) chứa muối axit metansulfonic của exatecan (0,283 g, 0,533 mmol), N-hydroxysuxinimit (61,4 mg, 0,533 mmol), và hợp chất (0,205 g, 0,533 mmol) thu được trong quy trình 3 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ chia phần chứa cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu nâu nhạt (0,352 g, 82%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,81 (3H, t,  $J=7,4$  Hz), 1,73-1,87 (2H, m), 2,06-2,20 (2H, m), 2,34 (3H, s), 3,01-3,23 (2H, m), 3,58 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 3,98 (2H, s), 4,13-4,25 (3H, m), 4,60 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 5,09-5,22 (2H, m), 5,32-5,42 (2H, m), 5,50-5,59 (1H, m), 6,49 (1H, s), 7,24-7,30 (3H, m), 7,36 (2H, t,  $J=7,4$  Hz), 7,53 (1H, t,  $J=6,3$  Hz), 7,65 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 7,75 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 7,84 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 8,47 (1H, d,  $J=8,6$  Hz), 8,77 (1H, t,  $J=6,7$  Hz).

MS (ESI)  $m/z$ : 802 ( $M+H$ ) $^+$

Quy trình 5: N- $\{[(2-[(1S,9S)-9\text{-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':5,7]$ indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Bổ sung piperidin (1,1 mL) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (11,0 mL) chứa hợp chất (0,881 g, 1,10 mmol) thu được trong quy trình 4 ở trên và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra hỗn hợp chứa hợp chất nêu trong tiêu đề. Hỗn hợp được sử dụng cho phản ứng tiếp theo không

cần tinh sạch thêm.

Quy trình 6: N-[(9H-Floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl)amino}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, bổ sung N,N'-dixyclohexylcarbodiimit (0,181 g, 0,878 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (50,0 mL) chứa hỗn hợp (0,439 mmol) thu được trong quy trình 5 ở trên, N-hydroxysuxinimit (0,101 g, 0,878 mmol), và N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin (hợp chất được mô tả trong đơn sáng chế Nhật số 2002-60351; 0,440 g, 0,878 mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu cam nhạt (0,269 g, 58%).

MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)+

Quy trình 7: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Bổ sung piperidin (0,251 mL, 2,53 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (4,00 mL) chứa hợp chất (0,269 g, 0,253 mmol) thu được trong quy trình 6 ở trên và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra hỗn hợp chứa hợp chất nêu trong tiêu đề. Hỗn hợp được sử dụng cho phản ứng tiếp theo không cần tinh sạch thêm.

Quy trình 8: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Bổ sung N-suxinimetyl 6-maleimit hexanoat (0,156 g, 0,506 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (10,0 mL) chứa hợp chất (0,253 mmol) thu được trong quy trình 7 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Dung môi được loại bỏ

dưới áp suất giảm và cần thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,100 g, 38%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,83 (3H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (6H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 7,97 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,03 (1H, t,  $J=5,9$  Hz), 8,09 (1H, d,  $J=7,8$  Hz), 8,27 (1H, t,  $J=6,5$  Hz), 8,48 (1H, d,  $J=9,0$  Hz), 8,60 (1H, t,  $J=6,5$  Hz).

MS (ESI)  $m/z$ : 1034 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

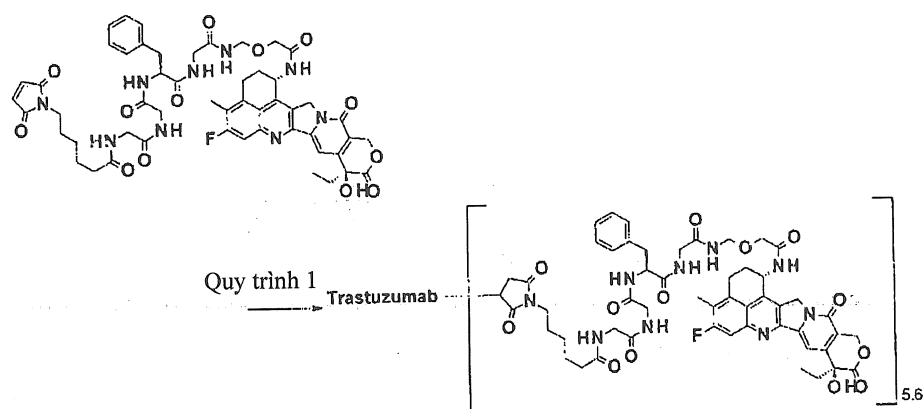
#### Quy trình 9: Thử liên hợp kháng thể-dược chất (26)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 8 ở trên, thử liên hợp kháng thể-dược chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6.

Nồng độ kháng thể: 1,61 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,7 mg (77%), và số phân tử dược chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 2,9.

#### Ví dụ 27. Thử liên hợp kháng thể-dược chất (27)

(Công thức 53)



#### Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-dược chất (27)

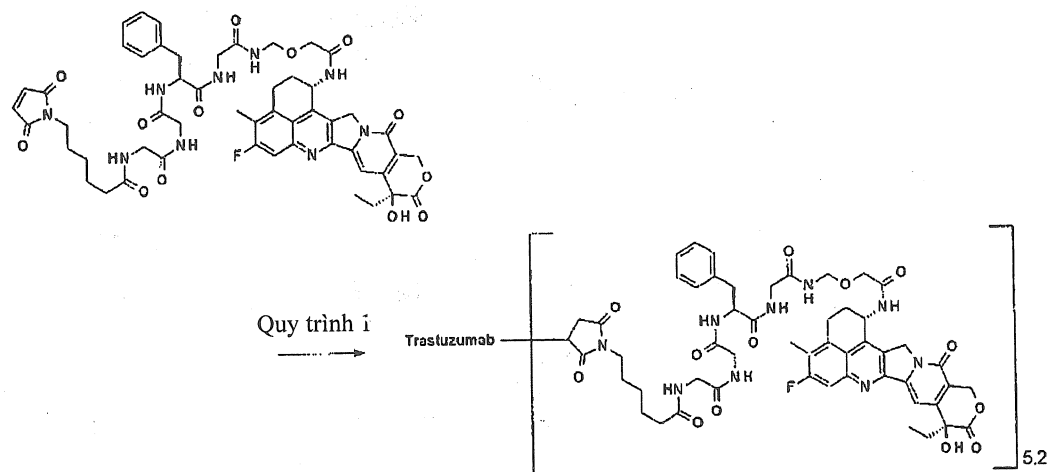
Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong Quy trình 8 của ví dụ 26, thu được thử liên hợp kháng thể- dược chất

nêu trong tiêu đề theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,58 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,5 mg (76%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 5,6.

Ví dụ 28. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (28)

(Công thức 54)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-độc chất (28)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/ELTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (1,25 mL) được đặt trong hai ống polypropylen 1,5 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,039 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydrophosphat 1M (0,0625 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung DMSO (0,072 mL) và dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất ở quy trình 8 của ví dụ 26 (0,078 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được khuấy bằng cách sử dụng máy quay ống để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước chứa NAC 100 mM (0,0155 mL) được bổ sung vào đó và được

khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

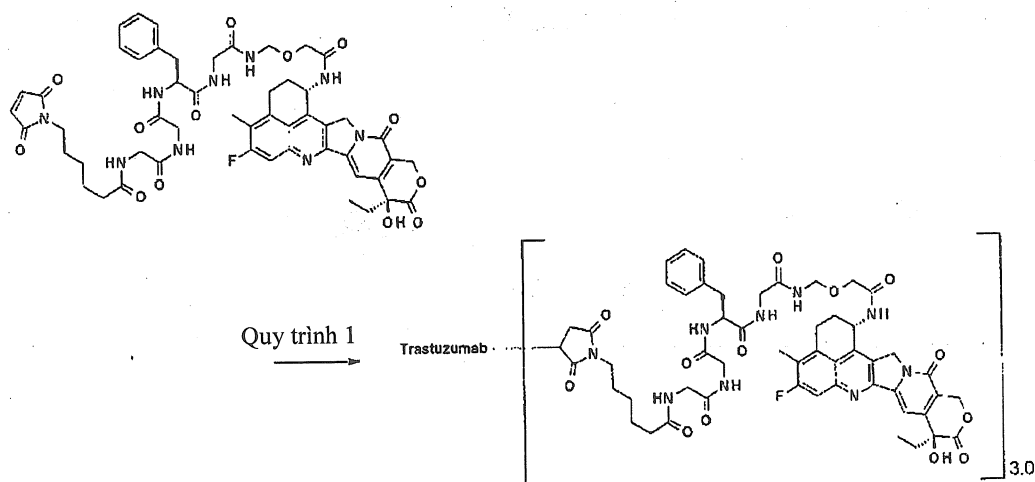
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 11,7 mL trong dung dịch tổng chứa hợp chất quan tâm.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,60 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,7 mg (94%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 5,2.

Ví dụ 29. Thể liên hợp kháng thể-được chất (29)

(Công thức 55)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (29)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (6 mL) được đặt trong ống polypropylen và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,108 mL; 2,5 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,091 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,0 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung DMSO (0,146 mL) và dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất ở quy trình 8 của ví dụ 26 (0,193 mL; 4,5 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,029 mL) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

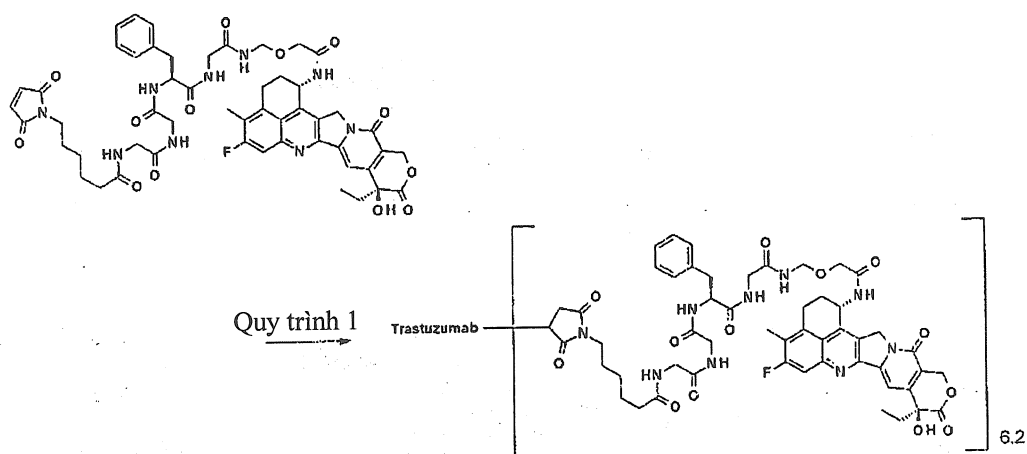
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 24 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng các quy trình chung E và F ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,77 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 42 mg (85%), số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung E: 3,0, và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung F: 3,4.

Ví dụ 30. Thể liên hợp kháng thể-được chất (30)

(Công thức 56)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (30)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều



chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (6 mL) được đặt trong ống polypropylen và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,215 mL; 5 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydrophosphat 1M (0,094 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,0 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi bổ sung dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất ở quy trình 8 của ví dụ 26 (0,370 mL; 8,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,056 mL) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

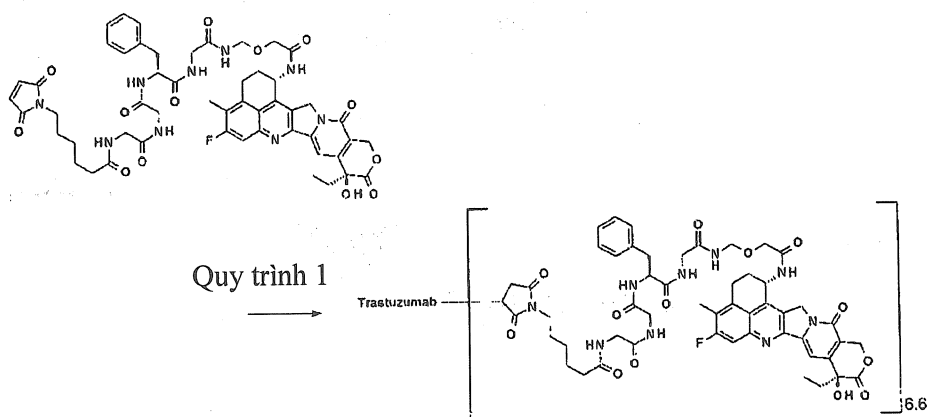
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 24 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng các quy trình chung E và F ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,92 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 46 mg (92%), số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung E: 6,2, và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung F: 7,1.

Ví dụ 31. Thể liên hợp kháng thể-được chất (31)

(Công thức 57)



### Quy trình 1: Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất (31)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (50,00 mL) được đặt trong vật chứa polypropylen và được nạp dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,745 mL) ở nhiệt độ trong phòng có khuấy và sau đó là dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (1,868 mL; 5,4 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$ , dừng khuấy, và liên kết disulfua ở phân bản lẻ trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết dược chất: Sau khi làm mát dung dịch trên đến  $15^\circ\text{C}$ , dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất ở quy trình 8 của ví dụ 26 (2,958 mL; 8,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) được bổ sung nhỏ giọt dần vào đó cùng với khuấy. Trong khi nhiệt độ được giữ ở  $15^\circ\text{C}$ , dung dịch phản ứng được khuấy trong 30 phút đầu tiên và được ủ không khuấy để cho thành phần liên kết dược chất liên hợp với kháng thể trong 1 giờ tiếp theo. Tiếp theo, dung dịch nước (0,444 mL) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó cùng với khuấy và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết dược chất trong 20 phút nữa.

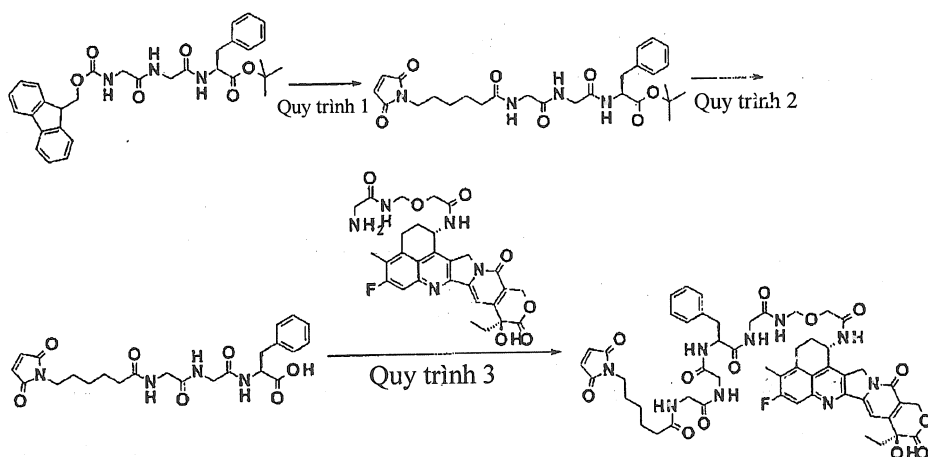
Tinh sạch: Bằng cách bổ sung dần 20% dung dịch nước axit axetic (khoảng 0,25 mL) và ABS (50 mL) vào dung dịch trên cùng với khuấy, pH của dung dịch được điều chỉnh đến  $5,5 \pm 0,1$ . Dung dịch này được đem đi lọc vi cỡ (Millipore Corp., bộ lọc Millex-HV,  $0,45 \mu\text{m}$ , màng PVDF) để loại bỏ chất màu hơi trắng. Dung dịch này được

đem đi tinh sạch bằng siêu lọc sử dụng thiết bị siêu lọc có màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), bơm ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, Pump Head model 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, ống MasterFlex L/S16). Cụ thể, trong khi ABS được bổ sung nhỏ giọt (tổng là 800 mL) làm dung dịch đệm để tinh sạch vào dung dịch phản ứng, bước tinh sạch siêu lọc được thực hiện để loại bỏ thành phần liên kết được chất chưa liên hợp và các chất phản ứng phân tử lượng thấp khác, cũng thay dung dịch đệm bằng ABS, và cô đặc thêm dung dịch. Dung dịch được tinh sạch thu được được đem đi lọc vi cỡ (0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corp., bộ lọc Millex-GV, màng PVDF) và 0,10  $\mu\text{m}$  (Millipore Corp., bộ lọc Millex-VV, màng (PVDF)) để tạo ra dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng các quy trình chung E và F ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 11,28 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 451 mg (90%), số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung E: 6,6, và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung F: 7,7.

Ví dụ 32. (Phương pháp thay thế để tổng hợp hợp chất của quy trình 8 của ví dụ 26) (Công thức 58)



Quy trình 1: tert-Butyl N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenyl alaninat

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, bổ sung 1,3-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecen (0,400 ml) vào dung dịch THF (12,0 ml) chứa tert-butyl N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxylglyxyl-L-phenyl alaninat (J. Pept. Res., 1999, vol. 53, pp. 393; 0,400 g, 0,717 mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày, và sau đó N-suxinimetyl 6-maleimetyl hexanoat (0,221 g, 0,717 mmol) được bổ sung thêm và khuấy trong 3 giờ. Dung dịch phản ứng được pha loãng bằng etyl axetat và được rửa bằng dung dịch nước chứa axit xitric 10%, dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat, và nước muối bão hòa, và sau đó lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan. Sau khi dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,295 g, 78%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,28-1,36 (2H, m), 1,41 (9H, s), 1,57-1,71 (4H, m), 2,23 (2H, t,  $J=7,6$  Hz), 3,09 (2H, d,  $J=6,0$  Hz), 3,51 (2H, t,  $J=7,6$  Hz), 3,85-4,02 (4H, m), 4,69-4,78 (1H, m), 6,15 (1H, t,  $J=4,6$  Hz), 6,33 (1H, d,  $J=7,3$  Hz), 6,60 (1H, t,  $J=5,0$  Hz), 6,68 (2H, s), 7,10-7,16 (2H, m), 7,22-7,31 (3H, m).

MS (ESI)  $m/z$ : 529 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

Quy trình 2: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl- L-phenylalanin

Bổ sung axit trifloaxetic (4,00 mL) vào dung dịch diclometan (8,00 ml) chứa hợp chất (0,295 g, 0,558 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,240 g, 91%).

