



(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)



1-0030904

(51)⁷ A61K 47/48; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2016-04455

(22) 27/04/2015

(86) PCT/EP2015/059045 27/04/2015

(87) WO2015/162291 29/10/2015

(30) 14305620.8 25/04/2014 US

(45) 25/01/2022 406

(43) 27/03/2017 348A

(73) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)

45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt, France

(72) RILATT, Ian (GB); PEREZ, Michel (FR); GOETSCH, Liliane (FR); BROUSSAS, Matthieu (FR); BEAU-LARVOR, Charlotte (FR); HAEUW, Jean-François (FR); CHAMPION, Thierry (FR); ROBERT, Alain (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT CÓ KHẢ NĂNG GẮN KẾT VỚI
IGF-1R VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có khả năng gắn kết IGF-1R. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa kháng thể có khả năng gắn kết với IGF-1R, kháng thể này được tiếp hợp với ít nhất một dược chất được chọn từ các dẫn xuất của dolastatin 10 và auristatin. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa thể tiếp hợp này để điều trị ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có khả năng gắn kết với IGF-1R. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa kháng thể có khả năng gắn kết với IGF-1R, kháng thể này được tiếp hợp với ít nhất một dược chất được chọn từ các dẫn xuất của dolastatin 10 và auristatin. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa thể tiếp hợp này để điều trị ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể yếu tố 1 sinh trưởng tương tự insulin (insulin-like growth factor 1 receptor-IGF-1R (hoặc đôi khi được gọi là IGF1R hoặc IGF-IR) là thụ thể có hoạt tính tyrosin kinaza 70% tương đồng với thụ thể insulin (insulin receptor-IR). IGF-1R là glycoprotein có trọng lượng phân tử khoảng 350.000. Nó là thụ thể có cấu trúc bậc bốn dị tương đồng mà mỗi trong số chúng được liên kết một nửa bởi các cầu disulfua gồm có tiểu đơn vị α ngoại bào và tiểu đơn vị β xuyên màng. IGF-1R gắn kết IGF1 và IGF2 với ái lực rất lớn ($K_d \approx 1nM$) nhưng theo cách tương đương có khả năng gắn kết với insulin với ái lực nhỏ hơn, nằm trong khoảng từ 100 đến 1000 lần. Trái lại, IR gắn kết insulin với ái lực rất lớn mặc dù các IGF chỉ gắn kết với thụ thể insulin với ái lực nhỏ hơn 100 lần. Miền tyrosin kinaza nêu trong mục iGF-1R và nêu trong mục iR có mức độ tương đồng về trình tự rất lớn mặc dù các vùng có mức độ tương đồng ít hơn lần lượt liên quan đến vùng giàu xystein được định vị trên tiểu đơn vị α và phần đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β . Sự khác nhau về trình tự quan sát được trong tiểu đơn vị α được định vị trong vùng gắn kết của các phối tử và do đó trên gốc của các ái lực tương đối nêu trong mục iGF-1R và nêu trong mục iR lần lượt đối với IGF và insulin. Sự khác nhau trong phần đầu tận cùng C của tiểu đơn vị β dẫn đến sự phân hướng trong các quá trình phát tín hiệu của hai thụ thể; tác dụng phân chia tế bào, biệt hoá và chống lại sự chết tế bào theo chương trình do IGF-1R gây ra, trong khi sự hoạt hoá nêu trong mục iR chủ yếu liên quan đến các tác dụng ở mức các quá trình chuyển hoá.

Protein tyrosin kinaza tế bào chất được hoạt hoá bằng cách gắn kết phối tử vào miền ngoại bào của thụ thể đến lượt mình. Quá trình hoạt hoá kinaza liên quan đến quá trình kích thích các cơ chất nội bào khác nhau bao gồm IRS-1, IRS-2, Shc và Grb 10.

Hai cơ chất chính nêu trong mục iGF-1R là IRS và Shc mà gây ra, bởi sự kích hoạt của nhiều tác nhân tác động nằm sau, phần lớn các tác động sinh trưởng và biệt hoá liên quan đến sự gắn IGF vào thụ thể này. Do đó, tính khả dụng của các cơ chất có thể gây ra tác động sinh học cuối cùng liên quan đến quá trình kích hoạt IGF-1R. Khi IRS-1 chiếm ưu thế, tế bào có xu hướng tăng sinh và biến nạp. Khi Shc chiếm ưu thế, tế bào có xu hướng biệt hoá. Dường như quá trình chủ yếu liên quan đến các tác dụng bảo vệ chống lại sự chết tế bào theo chương trình là quá trình phosphatidyl-inositol 3-kinaza (PI 3-kinaza).

Vai trò của hệ IGF trong quá trình gây ung thư đã trở thành đối tượng của nghiên cứu sâu rộng trong mười năm qua. Vai trò này tiếp tục thấy được sau khi phát hiện ra rằng ngoài các tính chất phân chia tế bào và chống lại sự chết tế bào theo chương trình, IGF-1R dường như là cần để thiết lập và duy trì kiểu hình được biến nạp. Trong thực tế, đã thiết lập được rằng sự biểu hiện quá mức hoặc sự hoạt hoá cơ định nêu trong mục iGF-1R, trong rất nhiều tế bào, dẫn đến sự sinh trưởng tế bào độc lập với lớp nền trong môi trường không chứa huyết thanh bào thai bò và sự hình thành khối u ở chuột trụi lông. Chính điều này không phải là tính chất duy nhất do rất nhiều sản phẩm của gen được biểu hiện quá mức có thể biến nạp tế bào, bao gồm nhiều thụ thể của yếu tố sinh trưởng. Tuy nhiên, sự phát hiện quan trọng mà đã chứng minh rõ ràng IGF-1R đóng vai trò chính trong quá trình biến nạp đã chứng minh rằng các tế bào IGF-1R⁺, trong đó gen mã hoá IGF-1R đã được làm bất hoạt, là hoàn toàn trợ với sự biến nạp bởi các tác nhân khác nhau mà thường có khả năng biến nạp tế bào, như protein E5 của virus gây u nhú ở bò, sự biểu hiện quá mức của EGFR hoặc PDGFR, kháng nguyên T của SV40, ras hoạt hoá hoặc tổ hợp của hai yếu tố nêu cuối cùng này.

IGF-1R được biểu hiện trong rất nhiều khối u và dòng khối u và các IGF tăng cường quá trình sinh trưởng khối u thông qua việc gắn của chúng vào IGF-1R. Các lập luận khác có lợi cho vai trò nêu trong mục iGF-1R trong quá trình gây ung thư thu được từ các nghiên cứu bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng của chuột được định hướng kháng thụ thể hoặc sử dụng các tính trội âm nêu trong mục iGF-1R. Thực tế, các kháng thể đơn dòng của chuột được định hướng kháng IGF-1R ức chế quá trình tăng sinh của nhiều dòng tế bào trong môi trường nuôi cấy và sinh trưởng tế bào khối u *in vivo*. Cũng đã thấy rằng tính trội âm nêu trong mục iGF-1R có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u.