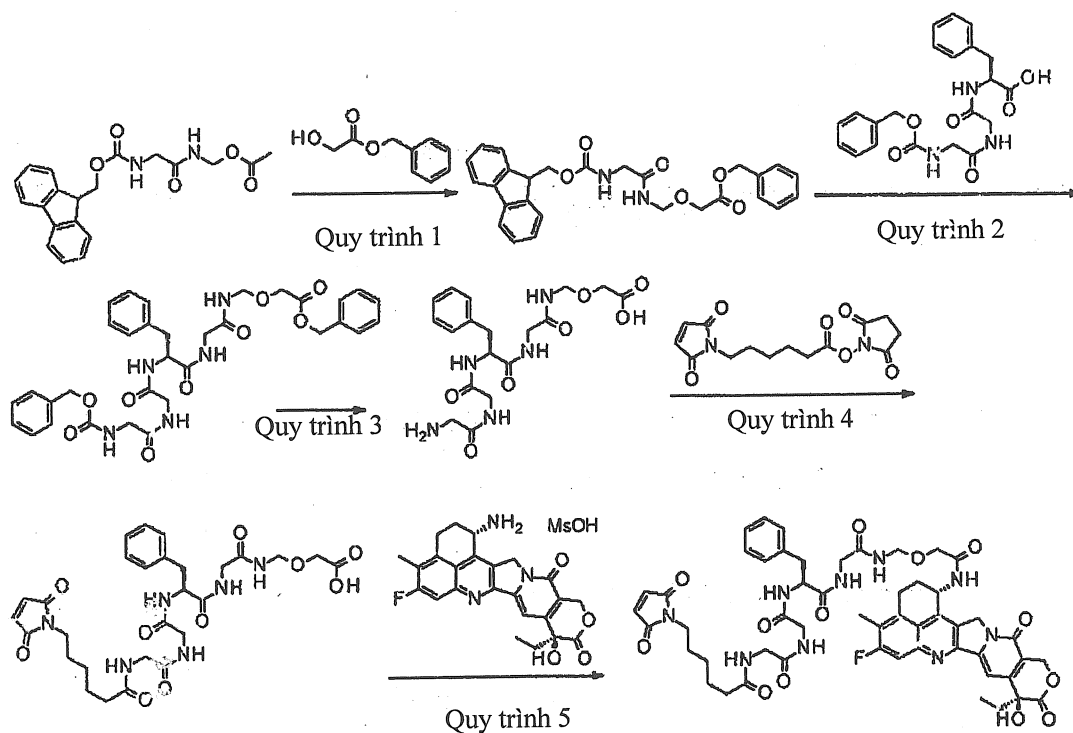
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 1,15-1,23 (2H, m), 1,40-1,53 (4H, m), 2,10 (2H, t,  $J=7,6$  Hz), 2,88 (1H, dd,  $J=13,7, 8,9$  Hz), 3,04 (1H, dd,  $J=13,7, 5,0$  Hz), 3,35-3,43 (2H, m), 3,58-3,77 (4H, m), 4,41 (1H, td,  $J=7,8, 5,0$  Hz), 7,00 (2H, s), 7,16-7,31 (5H, m), 8,00 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,06 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,13 (1H, d,  $J=7,8$  Hz).

Quy trình 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizin-1,2-b]quinolin-1-yl}amino)-2-oxoetoxymetyl]glyxinamit

Hợp chất (0,572 g, 1,21 mmol) đầu được trong quy trình 2 ở trên được hòa tan trong diclometan (12,0 mL), được nạp N-hydroxysuxinimit (0,152 g, 1,32 mmol) và 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydroclorua (0,253 g, 1,32 mmol), và được khuấy trong 1 giờ. Cho dung dịch phản ứng này vào dung dịch N,N-dimetylformamit (22,0 mL) chứa hỗn hợp (1,10 mmol) thu được trong quy trình 5 của ví dụ 26, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp dung dịch nước chứa axit xitric 10% và được chiết bằng cloroform. Lớp hữu cơ thu được được làm khô trên natri sulfat và được lọc. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,351 g, 31%). Số liệu công cụ của hợp chất này là giống với của hợp chất ở quy trình 8 của ví dụ 26.

Ví dụ 33. (Phương pháp thay thế để tổng hợp hợp chất ở quy trình 8 của ví dụ 26)

(Công thức 59)



Quy trình 1: Benzyl [(N-((9H-floren-9-ylmetoxy) cacbonyl) glyxyl) amino)metoxy]axetat

Bổ sung benzyi glycolat (6,65 g, 40,0 mmol) và monohydrat của axit p-toluen sulfonic (0,381 g, 2,00 mmol) vào dung dịch THF (200 ml) chứa hợp chất (7,37 g, 20,0 mmol) thu được trong quy trình 1 của ví dụ 26 ở 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ và 30 phút. Dung dịch phản ứng được nạp dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat và được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ thu được được làm khô trên natri sulfat và được lọc. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (hexan : etyl axetat = 100 : 0 (thể tích/thể tích) - 0 : 100) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (6,75 g, 71%). Số liệu công cụ của hợp chất này là giống với của hợp chất ở quy trình 2 của ví dụ 26.

Quy trình 2: N-[(Benzyloxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin-N-{[(2-benzyloxy)-2-oxoetoxy]metyl}glyxinamit

Bổ sung 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (2,22 g, 14,6 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (140 mL) chứa hợp chất (6,60 g, 13,9 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên ở 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Dung dịch phản ứng được nạp dung dịch N,N-dimetylformamit (140 mL) chứa N-[(benzyloxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin (6,33 g, 15,3 mmol), N-hydroxysuxinimit (1,92 g, 16,7 mmol), và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimitt hydroclorua (3,20 g, 16,7 mmol) được khuấy trước ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp axit clohydric 0,1N và chiết bằng cloroform. Lớp hữu cơ thu được được làm khô trên natri sulfat và được lọc. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (7,10 g, 79%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2,78 (1H, dd, J=13,9, 9,6 Hz), 3,05 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,56-3,80 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,55 (1H, m), 4,63 (2H, d, J=6,6 Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,16-7,38 (15H, m), 7,52 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,17 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,36 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,61 (1H, t, J=6,6 Hz).

Quy trình 3: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(carboxymetoxy)metyl]glyxinamit

Bổ sung chất xúc tác paladi cacbon (7,00 g) vào dung dịch N,N-dimetylformamit

(216 mL) chứa hợp chất (7,00 g, 10,8 mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên, và khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Chất không tan được loại bỏ bằng cách lọc qua xe-lit, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Cặn thu được được hòa tan trong nước, chất không tan được loại bỏ bằng cách lọc qua xe-lit, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Quy trình này được lặp lại hai lần để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (3,77 g, 82%).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,84 (1H, dd,  $J=13,7$ , 9,8 Hz), 3,08 (1H, dd,  $J=13,7$ , 4,7 Hz), 3,50-3,72 (4H, m), 3,77-3,86 (2H, m), 3,87 (2H, s), 4,52-4,43 (1H, m), 4,61 (2H, d,  $J=6,6$  Hz), 7,12-7,30 (5H, m), 8,43 (1H, t,  $J=5,9$  Hz), 8,54 (1H, d,  $J=7,8$  Hz), 8,70 (1H, t,  $J=6,3$  Hz), 8,79 (1H, t,  $J=5,5$  Hz).

Quy trình 4: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(carboxymethoxy)methyl]glyxinamit

Bổ sung N-suxinimetyl 6-maleimetyl hexanoat (2,88 g, 9,33 mmol) và triethylamin (0,858 g, 8,48 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (85,0 mL) chứa hợp chất (3,59 g, 8,48 mmol) thu được trong quy trình 3 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp axit clohydric 0,1N và được chiết bằng cloroform và dung môi hỗn hợp của cloroform và metanol (cloroform : metanol = 4 : 1 (thể tích/thể tích)). Lớp hữu cơ thu được được làm khô trên natri sulfat và được lọc. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ chia phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (3,70 g, 71%).

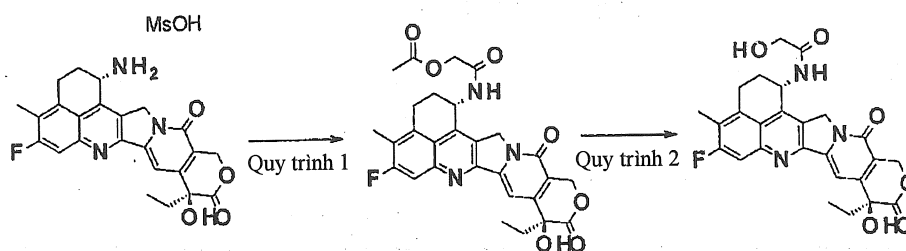
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1,13-1,24 (2H, m), 1,42-1,53 (4H, m), 2,11 (2H, t,  $J=7,4$  Hz), 2,80 (1H, dd,  $J=13,7$ , 9,8 Hz), 3,06 (1H, dd,  $J=13,9$ , 4,5 Hz), 3,37 (2H, t,  $J=7,2$  Hz), 3,56-3,78 (6H, m), 3,97 (2H, s), 4,46-4,53 (1H, m), 4,61 (2H, d,  $J=6,3$  Hz), 7,00 (2H, s), 7,15-7,29 (5H, m), 8,03-8,20 (3H, m), 8,32 (1H, t,  $J=5,9$  Hz), 8,60 (1H, t,  $J=6,7$  Hz).

Quy trình 5: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-((2-((1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizin-1,2-b]quinolin-1-yl]amino)-2-oxoetoxymethyl]glyxinamit

Bổ sung triethylamin (0,202 g, 2,00 mmol), hợp chất (1,48 g, 2,40 mmol) thu được trong quy trình 4 ở trên, và 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium clorua (0,993 g, 3,00 mmol) chứa 16,4% nước vào dung dịch N,N-dimetylformamit (40,0 mL) chứa muối axit metansulfonic của exatecan (1,14 g, 2,00 mmol), ở 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (1,69 g, 82%). Số liệu phổ của hợp chất này là giống như của hợp chất trong quy trình 8 của ví dụ 26.

Ví dụ 34. Hợp chất trung gian (34)

(Công thức 60)



Quy trình 1: 2-{[(1S,9S)-9-Etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino(1,2-b)quinolin-1-yl]amino}-2-oxoethylacetat

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, bổ sung N,N-diisopropyletylamin (0,492 mL, 2,82 mmol) và acetoxyaxetyl clorua (0,121 mL, 1,13 mmol) vào huyền phù N,N-dimetylformamit (20,0 mL) chứa muối axit metansulfonic của exatecan (0,500 g, 0,941 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ của phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,505 g, định lượng).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,08 (3H, s), 2,08-2,22 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,14-3,21 (2H, m), 4,51 (2H, dd, J=19,4, 14,7 Hz), 5,22 (2H, dd, J=40,1, 19,0 Hz), 5,43 (2H, s), 5,56-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,31 (1H, s), 7,81 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,67 (1H, d, J=8,6 Hz).



MS (ESI) m/z: 536 (M+H)+

Quy trình 2: N-[(1S,9S)-9-Etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-2-hydroxyaxetamit

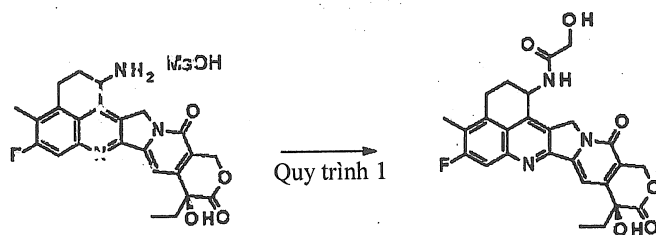
Bổ sung THF (20,0 ml) và dung dịch nước chứa natri hydroxit 1N (4,00 ml, 4,00 mmol) vào huyền phù metanol (50,0 mL) chứa hợp chất (0,504 g, 0,941 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Phản ứng được kết thúc bằng cách cho vào axit clohydric 1N (5,00 ml, 5,00 mmol), và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ chia phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3: 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,412 g, 89%). Hợp chất này được xác nhận trong khối u của chuột nhận thể liên hợp kháng thể-dược chất (45) hoặc (46).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,78-1,95 (2H, m), 2,09-2,28 (2H, m), 2,39 (3H, s), 3,07-3,27 (2H, m), 3,96 (2H, d, J=6,0 Hz), 5,11-5,26 (2H, m), 5,42 (2H, s), 5,46-5,54 (1H, m), 5,55-5,63 (1H, m), 6,52 (1H, s), 7,30 (1H, s), 7,78 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,41 (1H, d, J=9,1 Hz).

MS (ESI) m/z: 494 (M+H)+

Ví dụ 35. (Phương pháp thay thế để tổng hợp hợp chất của ví dụ 34)

(Công thức 61)



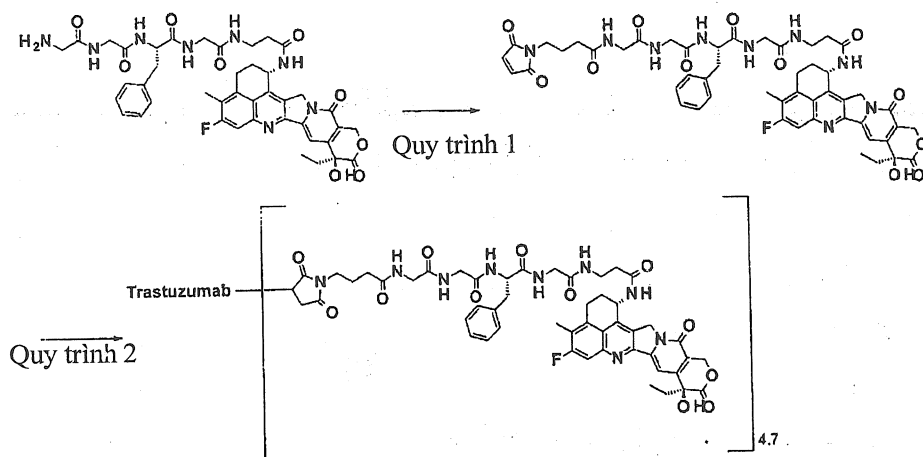
Quy trình 1: N-[(1S,9S)-9-Etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-2-hydroxyaxetamit

Axit glycolic (0,0201 g, 0,27 mmol) được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (1,0 mL), được nạp N-hydroxysuxinimit (0,0302 g, 0,27 mmol) và 1-(3-

dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (0,0508 g, 0,27 mmol), và khuấy trong 1 giờ. Bổ sung dung dịch phản ứng vào huyền phù N,N-dimethylformamide (1,0 mL) được nạp muối axit metansulfonic của exatecan (0,1 g, 0,176 mmol) và triethylamin (0,025 mL, 0,18 mmol) và được khuấy nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - chloroform : metanol = 10 : 1 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,080 g, 92%). Dữ liệu phổ của hợp chất này là giống với của hợp chất thu được trong quy trình 2 của ví dụ 34.

Ví dụ 36. Thử nghiệm hợp kháng thể-độc chất (36)

(Công thức 62)



Quy trình 1: N-[4-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-glyxyl-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

Hợp chất (60,0 mg, 0,0646 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 15 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-suxinimetyl 4-maleimide butyrate thay cho N-suxinimetyl 6-maleimide hexanoate để tạo ra hợp chất mới trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (24,0 mg, 38%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,2 Hz), 1,68 (2H, quin, J = 7,4 Hz), 1,78-1,92 (2H, m), 2,06-2,22 (2H, m), 2,10 (2H, t, J = 7,8 Hz), 2,31-2,43 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J = 13,7, 9,4 Hz), 3,01 (1H, dd, J = 13,7, 4,7 Hz), 3,17 (4H, d, J = 5,1 Hz), 3,29-3,40 (2H, m), 3,52-3,80 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J

= 18,4 Hz), 5,26 (1H, d,  $J = 18,8$  Hz), 5,42 (2H, s), 5,52-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,12-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,84 (2H, m), 8,02 (1H, t,  $J = 5,9$  Hz), 8,08-8,16 (2H, m), 8,25 (1H, t,  $J = 5,9$  Hz), 8,52 (1H, d,  $J = 8,2$  Hz).

MS (ESI)  $m/z$ : 990 (M+H)<sup>+</sup>

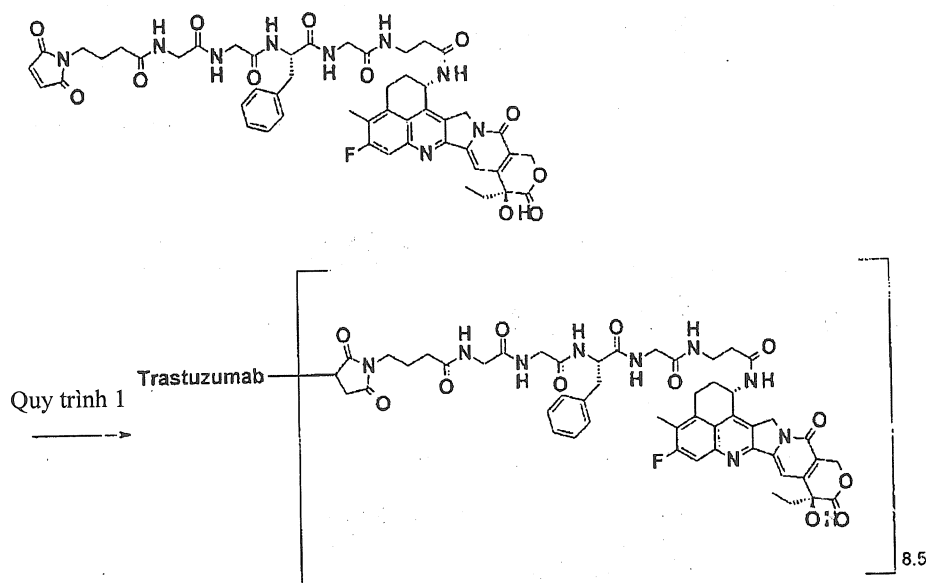
#### Quy trình 2: Thử liên hợp kháng thể-độc chất (33)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên, thử liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6.

Nồng độ kháng thể: 1,75 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,5 mg (84%), và số phân tử độc chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 4,7.

#### Ví dụ 37. Thử liên hợp kháng thể-độc chất (37)

(Công thức 63)



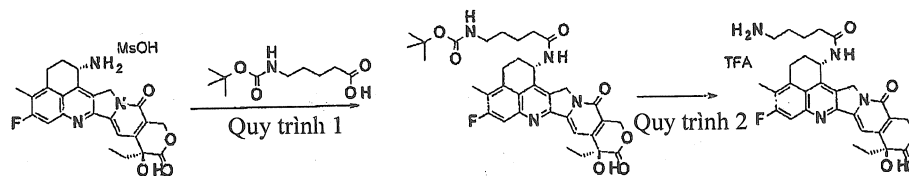
#### Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-độc chất (37)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1 của ví dụ 36, thử liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,89 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 11,3 mg (90%), và số phân tử độc chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 3,5.

Ví dụ 38. Hợp chất trung gian (38)

(Công thức 64)



Quy trình 1: tert-Butyl (5-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1'-yl]amino)-5-oxopentyl)cacbammat

Muối axit metansulfonic của exatecan (500 mg, 0,941 mmol) được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 5-(tert-butoxycarbonylamino)valeric thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nâu (571 mg, 96%). Hợp chất được sử dụng cho phản ứng tiếp theo không cần tinh sạch thêm.

MS(ESI)m/z:635(M+H)+

Quy trình 2: 5-Amino-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1'-yl]pentanamit

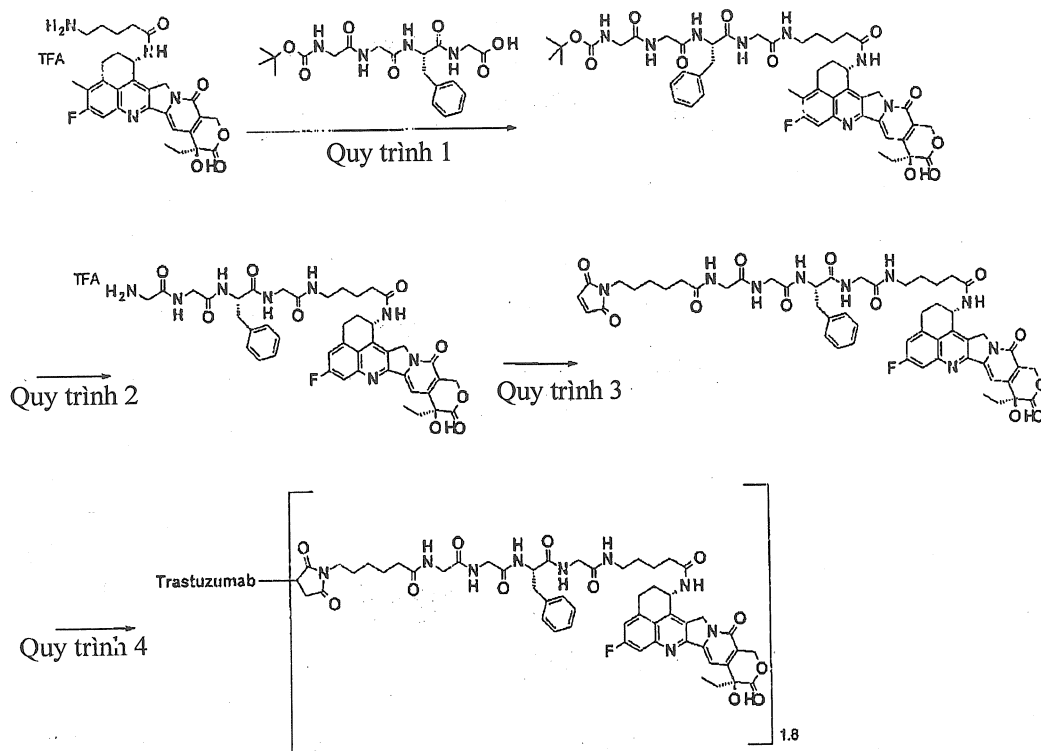
Hợp chất (558 mg, 0,879 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 1 để tạo ra trifloaxetat của hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng (363 mg, 64%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,88 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,52-1,71 (4H, m), 1,87 (2H, tt, J = 14,4, 6,9 Hz), 2,07-2,18 (2H, m), 2,22 (2H, t, J = 7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,75-2,88 (2H, m), 3,13-3,22 (2H, m), 5,18 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,24 (1H, d, J = 18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,65 (3H, br,s), 7,81 (1H, d, J = 11,3 Hz), 8,49 (1H, d, J = 8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 535 (M+H)+

Ví dụ 39. Thử liên hợp kháng thể-dược chất (39)

(Công thức 65)



Quy trình 1: N-(tert-Butoxycacbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(5-{\[(1S,9S)- 9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-5-oxopentyl)glyxinamit

Hợp chất (348 mg, 0,537 mmol) thu được trong quy trình 2 của ví dụ 38 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (429 mg, 84%). Hợp chất được sử dụng cho phản ứng tiếp theo không cần tinh sạch thêm.

Quy trình 2: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(5-{\[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-5-oxopentyl)glyxinamit

Hợp chất (427 mg, 0,448 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 2 để tạo ra trifloaxetat hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng (430 mg, 99%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J = 7,2$  Hz), 1,38-1,49 (2H, m), 1,54-1,66 (2H, m), 1,86 (2H, tt,  $J = 14,5, 7,0$  Hz), 2,08-2,16 (2H, m), 2,19 (2H, t,  $J = 7,2$

Hz), 2,40 (3H, s), 2,76 (1H, dd,  $J = 13,9, 10,0$  Hz), 3,00-3,12 (3H, m), 3,14-3,21 (2H, m), 3,57 (2H, d,  $J = 4,7$  Hz), 3,60-3,75 (3H, m), 3,87 (1H, dd,  $J = 16,8, 5,9$  Hz), 4,55 (1H, td,  $J = 9,0, 4,7$  Hz), 5,16 (1H, d,  $J = 18,8$  Hz), 5,23 (1H, d,  $J = 18,4$  Hz), 5,44 (2H, s), 5,53-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,14-7,29 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,74 (1H, t,  $J = 5,5$  Hz), 7,81 (1H, d,  $J = 10,9$  Hz), 7,96 (3H, br,s), 8,30- 8,37 (1H, m), 8,44-8,53 (2H, m).

MS (ESI)  $m/z$ : 853 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 3: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(5-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-5-oxopentyl)glyxinamit

Hợp chất (60,0 mg, 0,0621 mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn (16,0 mg, 25%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J = 7,4$  Hz), 1,13-1,21 (2H, m), 1,36-1,52 (6H, m), 1,53-1,65 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,05-2,15 (4H, m), 2,19 (2H, s), 2,40 (3H, s), 2,79 (1H, dd,  $J = 13,7, 10,2$  Hz), 2,98-3,10 (3H, m), 3,12-3,21 (2H, m), 3,29-3,37 (2H, m), 3,53-3,79 (6H, m), 4,41-4,50 (1H, m), 5,16 (1H, d,  $J = 18,8$  Hz), 5,23 (1H, d,  $J = 18,8$  Hz), 5,43 (2H, s), 5,52-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,12-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,63 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 7,80 (1H, d,  $J = 10,6$  Hz), 8,02 (1H, t,  $J = 5,9$  Hz), 8,08 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,12 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz), 8,24 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,45 (1H, d,  $J = 8,6$  Hz).

MS (ESI)  $m/z$ : 1046 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 4: Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất (39)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm, 1,37 mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> được sử dụng). Dung dịch (1,0 mL) được gom vào ống 2 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,0155 mL; 2,3 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,050 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được

khử bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi ủ dung dịch trong 10 phút ở 22°C, dung dịch DMSO (0,0311 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa 10 mM hợp chất thu được trong quy trình 3 được bổ sung vào đó và được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,00622 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được ủ ở 22°C để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

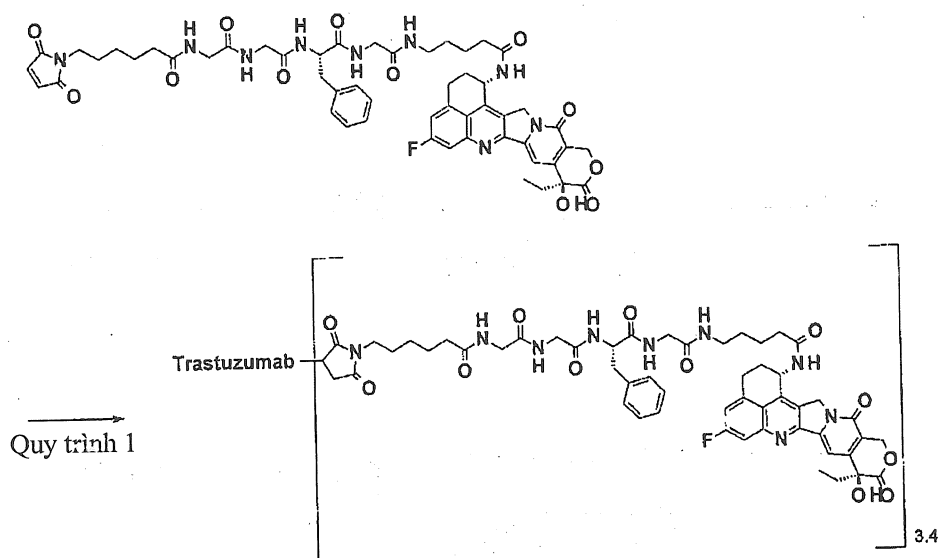
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (PBS6.0 được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 6 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 1,12 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 6,72 mg (67%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 1,8.

Ví dụ 40. Thể liên hợp kháng thể-được chất (40)

(Công thức 66)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (40)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6.9/EDTA sử dụng quy trình

chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,37 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (1,0 mL) được gom vào ống 2 mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,0311 mL; 4,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,050 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi ủ dung dịch ở  $22^\circ\text{C}$  trong 10 phút, dung dịch DMSO (0,0622 mL; 9,2 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa 10 mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của ví dụ 39 được bổ sung vào đó và được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở  $22^\circ\text{C}$  trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0124 mL; 18,4 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được ủ ở  $22^\circ\text{C}$  để kết thúc phản ứng của thành phần liên kết được chất trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D-1 (PBS6.0 được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 6 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

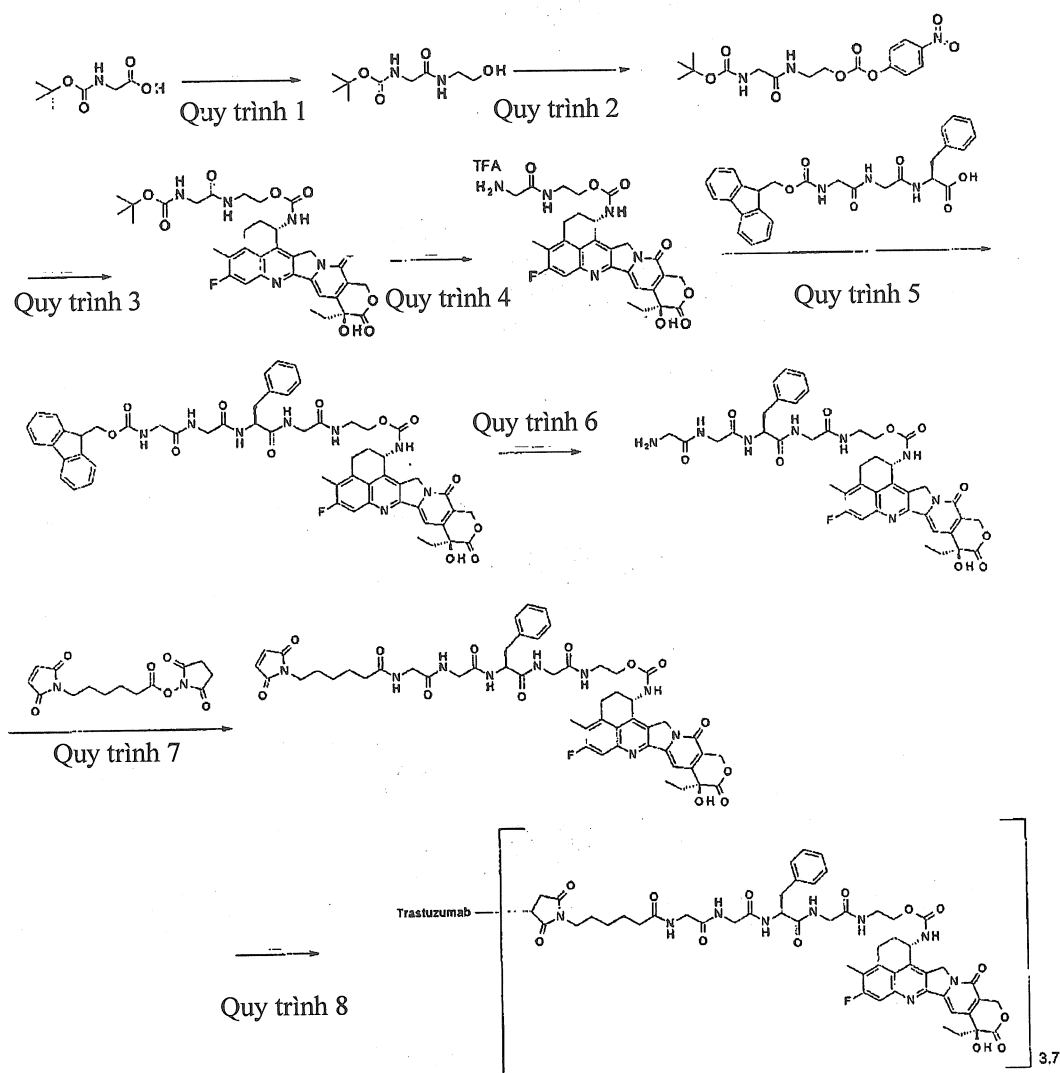
Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E, thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 0,98 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,88 mg (59%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 41. Thể liên hợp kháng thể-được chất (41)

(Công thức 67)





Quy trình 1: tert-Butyl {2-[(2-hydroxyethyl)amino]-2-oxoethyl} carbamat

N-(tert-Butoxycarbonyl)glyxin (4,2 g, 24 mmol) được hòa tan trong dimetylformamit (40 mL). Sau khi bổ sung aminoetanol (2,9 g, 48 mmol) và 1-hydroxybenzotriazol (3,7 g, 24 mmol) và bổ sung 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimitt hydroclorua (6,9 g, 36 mmol), hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn được nạp toluen để chưng cất đẳng phí. Cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (etyl axetat - etyl axetat : metanol = 10 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất dầu không màu (3,8 g, 72%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,44 (9H, s), 1,69 (1H, brs), 3,43 (2H, td,  $J = 5,9, 5,1$  Hz), 3,71 (2H, t,  $J = 5,1$  Hz), 3,79 (2H, d,  $J = 5,9$  Hz), 5,22 (1H, brs), 6,62 (1H, brs).

Quy trình 2: 2-{[N-(tert-Butoxycarbonyl)glyxyl]amino}etyl-4-nitrophenylcacbonat

Bổ sung diisopropyletylamin (0,80 mL, 4,59 mmol) và bis(4-nitrophenyl) cacbonat (1,32 g, 6,88 mmol) vào THF (23 mL) dung dịch chứa hợp chất (1,0 g, 4,59 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (hexan - hexan : etyl axetat = 1 : 3 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (1,13 g, 64%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,44 (1H, s), 3,66 (2H, td, J = 5,1, 5,9 Hz), 3,81 (2H, d, J = 5,9 Hz), 4,36 (2H, t, J = 5,1 Hz), 5,07 (1H, s), 6,48-6,53 (1H, m), 7,38 (2H, dt, J = 9,9, 2,7 Hz), 8,27 (2H, dt, J = 9,9, 2,7 Hz).

Quy trình 3: 2-({[(tert-Butoxycarbonyl)amino]axetyl}amino)etyl[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano [3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]cacbamat

Bổ sung dimetylformamit (23 mL) vào muối axit metansulfonic của exatecan (0,70 g, 1,2 mmol), hợp chất (0,57 g, 1,5 mmol) thu được trong quy trình 2, và 1-hydroxybenzotriazol (3,7 g, 24 mmol), và bổ sung diisopropyletylamin (0,43 mL, 2,5 mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn được nạp toluen để chưng cất đẳng phí. Cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 10 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,86 g, định lượng) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,35 (9H, s), 1,78-1,94 (1H, m), 2,07-2,17 (1H, m), 2,17-2,27 (1H, m), 2,37 (3H, s), 3,05-3,16 (1H, m), 3,19-3,26 (1H, m), 3,34-3,39 (2H, m), 3,50-3,56 (2H, m), 4,00-4,07 (1H, m), 4,13-4,21 (1H, m), 5,15-5,34 (3H, m), 5,44 (2H, s), 6,54 (1H, s), 6,90-6,96 (1H, m), 7,32 (1H, s), 7,78 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,93-8,07 (2H, m).

Quy trình 4: 2-(Glyxylamino)etyl[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]cacbamat

Hợp chất (0,86 g, 2,1 mmol) thu được trong quy trình 3 ở trên được hòa tan

trong diclometan (15 mL). Sau khi bổ sung axit trifloaxetic (15 mL), nó được khuấy trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn được nạp toluen để chưng cất đẳng phí. Cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ chia phần của cloroform : metanol: nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,86 g, 99%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J = 7,2$  Hz), 1,79-1,95 (2H, m), 2,06-2,18 (1H, m), 2,18-2,29 (1H, m), 2,38 (3H, s), 3,07-3,17 (1H, m), 3,20-3,29 (1H, m), 3,36-3,50 (2H, m), 3,51-3,62 (2H, m), 3,99-4,08 (1H, m), 4,22-4,31 (1H, m), 5,16-5,35 (3H, m), 5,42 (1H, d,  $J = 18,8$  Hz), 5,46 (1H, d,  $J = 18,8$  Hz), 6,56 (1H, s), 7,34 (1H, s), 7,65 (2H, brs), 7,79 (1H, d,  $J = 10,6$  Hz), 7,99-8,06 (1H, m), 8,51 (1H, t,  $J = 5,5$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 939 (M+H) $^+$

Quy trình 5: N-[(9H-Floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-({[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]carbonyl}oxy)etyl]glyxinamit

N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin (đơn sáng chế Nhật số 2002-60351; 0,21 g, 0,41 mmol) được hòa tan trong N,N- dimetylformamit (3 mL). Sau khi bổ sung N-hydroxysuxinimit (0,052 g, 0,45 mmol) và 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua (0,086 g, 0,45 mmol), nó được khuấy trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch N,N- dimetylformamit (2 mL) được nạp hợp chất (0,24 g, 0,35 mmol) thu được trong quy trình 4 và trietylamin (0,078 mL, 0,45 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,24 g, 65%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,86 (3H, t,  $J = 7,3$  Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,05-2,27 (2H, m), 2,36 (3H, s), 2,73-2,81 (1H, m), 2,98-3,12 (2H, m), 3,17-3,26 (1H, m), 3,35-3,42 (2H, m), 3,55-3,79 (6H, m), 4,00-4,10 (1H, m), 4,12-4,23 (2H, m), 4,23-4,29 (2H, m), 4,45-4,55 (1H, m), 5,13-5,33 (3H, m), 5,40 (1H, d,  $J = 17,2$  Hz), 5,44 (1H, d,

$J = 17,2$  Hz), 6,53 (1H, s), 7,11-7,26 (5H, m), 7,26-7,33 (3H, m), 7,38 (2H, t,  $J = 7,6$  Hz), 7,57 (1H, t,  $J = 5,9$  Hz), 7,63 (2H, d,  $J = 7,4$  Hz), 7,77 (1H, d,  $J = 11,0$  Hz), 7,85 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz), 7,91-7,97 (1H, m), 7,98-8,05 (2H, m), 8,14 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz), 8,31-8,26 (1H, m).