Nhiều dự án đã được bắt đầu gây phát triển các kháng thể IGF-1R trần dùng để điều trị ung thư. Tuy nhiên, cho đến nay, không có dự án nào trong số các dự án này là thành công và không có các kháng thể kháng IGF-1R nào có bán trên thị trường.

Hơn nữa, một loạt thử nghiệm lâm sàng liên quan đến các kháng thể kháng IGF-1R kết hợp với kháng thể kháng EGFR để hướng đích cả EGFR và IGF-1R, bị thất bại do không có kháng thể nào trong số các kháng thể này có khả năng điều trị người bệnh có đột biến KRAS.

Do đó, bây giờ IGF-1R không được xem là đích chính và trong nghiên cứu các kháng thể điều trị tiềm năng, IGF-1R không được xem xét nhiều hơn như mối quan tâm cụ thể.

Tuy nhiên, cần phải lưu ý rằng các nỗ lực tạo ra các kháng thể IGF-1R được tập chung vào các kháng thể trần, nghĩa là các kháng thể hữu ích nhờ các đặc tính nội tại của chúng. Trong trường hợp này, IGF-1R được xem là đích không thích hợp để tạo ra ADC như thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (được viết tắt là “ADC”) khi IGF-1R được mô tả là đích cũng được biểu hiện rộng rãi bởi các tế bào bình thường, kể cả tế bào mạch máu. Trong trường hợp này, cần phải lưu ý rằng kháng thể IGF-1R gần đây nhất, nghĩa là AVE1642, được phát triển như kháng thể trần không tạo nhánh với dược chất. Nó tương tự với các kháng thể IGF-1R khác gần đây đang phát triển và với tất cả các kháng thể bị thất bại trong các nghiên cứu lâm sàng.

Trong tình huống này, sáng chế đề cập đến ADC hoặc thể tiếp hợp và sử dụng nó để điều trị ung thư và cụ thể hơn là ung thư biểu hiện IGF-1R.

Các ADC kết hợp tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể với tính hiệu nghiệm của dược chất như, ví dụ, các tác nhân độc tế bào. Kỹ thuật này liên quan đến việc phát triển các kháng thể đơn dòng, sử dụng các dược chất hữu hiệu hơn và tạo ra phần tử liên kết hoá học để gắn kết cộng hoá trị các thành phần này, đã tiến triển một cách nhanh chóng trong những năm gần đây.

Việc sử dụng các ADC cho phép phân phối cục bộ các dược chất mà, nếu được dùng làm dược chất không được tiếp hợp, có thể dẫn đến mức độ độc không chấp nhận được cho các tế bào bình thường.

Nói cách khác, hiệu quả tối đa với độ độc tối thiểu được tìm kiếm theo cách đó. Các nỗ lực để tạo ra và làm sạch ADC đã tập trung vào tính chọn lọc của kháng thể cũng như cơ chế hoạt động của dược chất, các đặc tính liên kết dược chất, tỷ lệ dược chất/kháng thể (lượng hoặc DAR) và đặc tính giải phóng dược chất. Các gốc dược chất có thể tạo ra các tác dụng độc và độc tế bào của chúng theo các cơ chế bao gồm cơ chế gắn kết tubulin, gắn kết ADN, proteasom, suy giảm chức năng ribosom, tổng hợp protein và/hoặc ức chế topoisomeraza. Một số dược chất độc tế bào có xu hướng bất hoạt hoặc hoạt hoá ít hơn khi được tiếp hợp với kháng thể lớn.

Mỗi kháng thể phải được xác định đặc tính theo cách riêng, phần tử liên kết thích hợp được tạo ra và tác nhân độc tế bào thích hợp được nhận dạng mà vẫn giữ lại tính hiệu nghiệm của nó khi phân phối cho tế bào của khối u. Cần phải xem xét mật độ kháng thể trên đích ung thư và nếu các khối u bình thường biểu hiện kháng nguyên đích. Các xem xét khác bao gồm việc xem toàn bộ ADC có được nội bào hoá khi gắn kết đích hay không; xem dược chất độc hoặc độc tế bào được ưu tiên khi xem xét khả năng tiếp xúc với mô bình thường và/hoặc loại và giai đoạn ung thư cần được điều trị; và, xem phần tử liên kết có kết nối kháng thể với lượng dược chất có thể phân cắt được hay không thể phân cắt được. Hơn thế nữa, tỷ lệ tiếp hợp kháng thể với gốc dược chất phải đủ mà không gây hại cho hoạt tính gắn kết của kháng thể và/hoặc tính hiệu nghiệm của dược chất và mà không làm thay đổi các tính chất hoá lý của ADC tạo ra sự kết tụ hoặc tính chất gây hại liên quan đến quy trình phát triển hợp chất này trong tương lai.

ADC là phân tử sinh học phức và vẫn có thách thức đáng kể để phát triển ADC hữu hiệu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm mục đích khắc phục các nhược điểm nêu trên và liên quan đến ADC có công thức (I) sau:



hoặc muối dược dụng của nó,

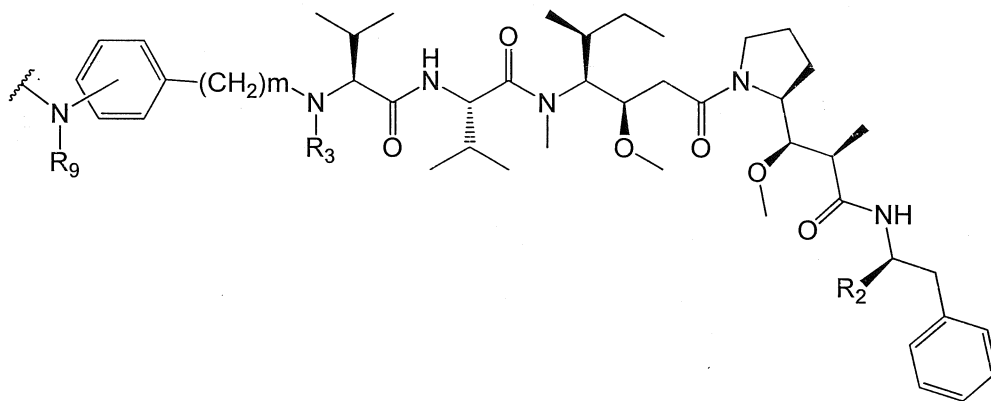
trong đó

Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có khả năng gắn kết với IGF-1R của người được chọn từ:

- i) kháng thể mà chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6;
- ii) kháng thể mà cạnh tranh để gắn kết IGF-1R với kháng thể nêu trong mục i); và
- iii) kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop nêu trong mục iGF-1R như kháng thể nêu trong mục i);

L là phần tử liên kết;

D là gốc dược chất có công thức (II) sau:



(II)

trong đó:

R_2 là COOH , COOCH_3 hoặc thiazolyl;

R_3 là H hoặc $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$;

R_9 là H hoặc $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$;

m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8;

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào **L**; và

n nằm trong khoảng từ 1 đến 12.