MS (APCI)  $m/z$ : 1063 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 6: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-({[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]carbamoyl}oxy)etyl]glyxinamit

Hợp chất (0,24 g, 0,35 mmol) thu được trong quy trình 5 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 7 của ví dụ 26 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,12 g, 65%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,86 (3H, t,  $J = 7,4$  Hz), 1,78-1,94 (2H, m), 2,06-2,27 (2H, m), 2,37 (3H, s), 2,72-2,81 (1H, m), 2,98-3,07 (1H, m), 3,12-3,17 (2H, m), 3,57-3,81 (6H, m), 4,00-4,21 (3H, m), 4,45-4,54 (1H, m), 5,15-5,35 (3H, m), 5,41 (1H, d,  $J = 17,2$  Hz), 5,45 (1H, d,  $J = 17,2$  Hz), 6,54 (1H, s), 7,11-7,26 (6H, m), 7,32 (1H, s), 7,78 (1H, d,  $J = 11,0$  Hz), 7,93-8,00 (1H, m), 8,03 (1H, d,  $J = 9,4$  Hz), 8,06-8,13 (1H, m), 8,21-8,27 (2H, m), 8,30-8,36 (1H, m). MS (APCI)  $m/z$ : 841 (M+H)<sup>+</sup>

Quy trình 7: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-({[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]carbamoyl}oxy)etyl]glyxinamit

Hợp chất (42,0 mg, 0,0499 mmol) thu được trong quy trình 6 được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 3 của ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (38,3 mg, 74%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J = 7,4$  Hz), 1,12-1,23 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,80-1,95 (2H, m), 2,05-2,27 (4H, m), 2,38 (3H, s), 3,43-2,40 (8H, m), 3,53-3,78 (6H, m), 4,00-4,21 (2H, m), 4,44-4,55 (1H, m), 5,17-5,36 (3H, m), 5,43 (2H, s), 6,54 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,19 (5H, d,  $J = 23,9$  Hz), 7,33 (1H, s), 7,78 (1H, d,  $J = 10,6$  Hz), 7,91-8,16 (5H, m), 8,24-8,31 (1H, m).

MS (ESI)  $m/z$ : 1034 (M+H)<sup>+</sup>

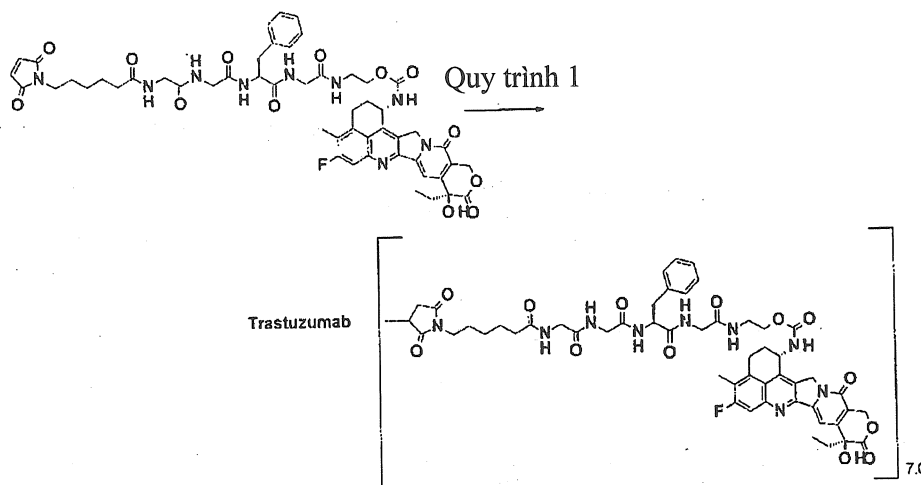
Quy trình 8: Thử liên hợp kháng thể-độc chất (41)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 7 ở trên, thử liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 6.

Nồng độ kháng thể: 1,54 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,2 mg (74%), và số phân tử độc chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

Ví dụ 42. Thử liên hợp kháng thể-độc chất (42)

(Công thức 58)



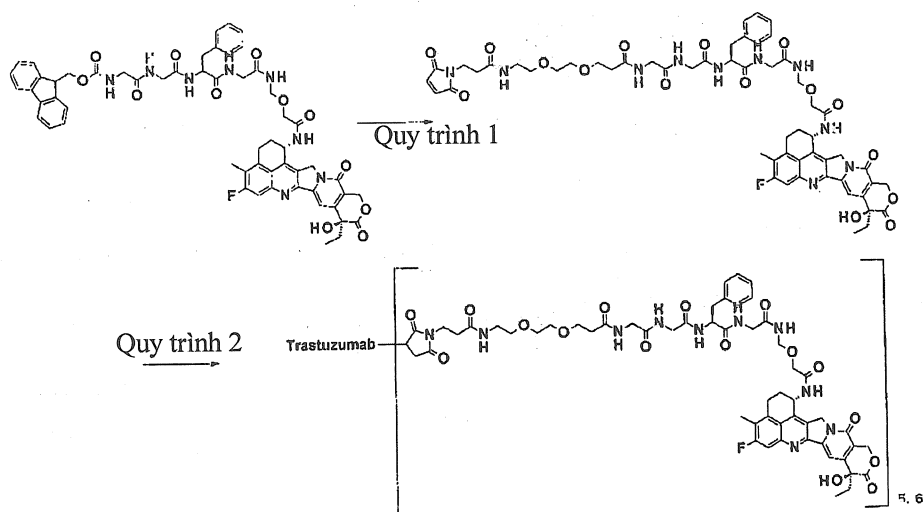
Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-độc chất (42)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 7 của ví dụ 41, thử liên hợp kháng thể-độc chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,47 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,8 mg (71%), và số phân tử độc chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 7,0.

Ví dụ 43. Thử liên hợp kháng thể-độc chất (43)

(Công thức 69)



Quy trình 1: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoyl]amino}etoxy)etoxy]propanoyl}glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-5-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)methyl]glyxinamit

Hợp chất (53,7 mg, 50,5  $\mu\text{mol}$ ) thu được trong quy trình 6 của ví dụ 26 được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (1,50 mL). Sau khi bổ sung 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecen (7,5  $\mu\text{L}$ , 50,5  $\mu\text{mol}$ ), hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch phản ứng được nạp pyridini p-toluensulfonat (14,0 mg, 5,56  $\mu\text{mol}$ ), sau đó được nạp N-suxinimetyl 3-(2-(2-(3-maleinimittopropanamido)etoxy)etoxy)propanoat (32,3 mg, 75,8  $\mu\text{mol}$ ), và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2,25 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel ((cloroform - lớp hữu cơ chia phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (27,1 mg, 47%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz), 1,79-1,91 (2H, m), 2,18 (2H, t,  $J = 15,1$  Hz), 2,29-2,33 (4H, m), 2,39 (3H, s), 2,76 (1H, dd,  $J = 13,9, 9,2$  Hz), 3,02 (1H, dd,  $J = 13,7, 3,9$  Hz), 3,13-3,15 (2H, m), 3,44-3,46 (6H, m), 3,57-3,59 (6H, m), 3,69-3,75 (6H, m), 4,01 (2H, s), 4,46-4,48 (1H, m), 4,63 (2H, d,  $J = 6,3$  Hz), 5,21 (2H, s), 5,42 (2H, s), 5,60 (1H, dd,  $J = 13,5, 5,7$  Hz), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,17-7,24 (6H, m), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d,  $J = 11,0$  Hz), 8,00-8,02 (2H, m), 8,13 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz), 8,17 (1H, t,  $J = 6,3$  Hz), 8,52 (1H, d,  $J = 9,0$  Hz), 8,65 (1H, t,  $J = 6,5$  Hz).

MS (ESI)  $m/z = 1151 (M+H)^+$

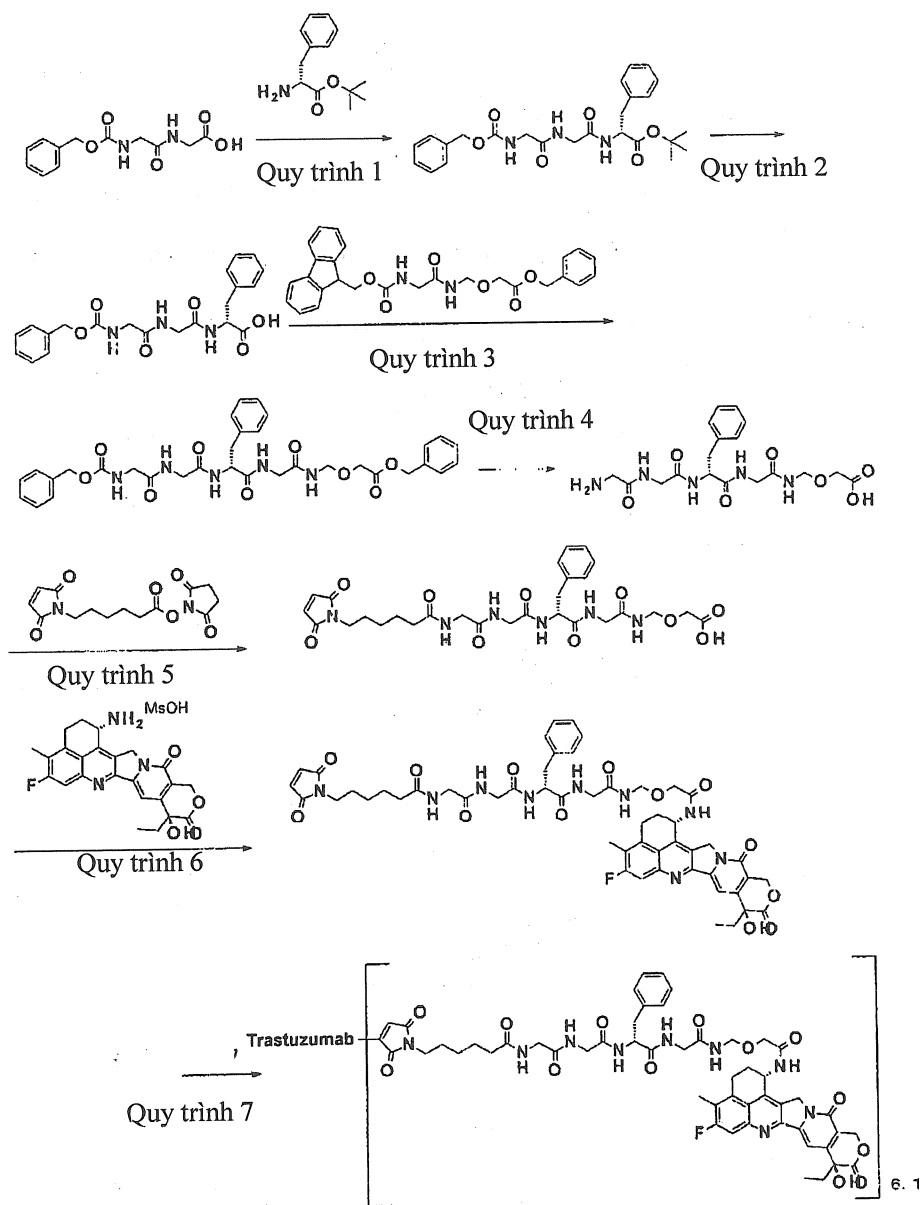
Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-được chất (43)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 1, thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,96 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 17,6 mg (88%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 5,6.

Ví dụ 44. Thể liên hợp kháng thể-được chất (44)

(Công thức 70)



Quy trình 1: tert-Butyl N-[(benzyloxy)carbonyl]glyxylglyxyl-D-phenylalaninat

N-[(Benzyloxy)carbonyl]glyxylglyxin (3,00 g, 11,3 mmol) được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (20,0 mL). Sau khi bổ sung N-hydroxysuxinimit (1,43 g, 12,4 mmol) và 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua (2,37 g, 12,4 mmol), hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ. Dung dịch N,N-dimetylformamit (10 mL) được nạp D-phenylalanin tert-butyl (2,74 g, 12,38 mmol) và trietylamin (1,73 mL, 12,4 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch phản ứng và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp diclometan và được rửa bằng nước, axit clohydric 1N, và dung dịch nước bão hòa chứa natri bicacbonat, và sau đó lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (4,21 g, 80%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,41 (9H, s), 3,03-3,14 (2H, m), 3,86-3,97 (4H, m), 4,70-4,77 (1H, m), 5,13 (2H, s), 5,43 (1H, brs), 6,42 (1H, d,  $J = 10,0$  Hz), 6,64-6,71 (1H, m), 7,11-7,15 (2H, m), 7,20-7,31 (4H, m), 7,31-7,38 (4H, m).

MS (APCI)  $m/z$ : 470 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

Quy trình 2: N-[(Benzyloxy)carbonyl]glyxylglyxyl-D-phenylalanin

Hợp chất (4,21 g, 8,97 mmol) thu được trong quy trình 1 được hòa tan trong etyl axetat (20 mL). Sau khi bổ sung dung dịch etyl axetat (20,0 mL) chứa hydro clorua 4N, hỗn hợp được để qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, sau đó toluen được bổ sung, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ chia phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (1,66 g, 45%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,92-3,01 (1H, m), 3,10-3,18 (1H, m), 3,65-3,81 (3H, m), 3,88-3,98 (1H, m), 4,64-4,73 (1H, m), 5,06 (2H, s), 5,87 (1H, brs), 7,10-7,37 (13H, m).

MS (APCI)  $m/z$ : 412 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^-$

Quy trình 3: N-[(Benzyloxy)carbonyl]glyxylglyxyl-D-phenylalanyl-N-[[2-(benzyloxy)-2-oxoetoxymetyl]glyxinamit



Bổ sung piperidin (5,00 mL) và N,N-dimetylformamit (5,00 mL) vào dung dịch dioxan (25,0 mL) chứa hợp chất (1,25 g, 2,63 mmol) thu được trong quy trình 1 của ví dụ 32, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (20,0 mL). Sau khi bổ sung hợp chất (1,20 g, 2,90 mmol) của quy trình 2 ở trên và 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholinium clorua (1,03 g, 3,16 mmol) chứa 16,4% nước, hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp cloroform và được rửa bằng nước, và sau đó lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (270 mg, 16%).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,78 (1H, dd,  $J = 13,6, 10,0$  Hz), 3,05 (1H, dd,  $J = 13,9, 4,2$  Hz), 3,56-3,79 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,54 (1H, m), 4,63 (2H, d,  $J = 6,7$  Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,14-7,39 (15H, m), 7,50 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,02 (1H, t,  $J = 5,4$  Hz), 8,16 (1H, d,  $J = 7,9$  Hz), 8,34 (1H, t,  $J = 6,0$  Hz), 8,60 (1H, t,  $J = 7,0$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 648 (M+H) $^+$

Quy trình 4: Glyxylglyxyl-D-phenylalanyl-N-[(carboxymetoxy)metyl]glyxinamit

Hợp chất (200 mg, 0,31 mmol) thu được trong quy trình 3 ở trên được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (5,0 mL). Sau khi bổ sung 5% chất xúc tác paladi cacbon (0,12 g), hỗn hợp được khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 9 giờ. Dung dịch phản ứng được lọc qua xe-lit, và cặn được rửa bằng dung môi hỗn hợp chứa nước và N,N-dimetylformamit. Dịch lọc và nước rửa được kết hợp, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (0,15 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,85 (1H, dd,  $J = 13,3, 9,7$  Hz), 3,08 (1H, dd,  $J = 13,9, 5,4$  Hz), 3,43-3,52 (4H, m), 3,62-3,89 (7H, m), 4,36-4,44 (1H, m), 4,58-4,67 (2H, m), 7,12-7,29 (5H, m), 8,44 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,67 (1H, d,  $J = 7,3$  Hz), 8,78 (1H, t,  $J = 5,4$  Hz), 8,91 (1H, brs).

MS (APCI)  $m/z$ : 424 (M+H) $^+$

Quy trình 5: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-D-

phenylalanyl-N-[(carboxymethoxy)methyl]glyxinamit

Hợp chất (0,15 g, 0,35 mmol) thu được trong quy trình 4 ở trên được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (10 mL). Sau khi bổ sung N-suxinimetyl 6-maleimetyl hexanoat (0,11 g, 0,35 mmol), hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp cloroform và được rửa bằng nước, và sau đó lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ chia phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn không màu (41 mg, 26%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 1,13-1,24 (2H, m), 1,42-1,53 (4H, m), 2,12 (2H, t, J = 7,3 Hz), 2,82 (1H, dd, J = 13,9, 10,0 Hz), 3,09 (1H, dd, J = 13,9, 4,8 Hz), 3,17 (2H, d, J = 4,2 Hz), 3,47-3,89 (8H, m), 4,08-4,14 (1H, m), 4,41-4,49 (1H, m), 4,58-4,69 (2H, m), 7,00 (2H, s), 7,14-7,27 (5H, m), 8,31 (1H, t, J = 6,0 Hz), 8,39 (1H, brs), 8,55 (2H, brs), 8,93 (1H, brs).

MS (APCI) m/z: 615 (M-H) -

Quy trình 6: N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-D-phenylalanyl-N-[(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino)-2-oxoethoxy)methyl]glyxinamit

Bổ sung triethylamin (5,42 µL, 0,388 mmol), hợp chất (29 mg, 0,466 mmol) thu được trong quy trình 5 ở trên, và 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (19 mg, 0,686 mmol) chứa 16,4% nước và dung dịch N,N-dimetylformamit (10 mL) chứa muối axit metansulfonic của exatecan (22 mg, 0,388 mmol) ở 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung môi trong dung dịch phản ứng được loại bỏ dưới áp suất giảm, và sau đó cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký cột silicagel (cloroform - lớp hữu cơ chia phần của cloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng nhạt (26 mg, 65%).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,09 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,13-2,23 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J = 13,6, 9,4 Hz), 2,98-3,05 (1H, m), 3,13-3,23 (2H, m), 3,54-3,78 (8H, m),

4,02 (2H, s), 4,41-4,50 (1H, m), 4,61-4,66 (2H, m), 5,21 (2H, s), 5,42 (2H, s), 5,56-5,64 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,14-7,27 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d,  $J = 10,9$  Hz), 8,01 (1H, t,  $J = 5,4$  Hz), 8,07 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,14 (1H, d,  $J = 7,9$  Hz), 8,31 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,53 (1H, d,  $J = 9,1$  Hz), 8,63 (1H, t,  $J = 6,3$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 1034 (M+H)<sup>+</sup>

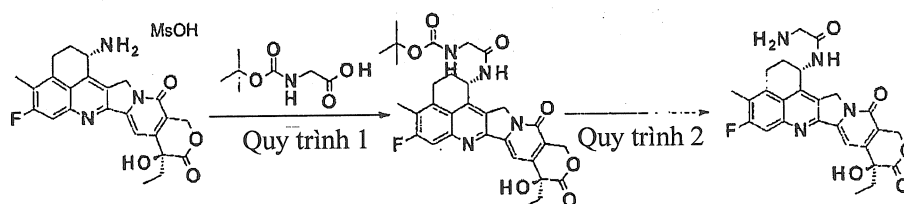
#### Quy trình 7: Thử liên hợp kháng thể-dược chất (44)

Bằng cách sử dụng trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 và hợp chất thu được trong quy trình 6 ở trên, thử liên hợp kháng thể-dược chất nêu trong tiêu đề thu được theo cùng cách thức như quy trình 1 của ví dụ 7.

Nồng độ kháng thể: 1,87 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 16,8 mg (84%), và số phân tử dược chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 6,1.

#### Ví dụ 45. Hợp chất trung gian (45)

(Công thức 71)



Quy trình 1: tert-Butyl (2-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino)-2-oxoethyl)carbamate

Bổ sung N-hydroxysuccinimide (0,260 g, 2,26 mmol) và *i*-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (0,433 mg, 2,25 mmol) vào dung dịch dichlorometan (3,00 mL) chứa N-(tert-butoxycarbonyl)-glycine (0,395 g, 2,26 mmol) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Dung dịch này được bổ sung vào dung dịch chứa muối axit metansulfonic của exatecan (1,00 g, 1,88 mmol), triethylamine (0,315 mL, 2,26 mmol), và N,N-dimethylformamide (3,00 mL) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 16,5 giờ. Dung dịch phản ứng được pha loãng bằng chloroform và được rửa bằng dung dịch axit citric 10%, và sau đó lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfate khan. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm, và cặn thu được được tinh sạch bằng sắc ký

cột silicagel (cloroform - cloroform : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)) để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng (1,16 g, 99%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,86 (3H, t,  $J = 7,2$  Hz), 1,30 (9H, s), 1,81-1,89 (2H, m), 2,09-2,21 (2H, m), 2,38 (3H, s), 3,15-3,17 (2H, m), 3,55-3,56 (2H, m), 5,15 (1H, d,  $J = 18,3$  Hz), 5,23 (1H, d,  $J = 19,2$  Hz), 5,41 (2H, s), 5,55-5,56 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,95 (1H, t,  $J = 5,5$  Hz), 7,28 (1H, s), 7,77 (1H, d,  $J = 11,0$  Hz), 8,39 (1H, d,  $J = 8,6$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 593 (M+H) $^+$

Quy trình 2: N-[(1S,9S)-9-Etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]glyxinamit

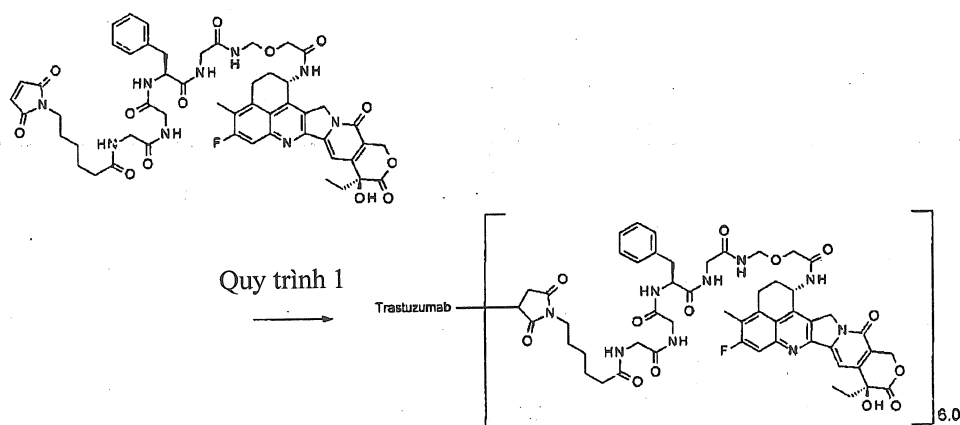
Hợp chất (0,513 g, 1,01 mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên được cho phản ứng theo cùng cách thức như quy trình 2 của ví dụ 1 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng (0,463 g, 93%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0,96 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz), 1,89-1,91 (2H, m), 2,14-2,16 (1H, m), 2,30 (3H, s), 2,40-2,42 (1H, m), 3,15-3,21 (2H, m), 3,79-3,86 (2H, m), 4,63-4,67 (1H, m), 5,00-5,05 (1H, m), 5,23 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz), 5,48 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz), 5,62-5,64 (1H, m), 7,40-7,45 (2H, m).

MS (APCI)  $m/z$ : 493 (M+H) $^+$

Ví dụ 46. Thê liên hợp kháng thể-dược chất (46)

(Công thức 72)



### Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (46)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (50 mL) được đặt trong bình Erlenmeyer chứa polycarbonat 125 mL, được nạp dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M ở nhiệt độ trong phòng (0,750 mL) cùng với khuấy sử dụng máy khuấy từ, và sau đó được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (1,857 mL; 5,4 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,0 \pm 0,1$ , dừng khuấy, và liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi làm mát dung dịch đến  $15^\circ\text{C}$ , dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất trong quy trình 8 của ví dụ 26 (2,958 mL; 8,6 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) được bổ sung nhỏ giọt dần vào đó cùng với khuấy. Ở  $15^\circ\text{C}$ , dung dịch phản ứng được khuấy trong 30 phút đầu và được ủ không khuấy để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể trong 1 giờ tiếp theo. Tiếp theo, dung dịch nước (0,444 mL; 12,9 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó cùng với khuấy và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc tính phản ứng của thành phần liên kết được chất chưa phản ứng trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Bằng cách bổ sung dần dung dịch nước axit axetic 20% (khoảng 0,25 mL) và ABS (50 mL) vào dung dịch trên cùng với khuấy, pH của dung dịch được điều chỉnh đến  $5,5 \pm 0,1$ . Dung dịch này được đem đi lọc vi cỡ (Millipore Corp., bộ lọc Millex-HV,  $0,45 \mu\text{m}$ , màng PVDF) để loại bỏ chất màu hơi trắng. Dung dịch này được đem đi tinh sạch siêu lọc sử dụng thiết bị siêu lọc có màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), bơm ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, Pump Head model 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, ống MasterFlex L/S16). Cụ thể, trong khi ABS được bổ sung nhỏ giọt (tổng là 800 mL) làm dung dịch đệm để tinh sạch vào dung dịch phản ứng, việc tinh sạch siêu lọc được thực hiện để loại bỏ thành phần liên kết được chất chưa liên hợp và các chất phản ứng phân tử lượng thấp khác, cũng thay dung dịch đệm bằng ABS, và cô thêm dung dịch. Dung dịch được tinh sạch thu được được đem đi lọc vi cỡ ( $0,22 \mu\text{m}$

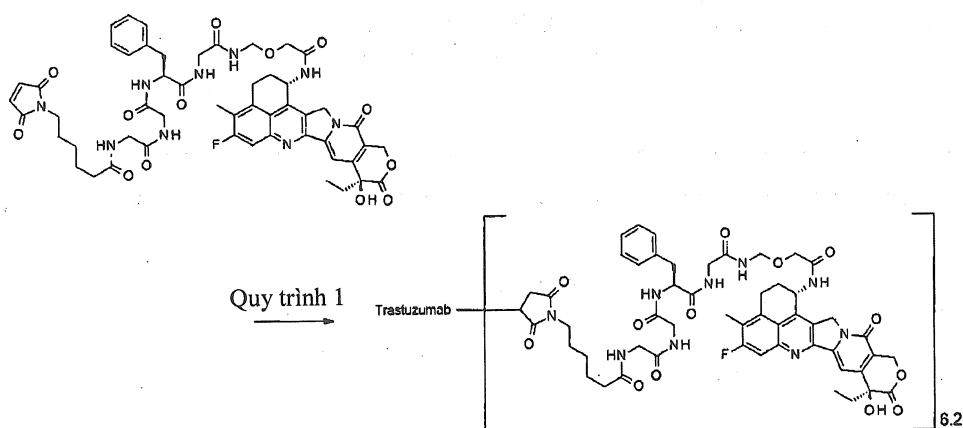
(Millipore Corp., bộ lọc Millex-GV, màng PVDF) và 0,10  $\mu\text{m}$  (Millipore Corp., bộ lọc Millex-VV, màng PVDF)) để tạo ra 42,5 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng các quy trình chung E và F ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 10,4 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 442 mg (88,5%), số phân tử dược chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung E: 6,0, và số phân tử dược chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung F: 7,5.

Ví dụ 47. Thể liên hợp kháng thể-dược chất (47)

(Công thức 73)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-dược chất (47)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (15 mL) được đặt trong ống polypropylen và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (0,567 mL; 5,5 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (0,225 mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,0 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 2 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết dược chất: Sau khi bổ sung DMSO

(0,146 mL) và dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất trong quy trình 8 của ví dụ 26 (0,928 mL; 9,0 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được ủ để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể ở 15°C trong 30 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,133 mL; 12,9 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc tính phản ứng của thành phần liên kết được chất chưa phản ứng trong 20 phút nữa.

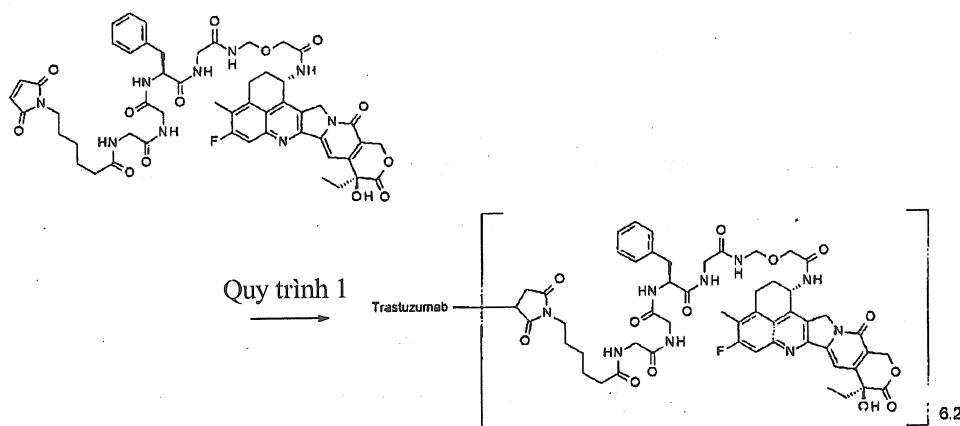
Tinh sạch: Dung dịch trên được đem đi tinh sạch sử dụng quy trình chung D (ABS được sử dụng làm dung dịch đệm) để tạo ra 49 mL dung dịch chứa hợp chất quan tâm.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 2,91 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 143 mg (95%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 6,2.

Ví dụ 48. Thể liên hợp kháng thể-được chất (48)

(Công thức 74)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (48)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ thêm khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (280 mL) được đặt trong bình Erlenmeyer chứa polycarbonat 1000 mL, được nạp dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M ở nhiệt độ trong phòng (4,200 mL) cùng với khuấy sử dụng

máy khuấy từ, và sau đó được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (10,594 mL; 5,5 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,4 \pm 0,1$ , dừng khuấy, và liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở 37°C trong 2 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi làm mát dung dịch trên đến 15°C, dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất trong quy trình 8 của ví dụ 26 (17,335 mL; 9,0 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) được bổ sung nhỏ giọt dần vào đó cùng với khuấy. Dung dịch phản ứng được khuấy ở 15°C để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể trong 30 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (2,485 mL; 12,9 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó cùng với khuấy và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc tính phản ứng của thành phần liên kết được chất chưa phản ứng trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Bằng cách bổ sung dần dung dịch nước axit axetic 20% (khoảng 1,4 mL) và ABS (280 mL) vào dung dịch trên cùng với khuấy, pH của dung dịch được điều chỉnh đến  $5,5 \pm 0,1$ . Dung dịch này được đem đi lọc vi cỡ (0,45  $\mu\text{m}$ , màng PVDF) để loại bỏ chất màu hơi trắng trong khi tạo ra khoảng 600 mL dịch lọc. Dung dịch này được đem đi tinh sạch siêu lọc sử dụng thiết bị siêu lọc có màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), bơm ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, Pump Head model 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, ống MasterFlex L/S16). Cụ thể, trong khi ABS được bổ sung nhỏ giọt (tổng là 4800 mL) làm dung dịch đệm để tinh sạch vào dung dịch phản ứng, việc tinh sạch siêu lọc được thực hiện để loại bỏ thành phần liên kết được chất chưa liên hợp và các chất phản ứng phân tử lượng thấp khác, cũng thay dung dịch đệm bằng ABS, và cô thêm dung dịch. Dung dịch được tinh sạch thu được được đem đi lọc vi cỡ (hai lần bằng màng PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  và 0,10  $\mu\text{m}$ ) để tạo ra 70 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-được chất nêu trong tiêu đề.

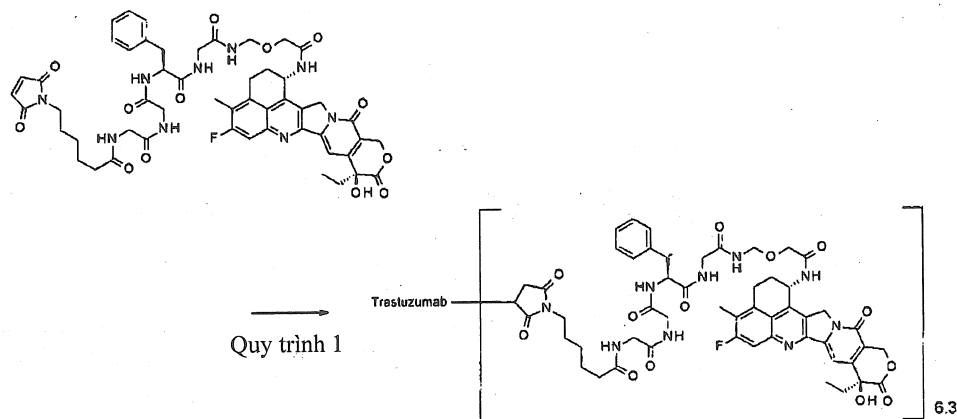
Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 35,96 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2517 mg (90%), và số phân tử được chất liên hợp trung bình ( $n$ ) với mỗi phân tử kháng thể: 6,2.



Ví dụ 49. Thể liên hợp kháng thể-được chất (49)

(Công thức 75)



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-được chất (49)

Khử kháng thể: Trastuzumab được tạo ra trong ví dụ tham khảo 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA sử dụng quy trình chung C-1 và quy trình chung B (khi hệ số hấp thụ ở bước sóng 280 nm,  $1,48 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  được sử dụng). Dung dịch (280 mL) được đặt trong bình Erlenmeyer 1000 mL chứa polycarbonat, được nạp dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M ở nhiệt độ trong phòng (4,200 mL) cùng với khuấy sử dụng máy khuấy từ, và sau đó được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10 mM (10,594 mL; 5,5 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có pH =  $7,0 \pm 0,1$ , dừng khuấy, và liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 2 giờ.

Liên hợp kháng thể với thành phần liên kết được chất: Sau khi làm mát dung dịch trên đến  $15^\circ\text{C}$ , dung dịch DMSO chứa 10 mM hợp chất trong quy trình 8 của ví dụ 26 (17,335 mL; 9,0 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) được bổ sung nhỏ giọt dần vào đó cùng với khuấy. Dung dịch phản ứng được khuấy ở  $15^\circ\text{C}$  để cho thành phần liên kết được chất liên hợp với kháng thể trong 30 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (2,485 mL; 12,9 đương lượng với mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100 mM được bổ sung vào đó cùng với khuấy và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc tính phản ứng của thành phần liên kết được chất chưa phản ứng trong 20 phút nữa.

Tinh sạch: Bằng cách bổ sung dần dung dịch nước axít axetic 20% (khoảng 1,4 mL) và ABS (280 mL) vào dung dịch trên cùng với khuấy, pH của dung dịch được điều chỉnh đến  $5,5 \pm 0,1$ . Dung dịch này được đem đi lọc vi cỡ ( $0,45 \mu\text{m}$ , màng PVDF) để loại bỏ chất màu hơi trắng trong khi tạo ra khoảng 600 mL dịch lọc. Dung dịch này được đem đi tinh sạch siêu lọc sử dụng thiết bị siêu lọc có màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30 KDa), bơm ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, Pump Head model 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, ống MasterFlex L/S16). Cụ thể, trong khi ABS được bổ sung nhỏ giọt (tổng là 4800 mL) làm dung dịch đậm để tinh sạch vào dung dịch phản ứng, việc tinh sạch siêu lọc được thực hiện để loại bỏ thành phần liên kết được chất chưa liên hợp và các chất phản ứng phân tử lượng thấp khác, cũng thay dung dịch đậm bằng ABS, và cô thêm dung dịch. Dung dịch được tinh sạch thu được được đem đi lọc vi cỡ (hai lần bằng màng PVDF  $0,22 \mu\text{m}$  và  $0,10 \mu\text{m}$ ) để tạo ra 130 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng quy trình chung E ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 21,00 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2730 mg (97,5%), và số phân tử dược chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể: 6,3.

Ví dụ 50. Thể liên hợp kháng thể-dược chất (50)

Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-dược chất (50)

Thể liên hợp kháng thể-dược chất (47), (48), và (49) được tạo ra trong các ví dụ 47, 48, và 49 được trộn (243 mL) và được nạp thêm ABS (39,75 mL) để tạo ra 283 mL dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất nêu trong tiêu đề.

Đặc điểm hóa lý: Bằng cách sử dụng các quy trình chung E và F ( $\epsilon_{D,280} = 5178$ , và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  được sử dụng), thu được các giá trị đặc trưng sau đây.

Nồng độ kháng thể: 20,0 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5655 mg, số phân tử dược chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung E: 6,3, và số phân tử dược chất liên hợp trung bình (n) với mỗi phân tử kháng thể được đo bằng quy trình chung F: 7,8.

Ví dụ đánh giá 1. Tác dụng ức chế sự phát triển tế bào (1) của thể liên hợp kháng thể-

được chất

Dòng ung thư vú của người KPL-4 của các tế bào dương tính với kháng nguyên HER2 (Dr. Junichi Kurebayashi, Kawasaki Medical School, British Journal of Cancer, (1999) 79 (5/6). 707-717) hoặc dòng ung thư vú của người MCF7 của các tế bào âm tính với kháng nguyên (European Collection of Cell Cultures; ECACC) được nuôi cấy trong RPMI1640 (GIBCO) chứa 10% huyết thanh thai bò (MOPEGATE) (sau đây được gọi là môi trường). KPL-4 hoặc MCF7 được điều chế để có nồng độ là  $2,5 \times 10^4$  tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường, được bổ sung ở nồng độ 100  $\mu\text{L}$ /giếng vào vi đĩa 96 giếng để nuôi cấy tế bào, và được nuôi cấy qua đêm.

Vào ngày tiếp theo, trastuzumab hoặc thể liên hợp kháng thể-được chất được pha loãng thành 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM, và 0,064 nM bằng cách sử dụng môi trường được bổ sung ở nồng độ 1  $\mu\text{L}$ /giếng vào vi đĩa. Môi trường được bổ sung ở nồng độ 10  $\mu\text{L}$ /giếng vào các giếng không được bổ sung kháng thể. Các tế bào được nuôi cấy trong 5%  $\text{CO}_2$  ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong từ 5 đến 7 ngày. Sau khi nuôi cấy, vi đĩa được lấy ra khỏi tủ nuôi và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) và được khuấy. Sau khi vi đĩa được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, mật độ phát quang của mỗi giếng được đo bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa (PerkinElmer). Giá trị  $\text{IC}_{50}$  được tính theo phương trình sau:

$$\text{IC}_{50} \text{ (nM)} = \text{đôi logarit} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}(b) - \text{LOG}_{10}(a)) / (d - c) + \text{LOG}_{10}(b))$$

a: Nồng độ mẫu a

b: Nồng độ mẫu b

c: Khả năng sống sót tế bào của mẫu a

d: Khả năng sống sót tế bào của mẫu b

Khả năng sống sót tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo phương trình sau:

$$\text{Khả năng sống sót tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Mật độ phát quang trung bình của các giếng mẫu ( $n = 2$ )

b: Mật độ phát quang trung bình của các giếng không được bổ sung kháng thể ( $n = 10$ )

Thể liên hợp kháng thể-được chất (2), (3), (5), (7), (10), (12), (13), (16), (18),

(40), và (42) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào  $IC_{50} < 0,1$  (nM) đối với các tế bào KPL-4.

Thế liên hợp kháng thể-dược chất (4), (6), (9), (15), (17), (21), (22), (25), (36), (37), (39), (41), và (43) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào  $0,1 < IC_{50} < 1$  (nM) đối với các tế bào.

Thế liên hợp kháng thể-dược chất (20), (24), và (27) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào  $1 < IC_{50} < 100$  (nM) đối với các tế bào. Không thế liên hợp kháng thể-dược chất nào trong số thế liên hợp kháng thể-dược chất (19) hoặc (26) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào đối với các tế bào ( $> 100$  (nM)).

Mặt khác, thế liên hợp kháng thể-dược chất (5), (13), và (43) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào  $1 < IC_{50} < 100$  (nM) đối với các tế bào MCF7, trong khi đó không thế liên hợp kháng thể-dược chất nào trong số các thế liên hợp kháng thể-dược chất (2), (3), (4), (6), (7), (9), (10), (12), (15), (16), (17), (18), (25), (26), (27), (39), (40), (41), (42), và (44) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào đối với các tế bào này ( $> 100$  (nM)).

Trastuzumab không thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào đối với cả tế bào KPL-4 cũng như tế bào MCF7 ( $> 100$  (nM)).

Ví dụ đánh giá 2. Thử nghiệm kháng u (1)

Chuột: Chuột nhắt trụi lông cái, 5 đến 6 tuần tuổi (Charles River Laboratories Japan, Inc.) được cho làm quen với môi trường trong từ 4 đến 7 ngày ở điều kiện SPF trước khi dùng trong thử nghiệm. Các con chuột được cho ăn thức ăn rắn tiệt trùng (FR-2, Furabashi Farms Co., Ltd) và uống nước máy tiệt trùng (được chuẩn bị bằng cách bổ sung 5 đến 15 ppm dung dịch natri hypoclorit).

Phân tích và biểu thức tính: trong tất cả các nghiên cứu, trực lớn và trực nhỏ của khối u được đo hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước cặp số điện tử (CD- 15CX, Mitutoyo Corp.), và thể tích khối u ( $mm^3$ ) được tính. Biểu thức tính như được thể hiện dưới đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{trực lớn (mm)} \times (\text{trực nhỏ (mm)})^2$$

Tất cả các thế liên hợp kháng thể-dược chất và kháng thể được pha loãng bằng nước muối sinh lý (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) và được sử dụng ở thể tích

10 mL/kg qua đường trong tĩnh mạch vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột.

Các tế bào KPL-4 được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý, và  $1,5 \times 10^7$  tế bào được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái (Ngày 0), và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 15. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (27) hoặc kháng thể kháng HER2 trastuzumab (Ví dụ tham khảo 1) đối với nhóm đối chứng được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột ở Ngày 15 và 22. Nhóm không được điều trị được đặt làm nhóm đối chứng.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 3. Việc sử dụng trastuzumab ức chế sự phát triển khối u, trong khi đó việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-độc chất (27) tạo ra tác dụng ức chế khối u lớn hơn. Ở hình vẽ này, trục hoành biểu diễn ngày sau khi cấy khối u, và trục tung biểu diễn thể tích khối u. Ngoài ra, chuột nhận trastuzumab hoặc thể liên hợp kháng thể-độc chất (27) không có các dấu hiệu đáng chú ý như sút cân, cho thấy rằng thể liên hợp kháng thể-độc chất (27) có tính an toàn cao. Trong các ví dụ đánh giá dưới đây về tác dụng kháng u, thử nghiệm được thực hiện bằng quy trình được sử dụng trong ví dụ đánh giá này, trừ khi được quy định khác.

#### Ví dụ đánh giá 3. Thử nghiệm kháng u (2)

Dòng tế bào ung thư dạ dày của người NCI-N87 được mua từ ATCC (American Type Culture Collection) được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý, và  $1 \times 10^7$  tế bào được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái (Ngày 0), và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 7. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (8) hoặc (28), hoặc trastuzumab emtansin (Ví dụ tham khảo 2) được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg và tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 7. Nhóm không được điều trị được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 4. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (8) và (28) được xác nhận là có tác dụng kháng u mạnh với sự thoái biến của khối u tương đương với của trastuzumab emtansin. Ngoài ra, việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-độc chất (8) hoặc (28), hoặc trastuzumab emtansin được thấy là không làm sút cân chuột.

#### Ví dụ đánh giá 4. Thử nghiệm kháng u (3)

Các tế bào dòng ung thư vú của người JIMT-1 được mua từ DSMZ (Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý, và  $3 \times 10^6$  tế bào được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái (Ngày 0), và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 12. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (8), (29), hoặc (30), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 12 và 19. Nhóm sử dụng nước muối sinh lý được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 5. Việc sử dụng trastuzumab hoặc trastuzumab emtansin không ức chế sự phát triển của khối u JIMT-1. Mặt khác, việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-độc chất (8), (29), hoặc (30) ức chế sự phát triển của khối u. Ngoài ra, việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-độc chất (8), (29), hoặc (30), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được thấy là không làm chuột sút cân.

Ví dụ đánh giá 5. Tác dụng ức chế sự phát triển tế bào (2) của thể liên hợp kháng thể-độc chất

Dòng ung thư phổi tế bào không nhỏ của người Calu-3 (ATCC) được nuôi cấy trong Môi trường cần thiết tối thiểu Eagle (GIBCO) chứa 10% huyết thanh thai bò (MOREGATE) (sau đây gọi là môi trường MEM).

Dòng ung thư dạ dày của người NCI-N87 (ATCC) hoặc dòng ung thư dạ dày của người MKN-45 (Health Science Research Resources Bank) được nuôi cấy trong môi trường RPMI1640 (GIBCO) chứa 10% huyết thanh thai bò (sau đây gọi là môi trường RPMI).

Dòng ung thư vú của người MDA-MB-453 (ATCC) hoặc dòng ung thư vú của người MDA-MB-468 (ATCC) được nuôi cấy trong môi trường L-15 Leibovitz (GIBCO) chứa 10% huyết thanh thai bò (sau đây gọi là môi trường Leibovitz).

Trong số 5 kiểu dòng tế bào này, Calu-3, NCI-N87, và MDA-MB-453 là các tế bào dương tính với HER2, và MKN-45 và MDA-MB-468 là các tế bào âm tính với HER2.

Calu-3, NCI-N87, hoặc MKN-45 được điều chế để có nồng độ  $4 \times 10^4$  tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường MEM hoặc môi trường RPMI, được bổ sung ở nồng độ 25  $\mu$ L/giếng vào vi đĩa 96 giếng cho môi trường nuôi cấy tế bào đã được nạp 65  $\mu$ L

môi trường/giếng, và nuôi cấy qua đêm trong 5% CO<sub>2</sub> ở 37°C. Tương tự, MDA-MB-453 hoặc MDA-MB-468 được điều chế để có nồng độ 4 x10<sup>4</sup> tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường Leibovitz, được bổ sung ở nồng độ 25 µL/giếng vào vi đĩa 96 giếng cho môi trường nuôi cấy tế bào đã được nạp 65 µL môi trường/giếng, và nuôi cấy qua đêm ở 37°C không cần đặt nồng độ CO<sub>2</sub>.

Vào ngày tiếp theo, chất thử nghiệm được pha loãng thành 1000 nM, 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1,6 nM, 0,32 nM, và 0,064 nM bằng cách sử dụng môi trường RPMI hoặc môi trường Leibovitz, hoặc môi trường RPMI hoặc môi trường Leibovitz được bổ sung ở nồng độ 10 µL/giếng vào vi đĩa. Các tế bào được nuôi cấy trong 5% CO<sub>2</sub> ở 37°C hoặc ở 37°C mà không cần đặt nồng độ CO<sub>2</sub> trong 6 ngày.

Đối với Calu-3, NCI-N87, và MDA-MB-468, thể liên hợp kháng thể-dược chất (46) được bổ sung làm chất thử nghiệm. Với các tế bào khác, thể liên hợp kháng thể-dược chất (50) được bổ sung làm chất thử nghiệm. Sau khi nuôi cấy, vi đĩa được lấy ra khỏi tủ nuôi và được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) và được khuấy bằng máy khuấy đĩa để dung giải hoàn toàn các tế bào. Sau khi vi đĩa được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, mật độ phát quang được đo bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa.

Khả năng sống sót tế bào được tính theo phương trình sau:

$$\text{Khả năng sống sót tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Mật độ phát quang trung bình của giếng có chất thử nghiệm

b: Mật độ phát quang trung bình của giếng có môi trường

Giá trị IC<sub>50</sub> được tính theo phương trình sau:

$$\text{IC}_{50} \text{ (nM)} = \text{đối logarit}((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}(b) - \text{LOG}_{10}(a)) / (d - c) + \text{LOG}_{10}(b))$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Khả năng sống sót tế bào được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Khả năng sống sót tế bào được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Nồng độ a và b thiết lập quan hệ a > b vượt 50% khả năng sống sót tế bào.

Thế liên hợp kháng thể-được chất (46) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào  $IC_{50} < 1$  (nM) đối với các tế bào Calu-3 và NCI-N87 dương tính với HER2. Mặt khác, thế liên hợp kháng thể-được chất (46) không thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào đối với các tế bào MDA-MB-468 ( $> 100$  (nM)) âm tính với HER2.

Thế liên hợp kháng thể-được chất (50) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào  $IC_{50} < 1$  (nM) đối với các tế bào MDA-MB-453 dương tính với HER2. Mặt khác, thế liên hợp kháng thể-được chất (50) không thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển tế bào đối với các tế bào MKN-45 ( $> 100$  (nM)) âm tính với HER2.

Ví dụ đánh giá 6: Thử nghiệm kháng u (4)

Các tế bào dòng ung thư tuyến tụy của người Capan-1 (ATCC) biểu hiện yếu HER2 được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý, và  $4 \times 10^7$  tế bào được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái để tạo ra khối u rắn Capan-1. Sau đó, khối u rắn này được duy trì ở một vài hành trình bằng cách cấy vào chuột trụi lông cái và được sử dụng trong thử nghiệm này. Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái (Ngày 0), và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 20.

Thế liên hợp kháng thể-được chất (31), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 20. Nhóm sử dụng nước muối sinh lý được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 6. Việc sử dụng trastuzumab hoặc trastuzumab emtansin không ức chế sự phát triển của khối u Capan-1. Ngược lại, việc sử dụng thế liên hợp kháng thể-được chất (31) ức chế sự phát triển của khối u, chứng tỏ rằng thế liên hợp kháng thể-được chất (31) có hiệu quả ngay cả với khối u biểu hiện HER2 ở mức thấp. Thế liên hợp kháng thể-được chất (31) không ức chế sự phát triển của khối u dòng ung thư dạ dày GCIY không biểu hiện HER2.

Đối với sự biểu hiện HER2 ở khối u, trên cơ sở các kết quả đo của phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch được mô tả trong ấn bản thứ ba của sách hướng dẫn thử nghiệm HER2 (được phát triển bởi Japanese Pathology Board for Optimal Use of Trastuzumab, The Japanese Society of Pathology), việc phân loại được thực hiện sao cho điểm bằng 3+: biểu hiện ở mức cao, 2+: biểu hiện ở mức trung bình, và 1+: biểu hiện ở mức thấp. Ngay cả khi điểm bằng 0 trong phương pháp đo này, khối u được



thấy là dương tính với HER2 bằng phương pháp đo khác như phương pháp đo sử dụng máy đo tế bào theo dòng được phân loại ở dạng biểu hiện thấp khối u.

#### Ví dụ đánh giá 7. Thử nghiệm kháng u (5)

Các tế bào dòng ung thư dạ dày của người NCI-N87 được mua từ ATCC được tạo huyền phù nước muối sinh lý, và  $1 \times 10^7$  tế bào được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái (Ngày 0), và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 6. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (50) được sử dụng trong tĩnh mạch ở mỗi liều 0,3, 1, 3, hoặc 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 6. Nhóm sử dụng dung dịch đệm axetat được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 7. Thể liên hợp kháng thể-độc chất (50) thể hiện tác dụng kháng u phụ thuộc liều. Ngoài ra, việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-độc chất (50) được thấy là không làm chuột sút cân.

#### Ví dụ đánh giá 8. Thử nghiệm kháng u (6)

Thử nghiệm này được tiến hành nhờ phương pháp sau đây.

Chuột: chuột nhắt trụi lông cái 6 đến 12 tuần tuổi (Charles River Laboratories Japan, Inc.) được đem đi làm thử nghiệm.

Phân tích và biểu thức tính: trực lớn và trực nhỏ của khối u được đo hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước cặp số điện tử, và thể tích khối u ( $\text{mm}^3$ ) được tính. Biểu thức tính được thể hiện dưới đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 0,52 \times \text{Trực lớn (mm)} \times [\text{Trực nhỏ (mm)}]^2$$

Thể liên hợp kháng thể-độc chất, trastuzumab, và trastuzumab emtansin được pha loãng bằng dung dịch đệm axetat và được sử dụng ở thể tích 10 mL/kg qua đường trong tĩnh mạch vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột.

Khối u (ST225; South Texas Accelerated Research Therapeutics (START)) được cắt ra từ bệnh nhân ung thư vú và được duy trì một vài hành trình bằng cách cấy vào chuột trụi lông cái được sử dụng trong thử nghiệm này. Khối u này biểu hiện HER2 ở mức trung bình (nhận điểm 2+ trong phương pháp nhuộm màu hóa mô miễn dịch).

Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào một bên cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái, và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên khi thể tích

khối u đạt 100 đến 300 mm<sup>3</sup>. Ngày phân nhóm được xác định là Ngày 0. Thử liên hợp kháng thể-được chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg cho tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 0. Nhóm sử dụng dung dịch đệm axetat được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 8. Việc sử dụng trastuzumab không ức chế sự phát triển của khối u ung thư vú ST225 biểu hiện HER2 ở mức trung bình. Ngược lại, việc sử dụng trastuzumab emtansin hoặc thử liên hợp kháng thể-được chất (50) ức chế đáng kể sự phát triển của khối u này.

#### Ví dụ đánh giá 9. Thử nghiệm kháng u (7)

Khối u (ST910; START) được cắt ra từ bệnh nhân ung thư vú và được duy trì ở một vài hành trình bằng cách cấy vào chuột nhắt trụi lông cái được sử dụng trong thử nghiệm này. Khối u này biểu hiện HER2 ở mức thấp (nhận điểm 1+ trong phương pháp nhuộm màu hóa mô miễn dịch).

Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào bên cạnh cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái, và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên khi thể tích khối u đạt 100 đến 300 mm<sup>3</sup>. Ngày phân nhóm được xác định là Ngày 0. Thử liên hợp kháng thể-được chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg cho tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 0. Nhóm sử dụng dung dịch đệm axetat được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 9. Việc sử dụng trastuzumab hoặc trastuzumab emtansin không ức chế sự phát triển của khối u ung thư vú ST910 biểu hiện HER2 ở mức thấp. Ngược lại, việc sử dụng thử liên hợp kháng thể-được chất (50) ức chế đáng kể sự phát triển của khối u, chứng tỏ rằng thử liên hợp kháng thể-được chất (50) có hiệu quả đối với khối u ung thư vú biểu hiện HER2 ở mức thấp. Ví dụ đánh giá 9 này được tiến hành bằng cùng quy trình như ví dụ đánh giá 8.

#### Ví dụ đánh giá 10. Thử nghiệm kháng u (8)

Thử nghiệm này được tiến hành bằng quy trình sau đây. Các ví dụ đánh giá từ 11 đến 13 cũng được tiến hành bằng quy trình này.

Chuột: chuột nhắt trụi lông cái 5 đến 8 tuần tuổi (Harlan Laboratories Ltd.) được đem đi làm thử nghiệm.

Phân tích và biểu thức tính: trục lớn và trục nhỏ của khối u được đo hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước cặp số điện tử, và thể tích khối u ( $\text{mm}^3$ ) được tính. Biểu thức tính như được thể hiện dưới đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 0,52 \times \text{Trục lớn (mm)} \times [\text{Trục nhỏ (mm)}]^2$$

Thế liên hợp kháng thể-được chất, trastuzumab, và trastuzumab emtansin được pha loãng bằng dung dịch đệm axetat và được sử dụng ở thể tích 10 mL/kg qua đường trong tĩnh mạch cho tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột.

Khối u (CTG-0401; Champions Oncology Inc.) được cắt ra từ bệnh nhân ung thư đại trực tràng và được duy trì ở một vài hành trình bằng cách cấy vào chuột nhắt trĩu lông cái được sử dụng trong thử nghiệm này. Khối u này biểu hiện HER2 ở mức thấp hoặc trung bình (nhận điểm 1+ hoặc 2+ trong phương pháp nhuộm màu hóa mô miễn dịch).

Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào bên trái cơ thể của chuột nhắt trĩu lông cái, và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên khi thể tích khối u đạt 100 đến 300  $\text{mm}^3$ . Ngày phân nhóm được xác định là Ngày 0. Thế liên hợp kháng thể-được chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg cho tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 0. Nhóm sử dụng dung dịch đệm axetat được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 10. Việc sử dụng trastuzumab hoặc trastuzumab emtansin không ức chế sự phát triển của khối u ung thư đại trực tràng CTG-0401 biểu hiện HER2 ở mức thấp hoặc trung bình. Ngược lại, việc sử dụng thế liên hợp kháng thể-được chất (50) ức chế đáng kể sự phát triển của khối u này.

Ví dụ đánh giá 11. Thử nghiệm kháng u (9)

Khối u (CTG-0860; Champions Oncology Inc.) được cắt ra từ bệnh nhân ung thư phổi tế bào không nhỏ và được duy trì ở một vài hành trình bằng cách cấy vào chuột nhắt trĩu lông cái được sử dụng trong thử nghiệm này. Khối u này biểu hiện HER2 ở mức trung bình (nhận điểm 2+ trong phương pháp nhuộm màu hóa mô miễn dịch).

Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào bên trái cơ thể của mỗi con chuột nhắt trĩu lông cái, và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên khi thể tích khối u đạt 100 đến 300  $\text{mm}^3$ . Ngày phân nhóm được xác định là Ngày 0. Thế liên hợp

kháng thể-được chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 0. Nhóm sử dụng dung dịch đệm axetat được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 11. Việc sử dụng trastuzumab hoặc trastuzumab emtansin không ức chế sự phát triển của khối u ung thư phổi tế bào không nhỏ CTG-0860 biểu hiện HER2 ở mức trung bình. Ngược lại, việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-được chất (50) ức chế đáng kể sự phát triển của khối u này.

Ví dụ đánh giá 12. Thử nghiệm kháng u (10)

Khối u (CTG-0927; Champions Oncology Inc.) được cắt ra từ bệnh nhân ung thư ống mật và được duy trì ở một vài hành trình bằng cách cấy vào chuột trại lông cái được sử dụng trong thử nghiệm này. Khối u này biểu hiện HER2 ở mức cao (nhận điểm 3+ trong phương pháp nhuộm màu hóa mô miễn dịch).

Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào bên trái cơ thể của mỗi con chuột nhất trại lông cái, và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên khi thể tích khối u đạt 100 đến 300 mm<sup>3</sup>. Ngày phân nhóm được xác định là Ngày 0. Thể liên hợp kháng thể-được chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 0. Nhóm sử dụng dung dịch đệm axetat được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 12. Việc sử dụng trastuzumab không ức chế sự phát triển của khối u ung thư ống mật CTG-0927 biểu hiện HER2 ở mức cao. Ngược lại, việc sử dụng trastuzumab emtansin ức chế sự phát triển của khối u này. Hơn nữa, việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-được chất (50) cũng gây ra sự thoái biến của khối u này.

Ví dụ đánh giá 13. Thử nghiệm kháng u (11)

Khối u (CTG-0137; Champions Oncology Inc.) được cắt ra từ bệnh nhân ung thư thực quản và được duy trì ở một vài hành trình bằng cách cấy vào chuột trại lông cái được sử dụng trong thử nghiệm này. Khối u này biểu hiện HER2 ở mức cao (nhận điểm 3+ trong phương pháp nhuộm màu hóa mô miễn dịch).

Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào bên trái cơ thể của mỗi con chuột nhất trại lông cái, và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên khi thể tích

khối u đạt 100 đến 300 mm<sup>3</sup>. Ngày phân nhóm được xác định là Ngày 0. Thử liên hợp kháng thể-độc chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột, vào Ngày 0. Nhóm sử dụng dung dịch đệm axetat được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 13. Việc sử dụng trastuzumab không ức chế sự phát triển của khối u ung thư thực quản CTG-0137 biểu hiện HER2 ở mức cao. Ngược lại, việc sử dụng trastuzumab emtansin hoặc thử liên hợp kháng thể-độc chất (50) ức chế đáng kể sự phát triển của khối u này.

Ví dụ đánh giá 14. Thử nghiệm kháng u (12)

Các tế bào dòng ung thư buồng trứng của người SK-OV-3 biểu hiện HER2 ở mức cao được mua từ ATCC được tạo huyền phù nước muối sinh lý, và  $4 \times 10^7$  tế bào được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái để thu được khối u rắn SK-OV-3. Sau đó, khối u rắn này được duy trì ở một vài hành trình bằng cách cấy ghép vào chuột nhắt trụi lông cái và được sử dụng trong thử nghiệm này.

Phần khối u của khối u rắn được cấy dưới da vào bên phải cơ thể của mỗi con chuột nhắt trụi lông cái, và các con chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên khi thể tích khối u đạt 100 đến 300 mm<sup>3</sup>. Ngày phân nhóm được xác định là Ngày 0. Thử liên hợp kháng thể-độc chất (50), trastuzumab, hoặc trastuzumab emtansin được sử dụng trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg vào tĩnh mạch đuôi của mỗi con chuột vào Ngày 0. Nhóm sử dụng nước muối sinh lý được đặt làm nhóm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 14. Việc sử dụng trastuzumab không ức chế sự phát triển của khối u SK-OV-3. Ngược lại, việc sử dụng trastuzumab emtansin hoặc thử liên hợp kháng thể-độc chất (50) ức chế đáng kể sự phát triển của khối u này.

Danh mục trình tự

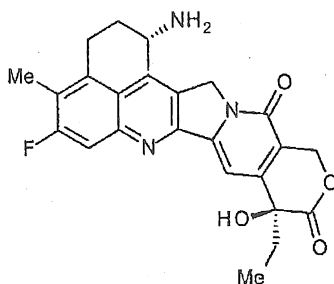
SEQ ID NO: 1 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng kháng HER2 được làm cho tương thích với người

SEQ ID NO: 2 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng kháng HER2 được làm cho tương thích với người

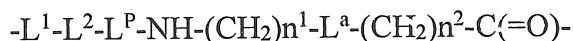
## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể liên hợp kháng thể-độc chất trong đó hợp chất kháng khối u được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 1)



được liên hợp với kháng thể kháng HER thông qua thành phần liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:



thông qua liên kết thioete được tạo thành tại nhóm liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng HER,

trong đó:

kháng thể kháng HER được gắn với đầu của  $L^1$ ,

hợp chất kháng khối u được gắn với nhóm cacbonyl của nhóm  $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$  với nguyên tử nitơ của nhóm amin ở vị trí 1 làm vị trí gắn,

trong đó:

$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6,

$n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5,

$L^1$  là  $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-(CH_2)_{n^3}-C(=O)-$ ,

trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8,

$L^2$  là  $-NH-(CH_2CH_2-O)_{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$  hoặc liên kết đơn,

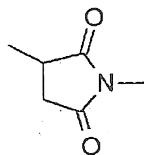
trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 1 đến 6,

$L^P$  là gốc tetrapeptit  $-GGFG-$ ,

$L^a$  là -O- hoặc liên kết đơn, và

-(suxinimit-3-yl-N)- có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

(Công thức 2)



được gắn với kháng thể kháng HER ở vị trí 3 của nó và được gắn với nhóm metylen trong thành phần liên kết cấu trúc chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1.

2. Thẻ liên hợp kháng thể được chất theo điểm 1, trong đó nhóm cấu trúc được chất thành phần liên kết có được chất được gắn với  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$  là một cấu trúc được chất thành phần liên kết được chọn từ nhóm gồm:

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

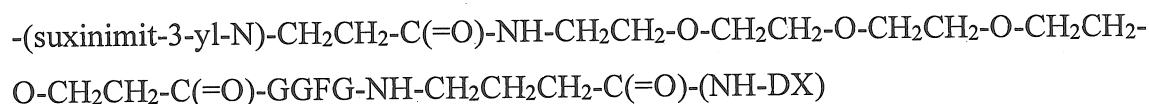
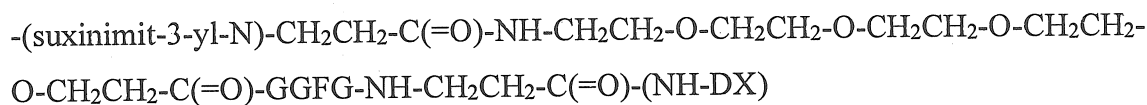
-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-(NH-DX)$

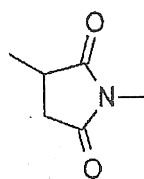
-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-$



trong đó  $\text{-(suxinimit-3-yl-N)-}$  có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

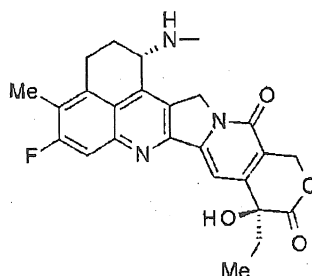
(Công thức 3)



được gắn với kháng thể kháng HER ở vị trí 3 của nó và được gắn với nhóm metylen trong cấu trúc thành phần liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

$\text{-(NH-DX)}$  là nhóm được thể hiện bằng công thức sau:

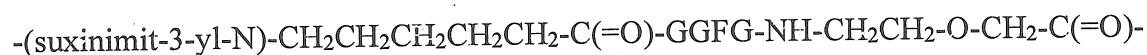
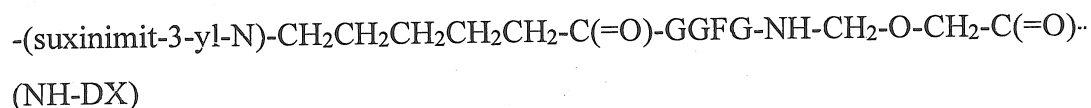
(Công thức 4)



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí gắn, và

$\text{-GGFG-}$  là gốc tetrapeptit  $\text{-Gly-Gly-Phe-Gly-}$ .

3. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 2, trong đó nhóm cấu trúc được chất-thành phần liên kết là một cấu trúc được chất-thành phần liên kết được chọn từ nhóm gồm:





(NH-DX)

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

4. Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết là:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

5. Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết là:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

6. Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm cấu trúc dược chất-thành phần liên kết là:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

7. Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể kháng HER bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin 1 đến 449 được nêu trong SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin 1 đến 214 được nêu trong SEQ ID NO: 2.

8. Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể kháng HER bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

9. Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết đã chọn được liên hợp với mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

10. Thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc dược chất-thành phần liên kết đã chọn được liên hợp với mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

11. Thuốc chứa thẻ liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm

từ 1 đến 10, muối của nó, hoặc hydrat của nó.

12. Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, muối của nó, hoặc hydrat của nó.

13. Dược phẩm chứa thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, muối của nó, hoặc hydrat của nó làm thành phần hoạt tính, và thành phần tạo chế phẩm dược dụng.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited

<120> THẺ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THẺ LIÊN HỢP NÀY

<130> PD20-9008WO

<150> JP2014-017777

<151> 2014-01-31

<150> JP2014-168944

<151> 2014-08-22

<150> JP2014-227886

<151> 2014-11-10

<160> 2

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của Trastuzumab

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của Trastuzumab

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145                    150                    155                    160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                  165                    170                    175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
                  180                    185                    190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
                  195                    200                    205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                  210

**FIG.1**

**SEQ ID NO: 1 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng kháng  
HER2 được làm tương thích với người**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV  
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

## FIG.2

SEQ ID NO: 2 -Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng kháng  
HER2 được làm tương thích với người

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG  
SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY  
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC



FIG.3

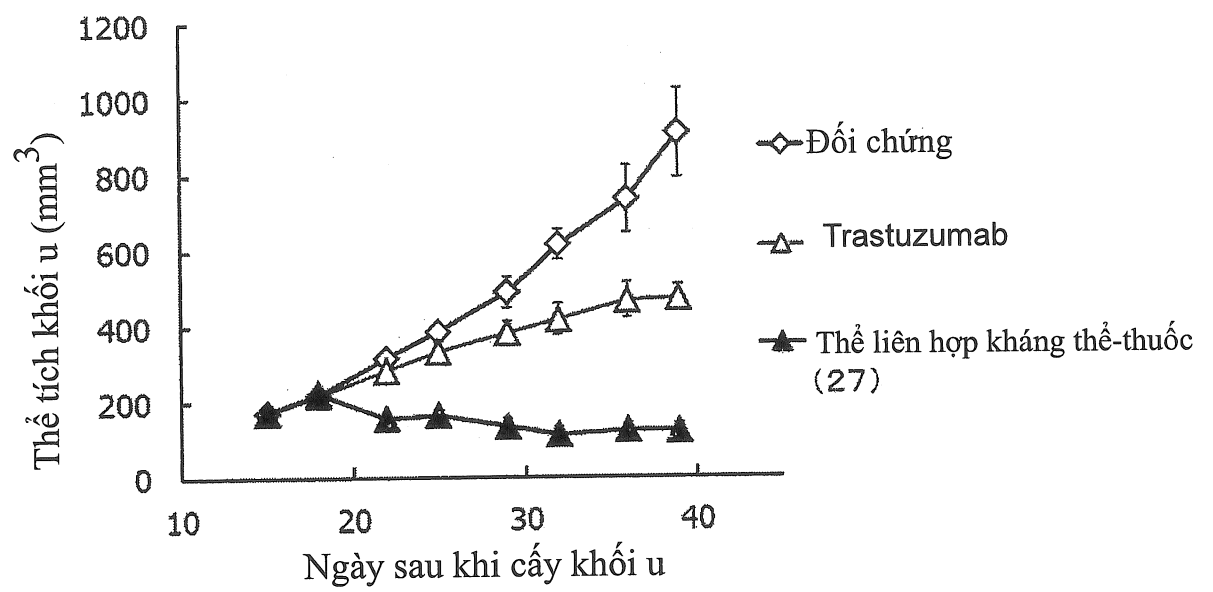


FIG.4

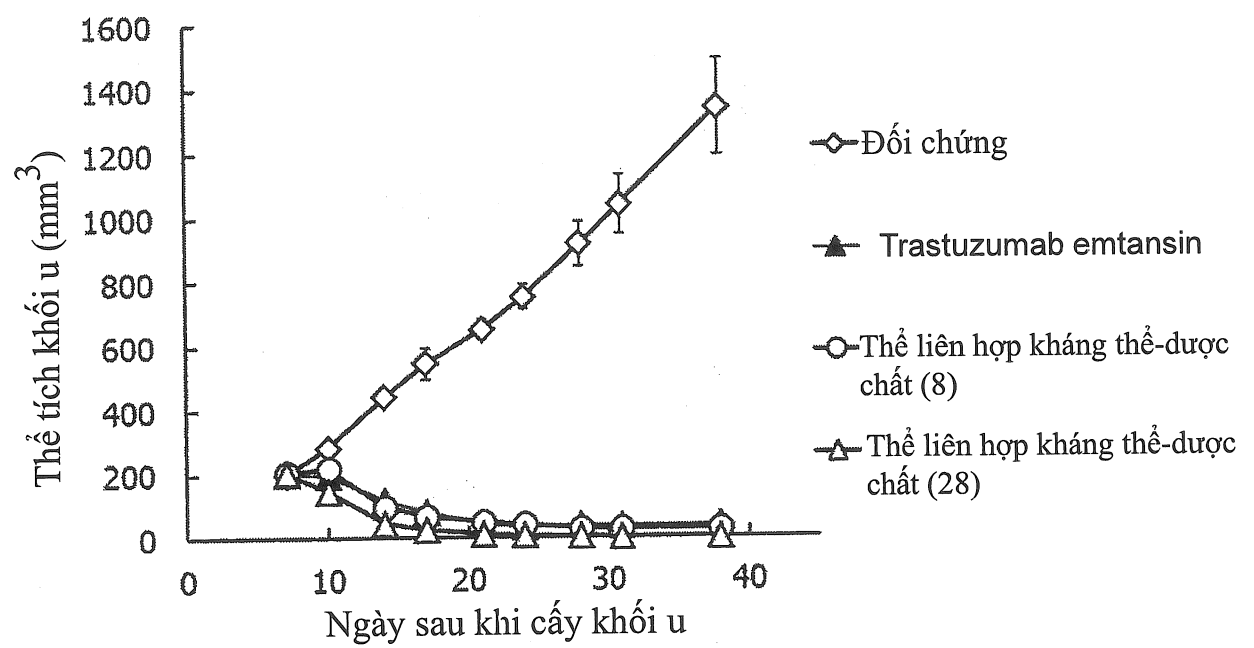


FIG.5

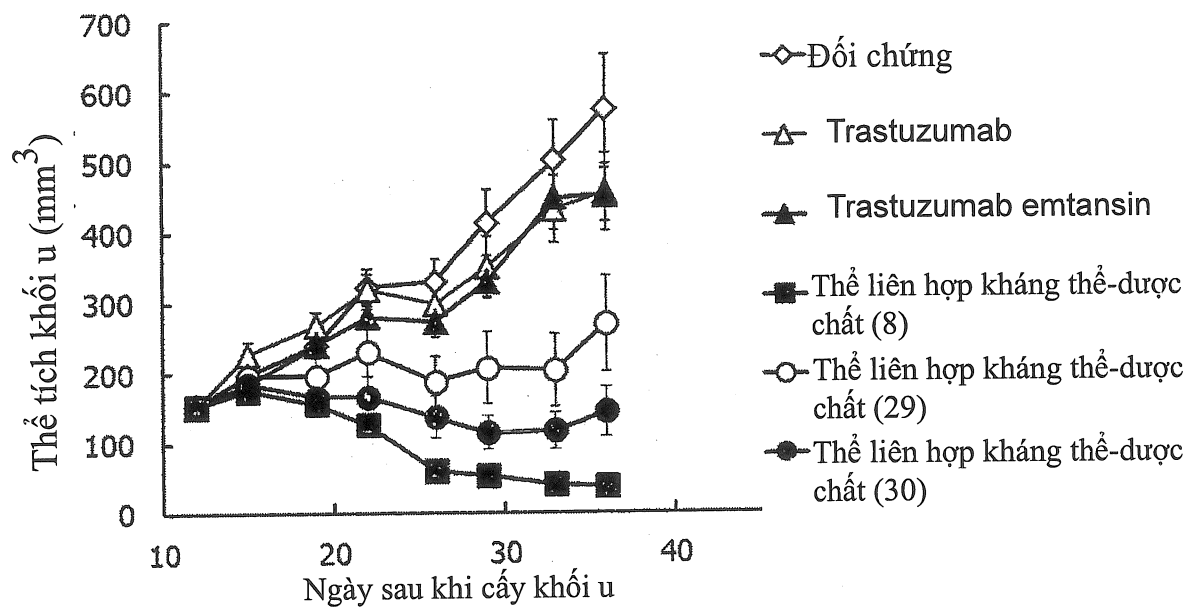


FIG.6

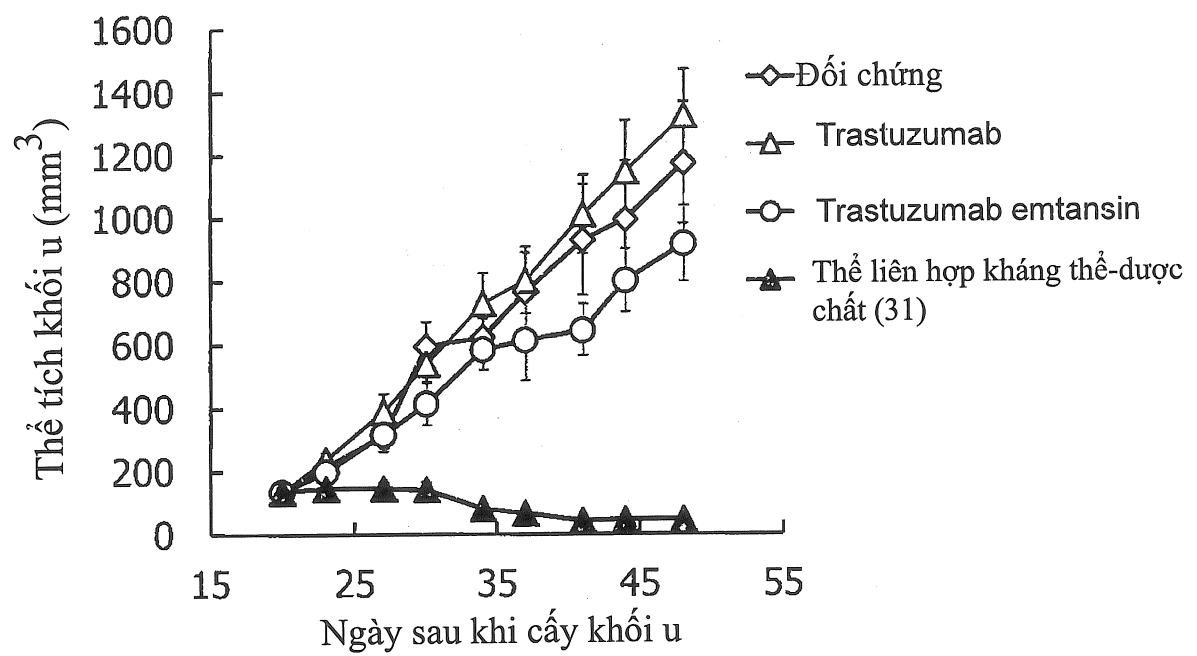


FIG.7

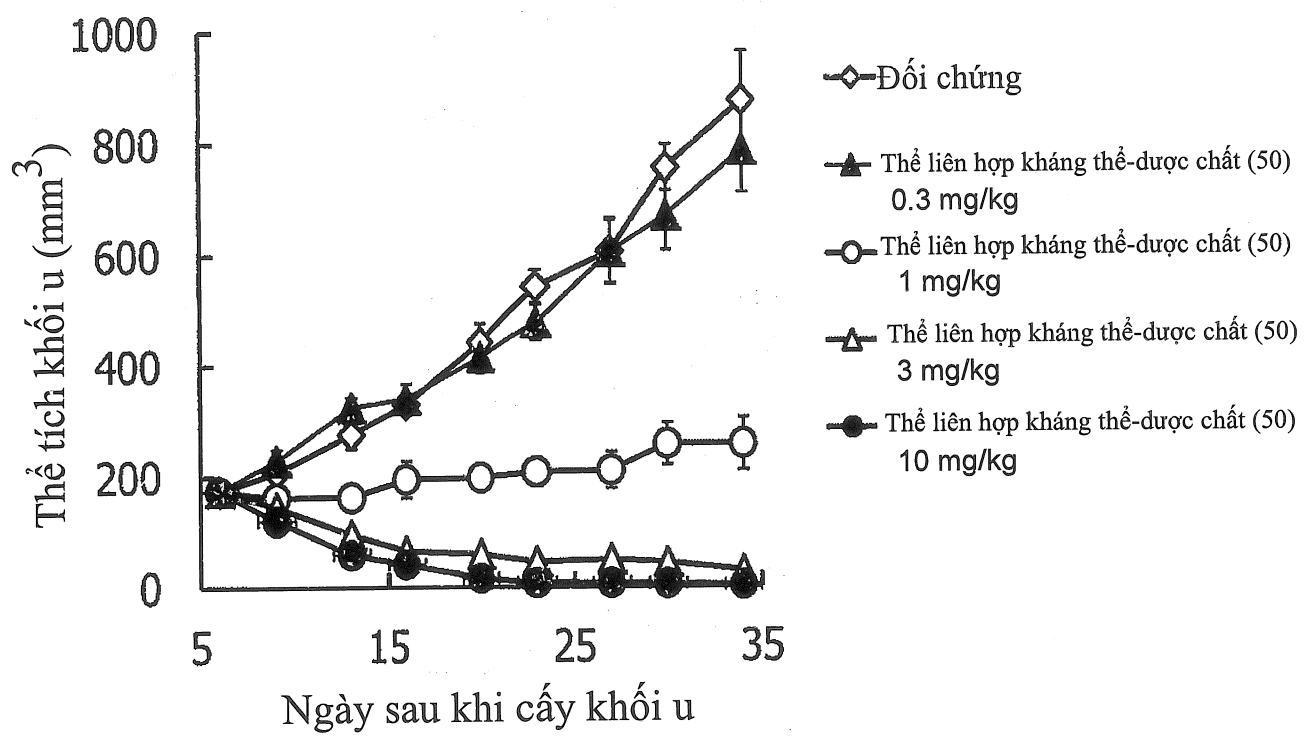


FIG.8

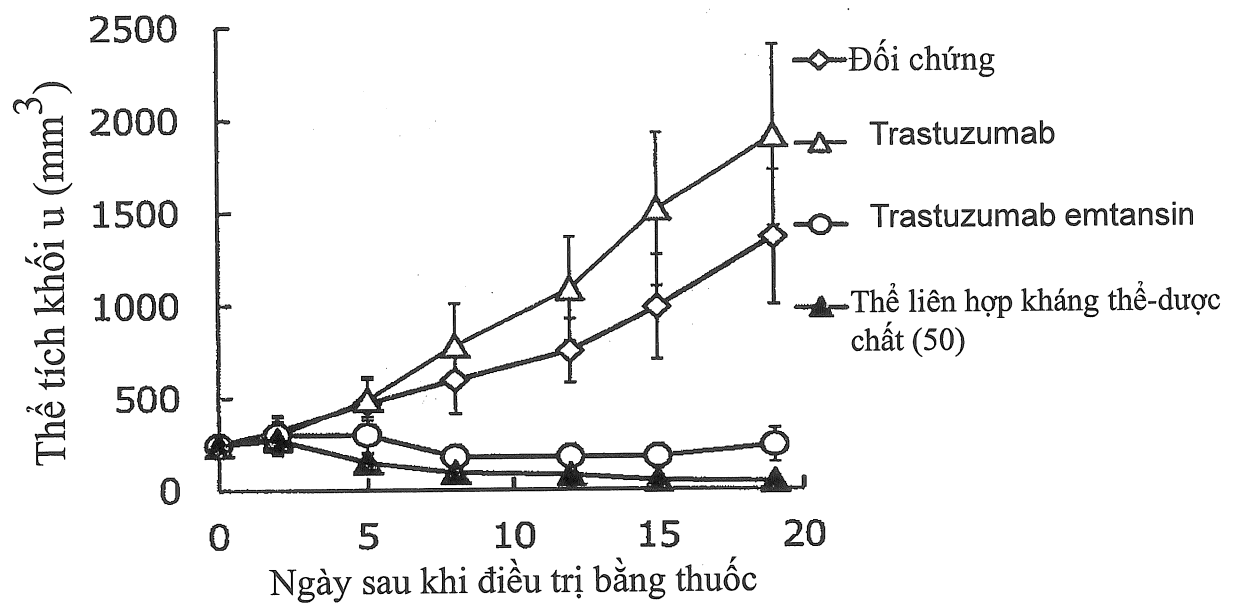


FIG.9

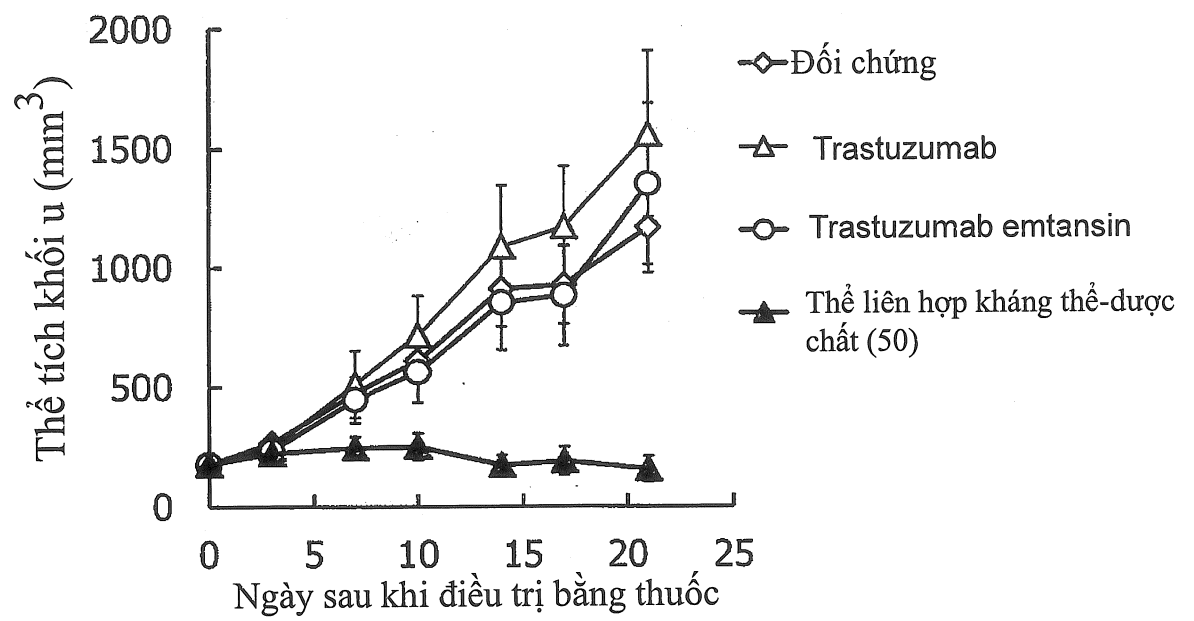


FIG.10

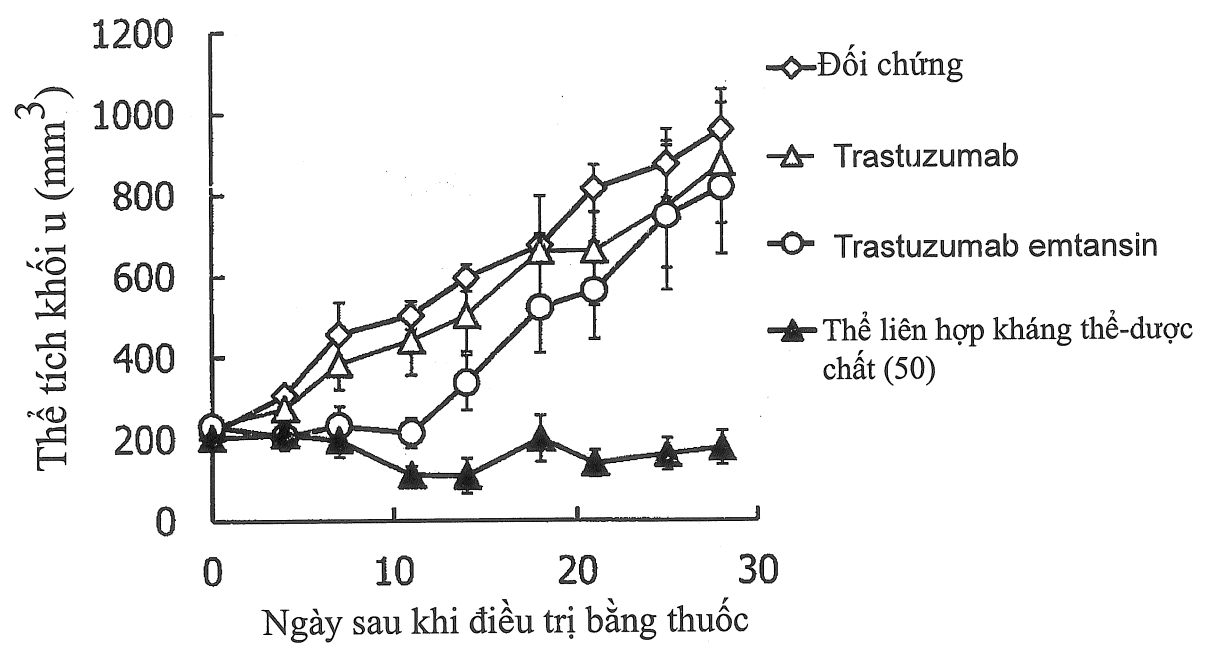




FIG.11

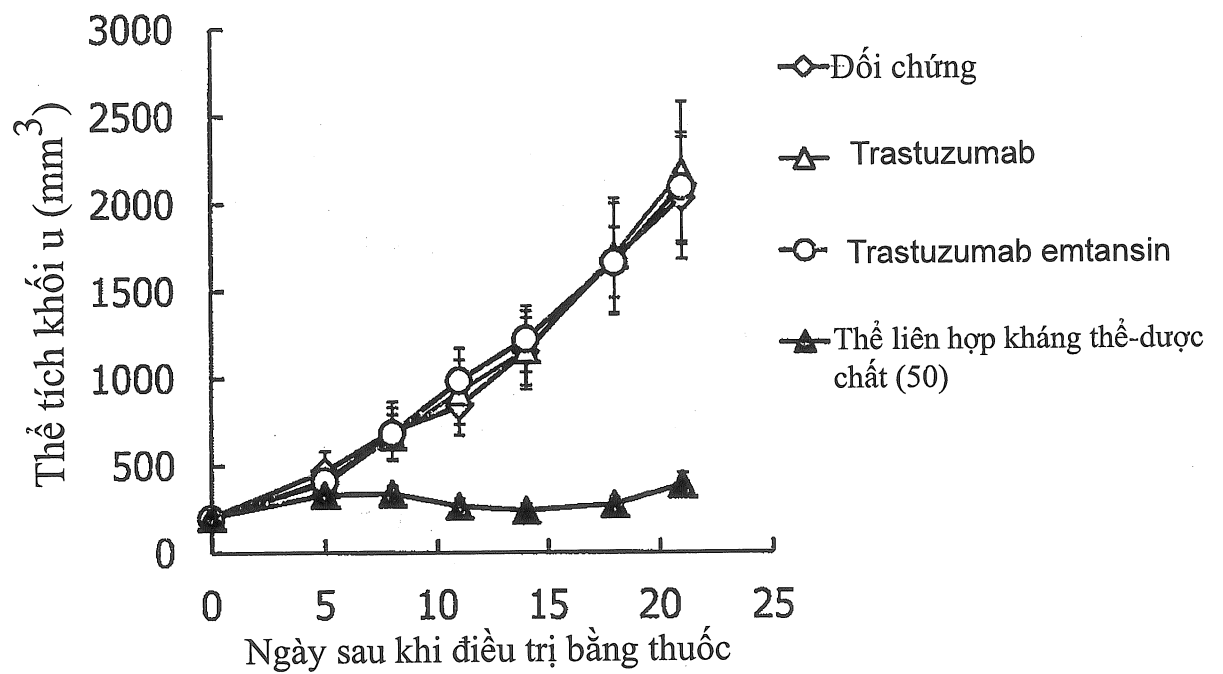


FIG. 12

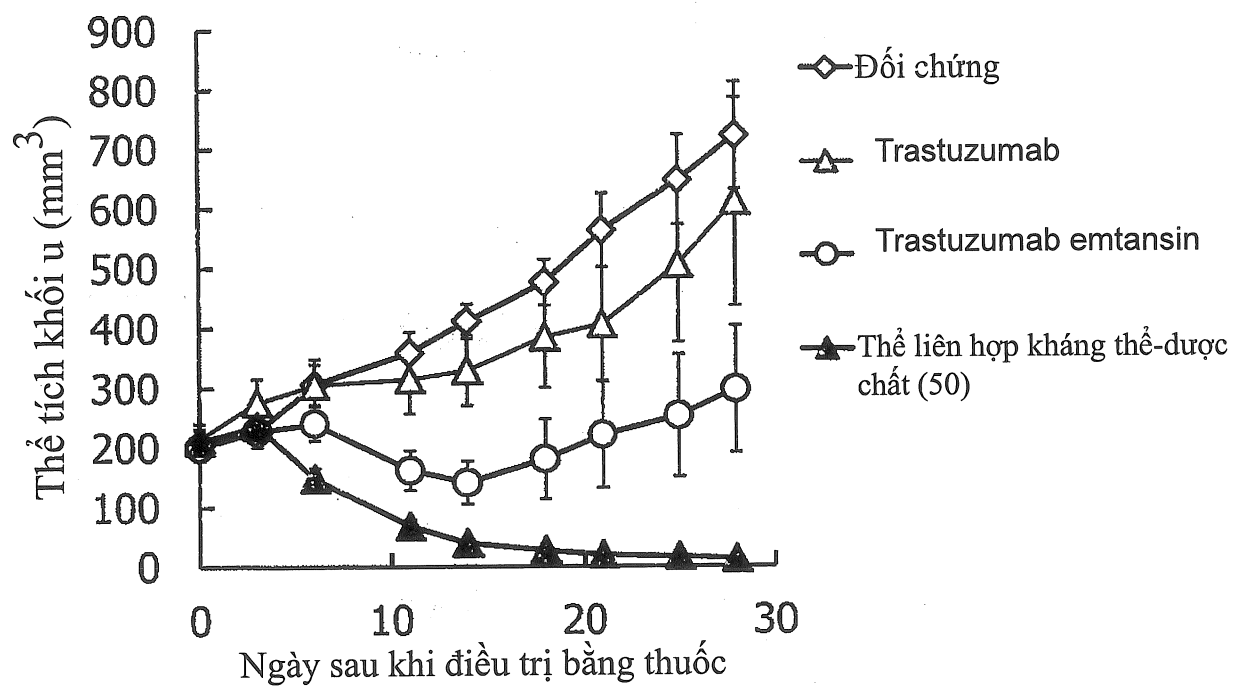


FIG. 13

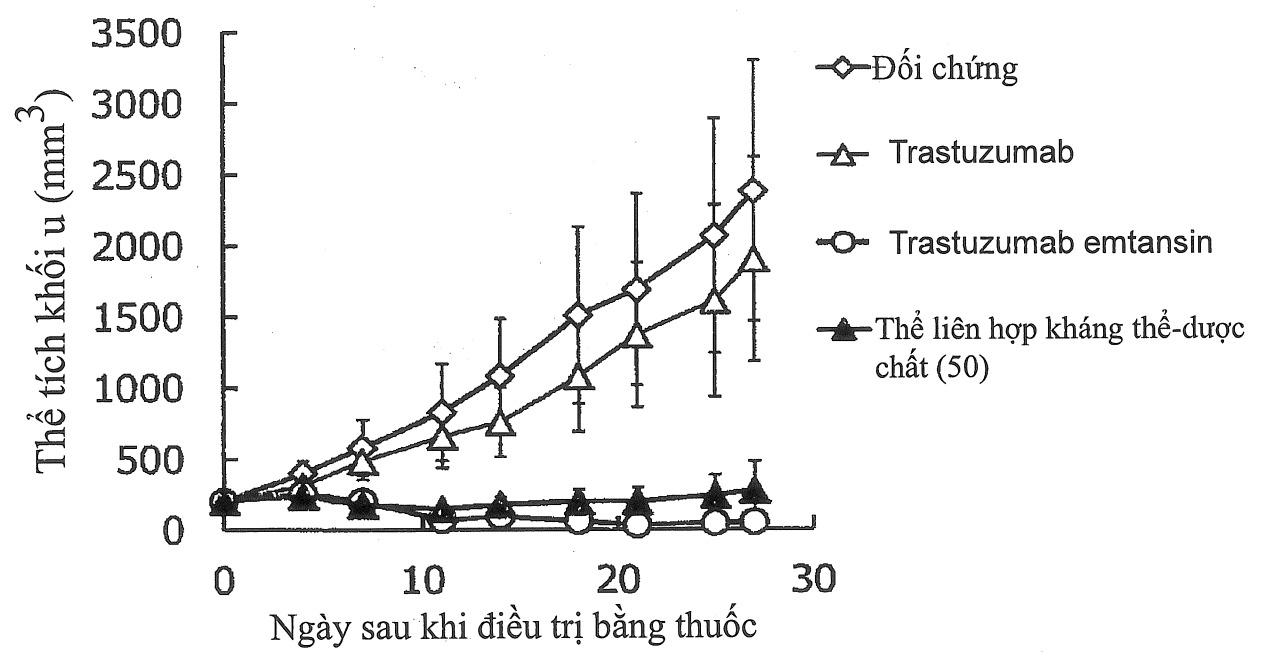


FIG.14