Một phương án của sáng chế đề cập đến ADC trong đó **Ab** được chọn từ:

- a) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11;

- b) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.10, 5 và 11;
- c) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12; và
- d) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.8, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11.

Một phương án của sáng chế đề cập đến ADC trong đó **Ab** được chọn từ:

- a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.13 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11;
- b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.14 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.10, 5 và 11;
- c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.15 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12;
- d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.16 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11; và
- e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.17 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12.

Một phương án của sáng chế đề cập đến ADC trong đó **Ab** được chọn từ:

- a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.18 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;
- b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.19 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;
- c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.20 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;
- d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.21 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.8, 2 và 3; và
- e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.22 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến ADC trong đó **Ab** được chọn từ:

- i) các kháng thể 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 và 213B10;
- ii) các kháng thể mà cạnh tranh để gắn kết IGF-1R với các kháng thể nêu trong mục i); và
- iii) các kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop nêu trong mục iGF-1R như các kháng thể nêu trong mục i).

Một phương án của sáng chế đề cập đến ADC trong đó **Ab** là kháng thể được làm giống như của người.

Một phương án của sáng chế đề cập đến ADC trong đó **Ab** được chọn từ kháng thể chứa:

- a) chuỗi nặng có CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và FR1, FR2 và FR3 thu được từ IGHV1-46*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.46), và FR4 thu được từ IGHJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.48); và
- b) chuỗi nhẹ có CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11 và FR1, FR2 và FR3 thu được từ IGKV1-39*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.47) và FR4 thu được từ IGKJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.49).

Theo một phương án của sáng chế, **Ab** được chọn từ:

- a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.33 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.33 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11; và
- b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.34 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.34 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11.

Theo một phương án của sáng chế, **Ab** được chọn từ:

- a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.35 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.35 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3; và

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.36 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.36 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3.

Theo một phương án của sáng chế, **Ab** được chọn từ:

a) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.37 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.37 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.39 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.39; và

b) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.38 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.38 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.40 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.40.

Theo một phương án của sáng chế, **Ab** được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80; và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.57 và 60 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60; và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3; và

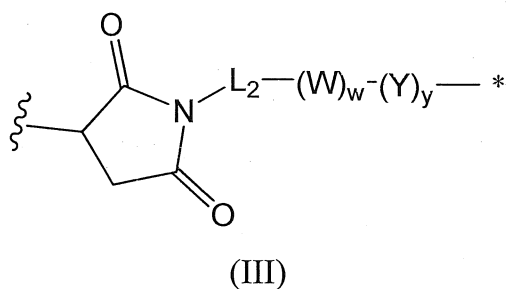
c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80; và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60.

Theo một phương án của sáng chế, **Ab** được chọn từ:

a) chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 và 81 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 hoặc 81; và

b) chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.59 và 61 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc 61.

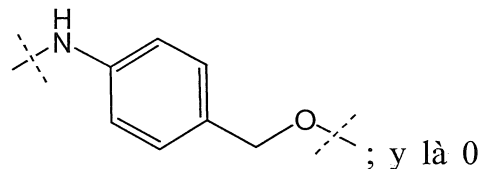
Theo một phương án, sáng chế đề cập đến ADC trong đó **L** là phần tử liên kết có công thức (III) sau:



trong đó

L_2 là (C_4-C_{10}) cycloalkyl-carbonyl, (C_2-C_6) alkyl hoặc (C_2-C_6) alkyl-carbonyl;

W là đơn vị axit amin; w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 5;

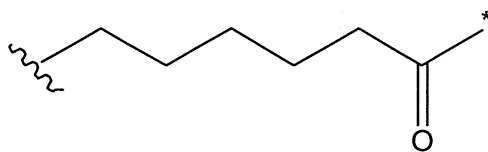


Y là PAB-carbonyl với PAB có công thức hoặc 1;

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào **D**; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào **Ab**.

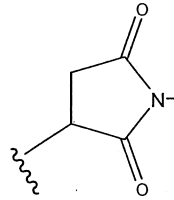
Một phương án của sáng chế đề cập đến ADC trong đó L_2 có công thức sau:



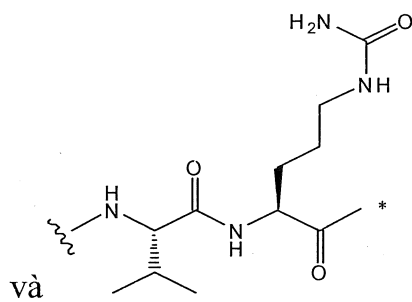
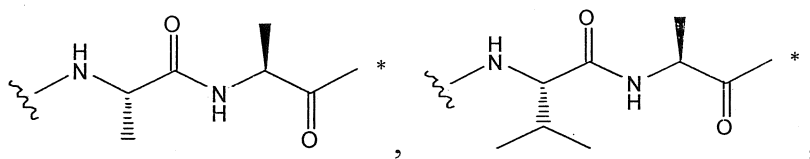
trong đó

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào $(W)_w$; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào nguyên tử nitơ của gốc maleimide có công thức:



Theo một phương án của sáng chế, $w = 0$ hoặc $w = 2$ và sau đó $(W)_w$ được chọn từ: phần tử có công thức:



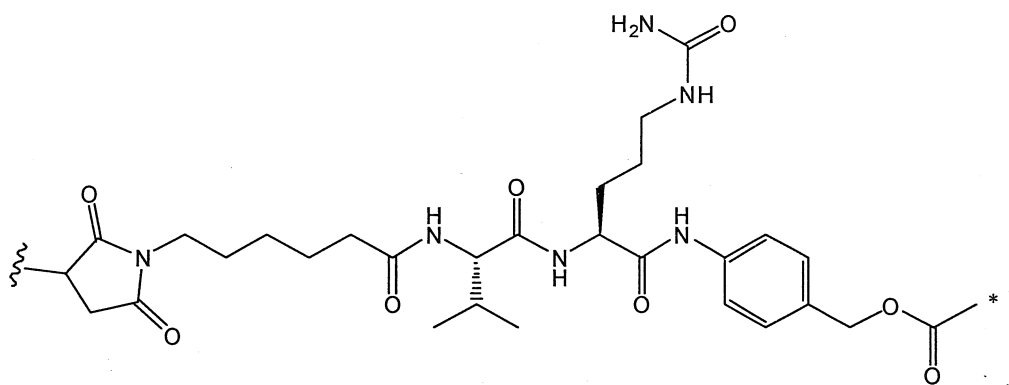
trong đó

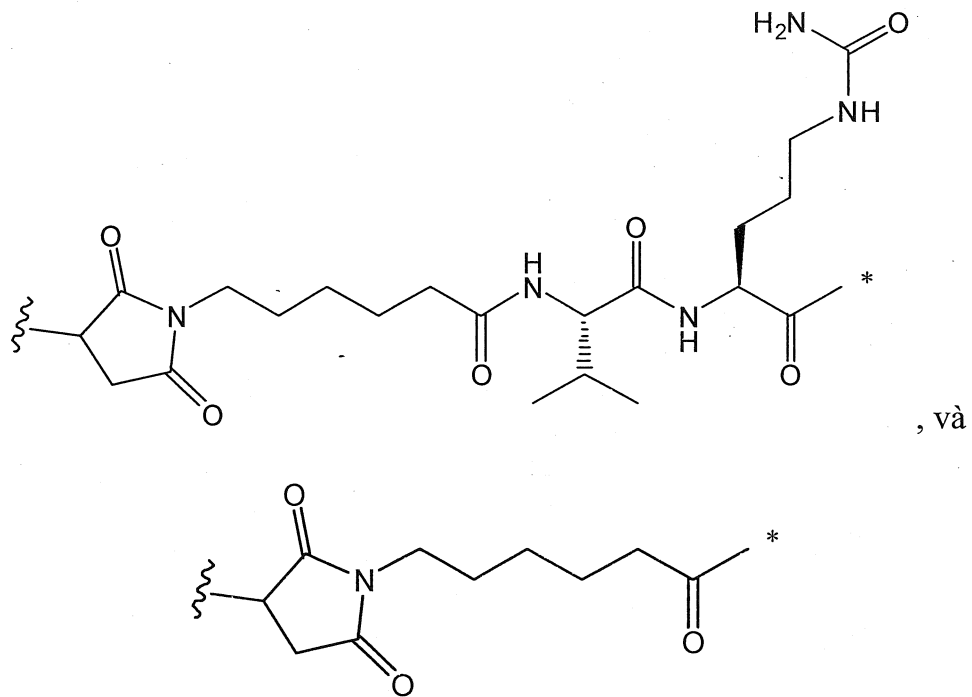
dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào $(Y)_y$; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào L_2 .

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó L được chọn từ:

phần tử có công thức:

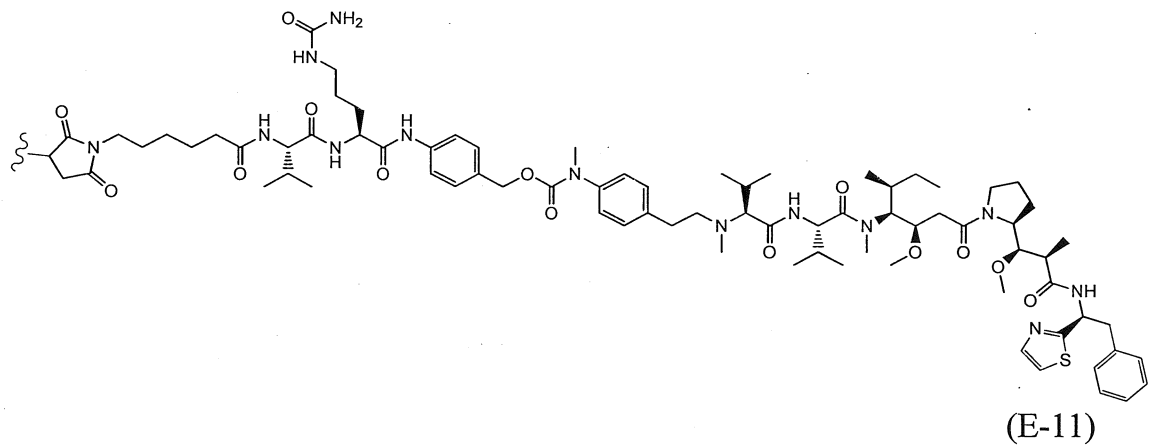




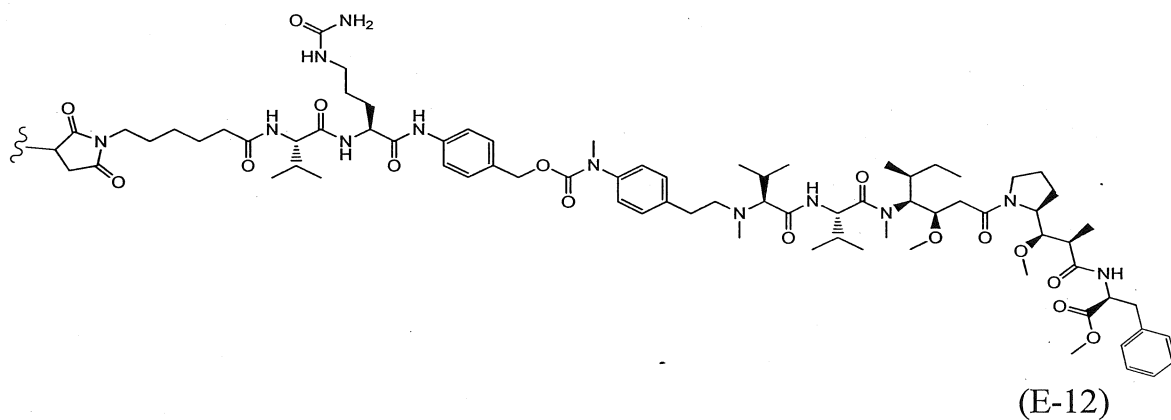
trong đó dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào **D** và đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào **Ab**.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó **(L-D)** được chọn từ:

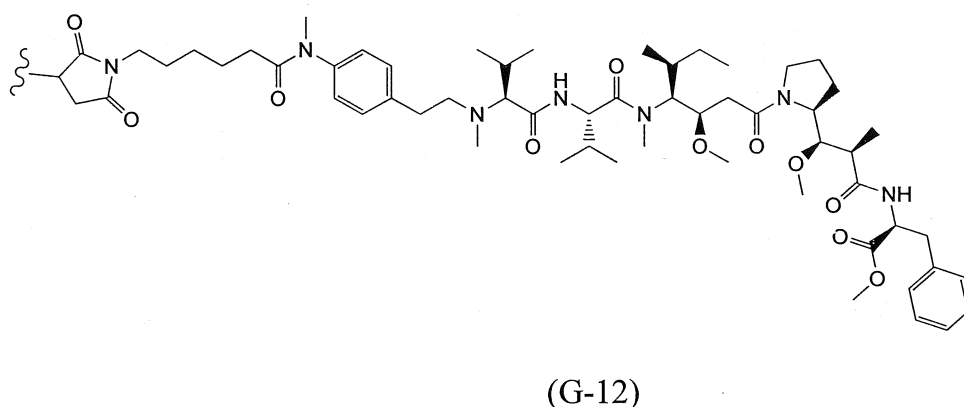
phần tử có công thức:



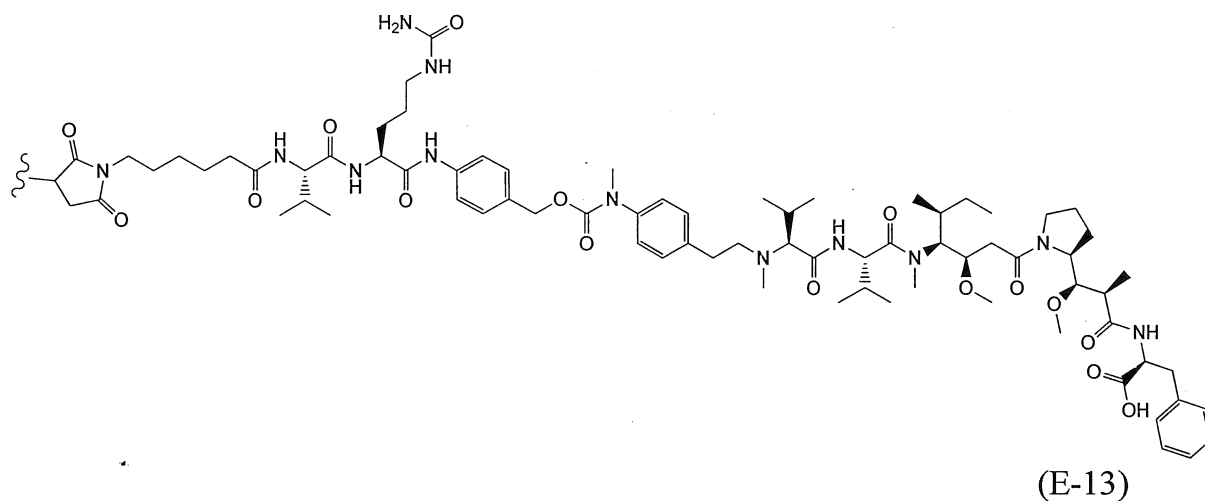
phần tử có công thức:



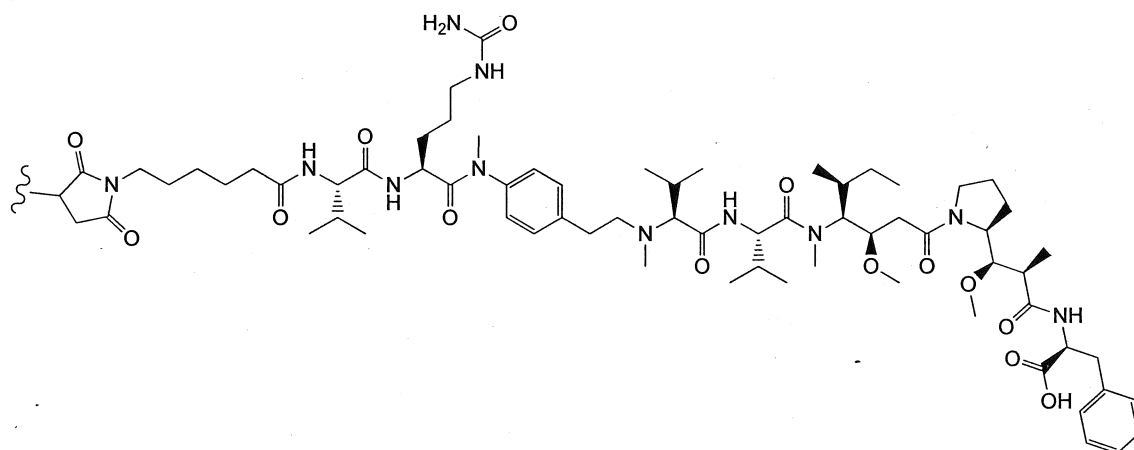
phần tử có công thức:



phần tử có công thức:

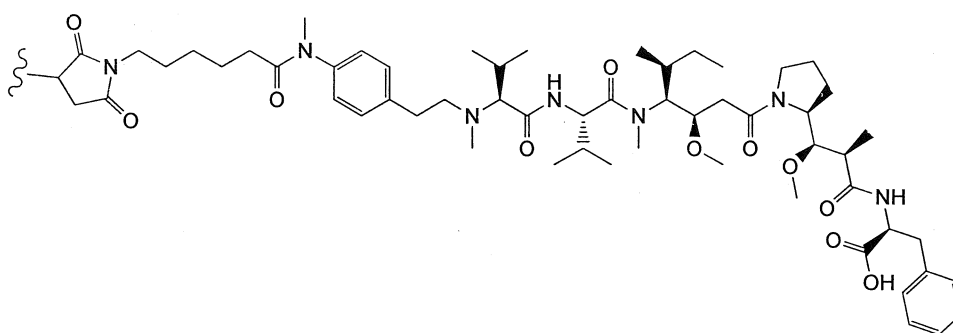


phần tử có công thức:



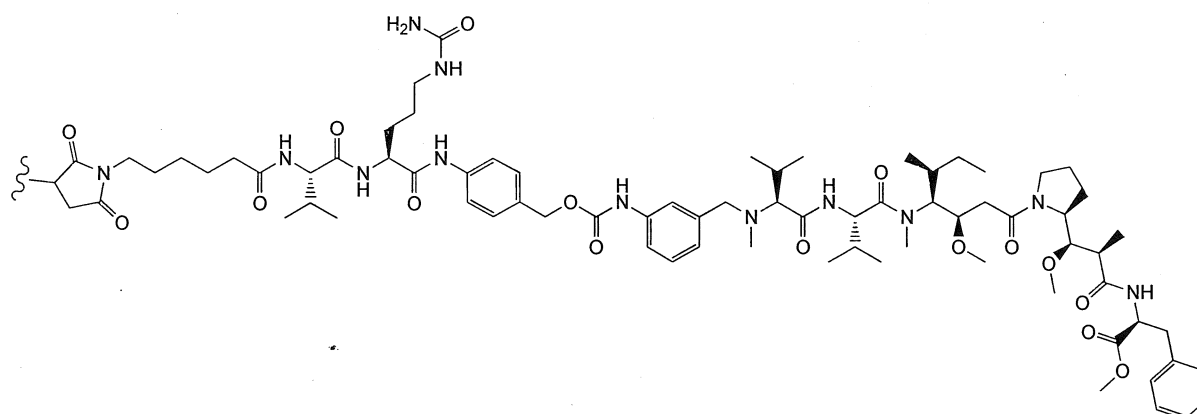
(F-13)

phần tử có công thức:



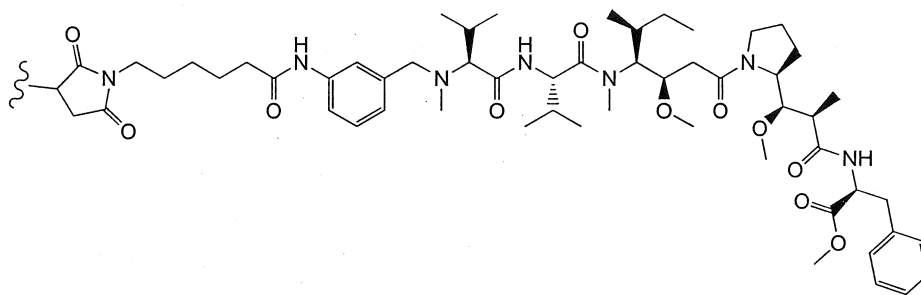
(G-13)

phần tử có công thức:



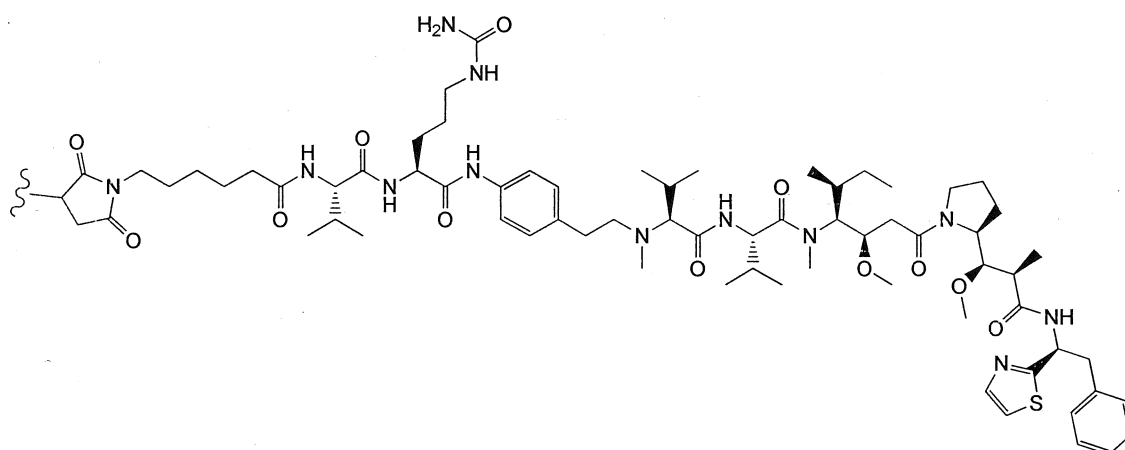
(E-15)

phần tử có công thức:



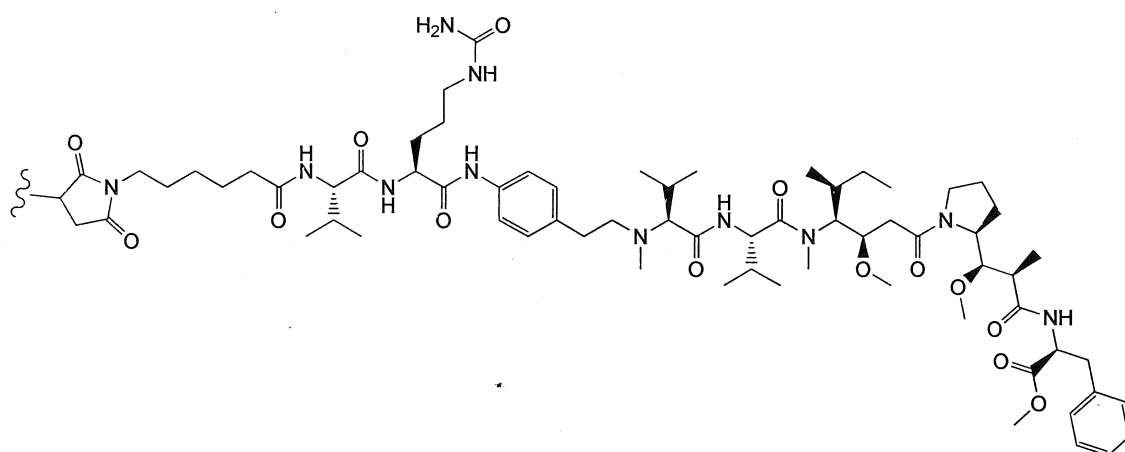
(G-15)

phần tử có công thức:



(F-61)

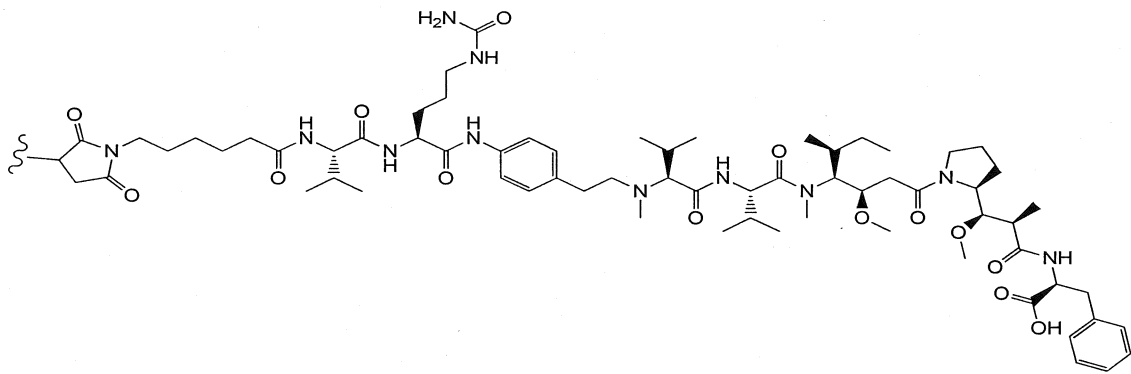
phần tử có công thức:



(F-62)

và

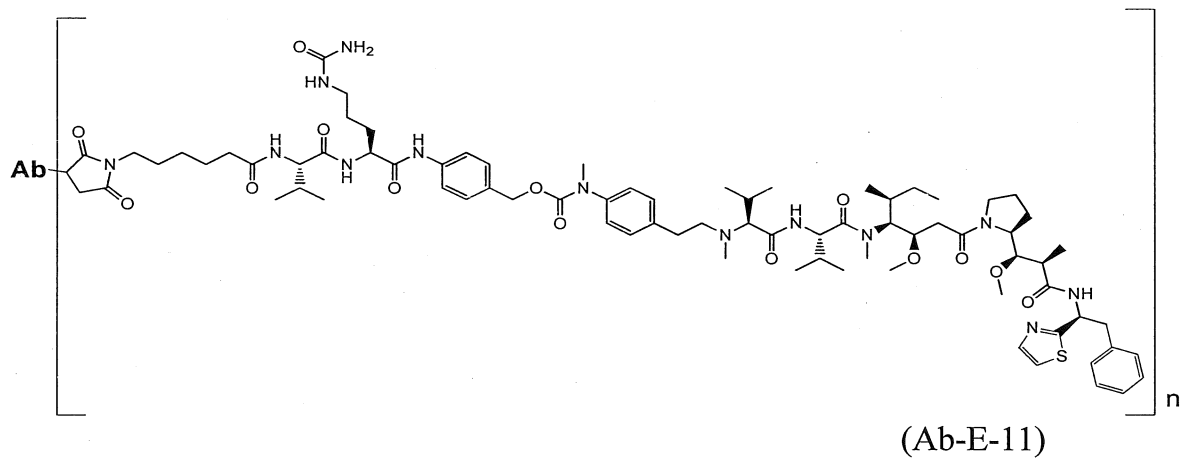
phần tử có công thức:



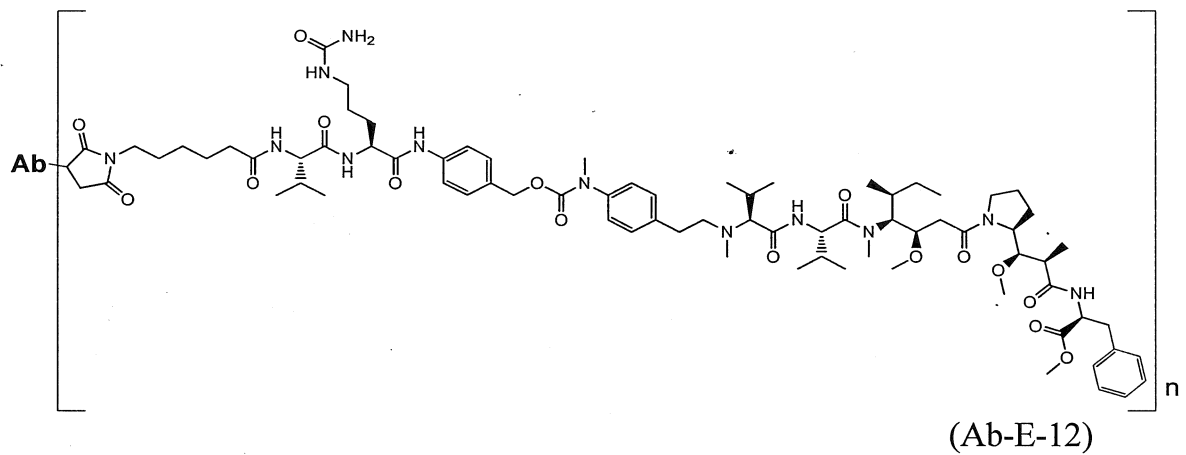
(F-63)

trong đó đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào **Ab**.

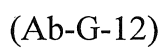
Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC có công thức được chọn từ:
phần tử có công thức:



phần tử có công thức:



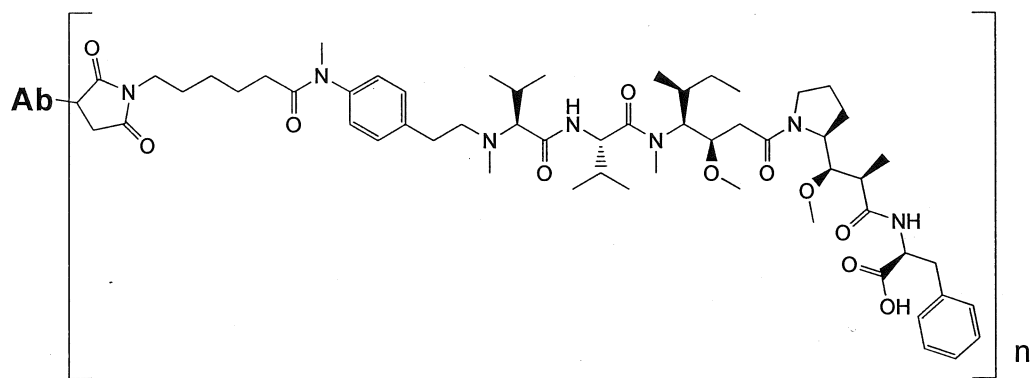
phần tử có công thức:



(Ab-E-13)

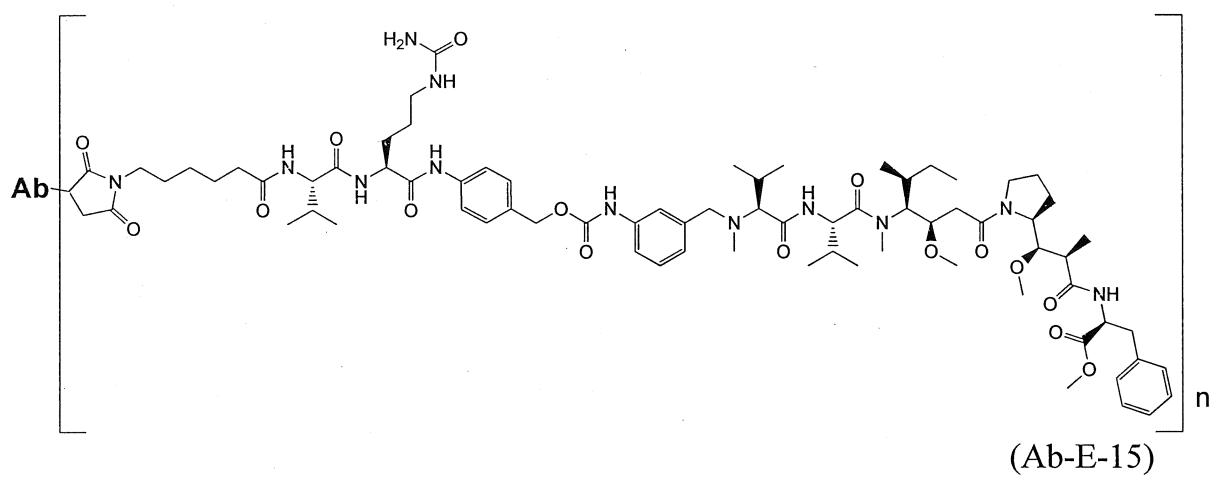
(Ab-F-13)

phần tử có công thức:



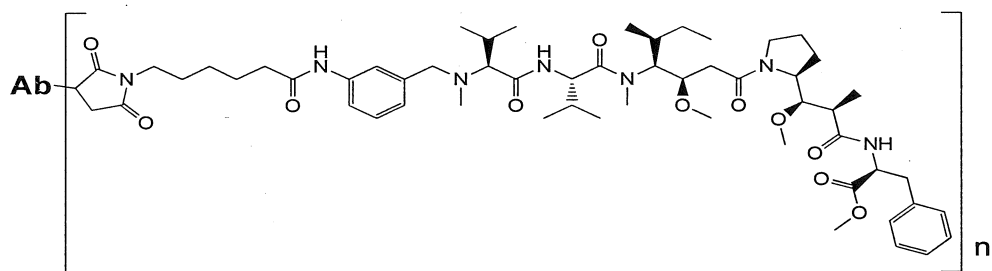
(Ab-G-13)

phần tử có công thức:



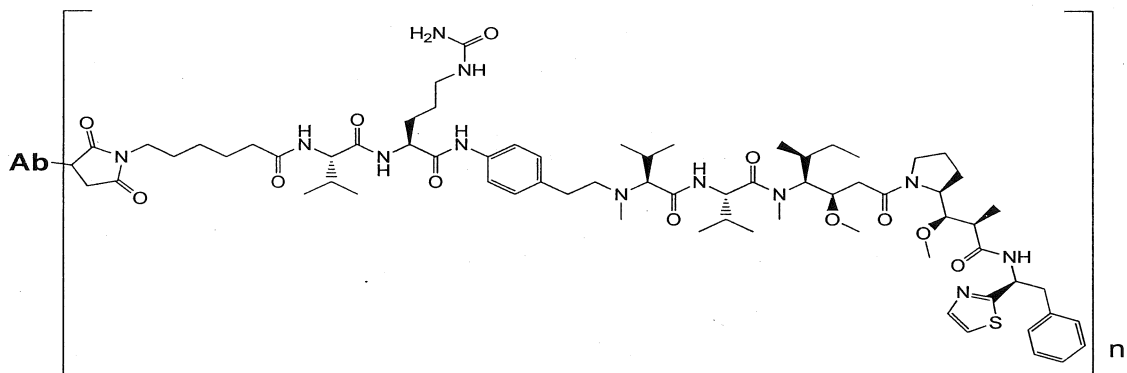
(Ab-E-15)

phần tử có công thức:



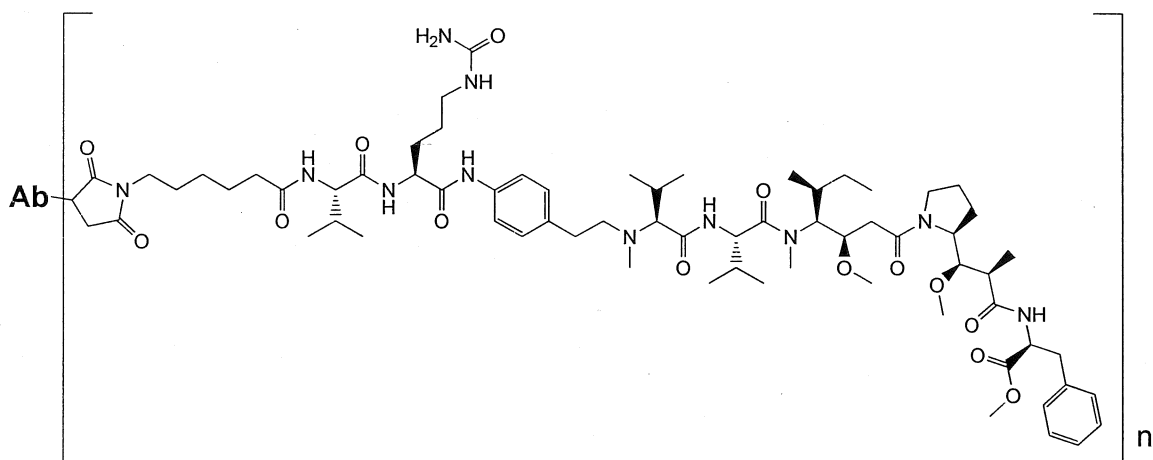
(Ab-G-15)

phần tử có công thức:



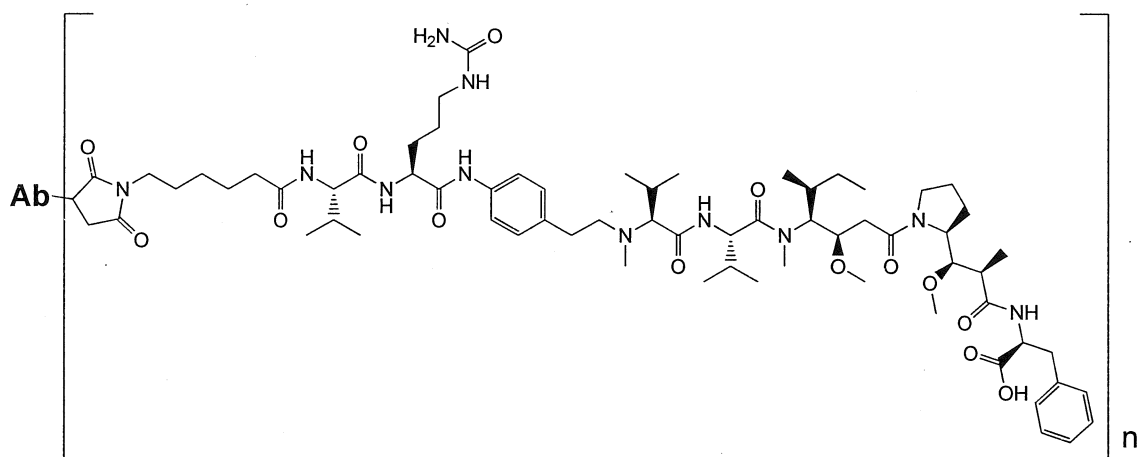
(Ab-F-61)

phần tử có công thức:



(Ab-F-62)

phần tử có công thức:



(Ab-F-63)

và các muối được dụng của nó,

trong đó **Ab** được chọn từ nhóm bao gồm:

- i) các kháng thể 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 và 213B10;
- ii) các kháng thể mà cạnh tranh để gắn kết IGF-1R với các kháng thể nêu trong mục i); và
- iii) các kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop nêu trong mục iGF-1R như các kháng thể nêu trong mục i).

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó n là 2.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó n là 4.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC để sử dụng làm thuốc.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến dược phẩm chứa ADC như được mô tả trên đây.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến dược phẩm còn chứa tá dược dạng lỏng được dụng.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến dược phẩm để sử dụng trong điều trị ung thư biểu hiện IGF-1R hoặc các loại ung thư liên quan đến IGF-1R.

Ung thư biểu hiện IGF-1R hoặc ung thư liên quan đến IGF-1R bao gồm tế bào khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức toàn bộ hoặc một phần IGF-1R trên bề mặt của chúng.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến dược phẩm, trong đó ung thư biểu hiện IGF-1R này là ung thư được chọn từ ung thư vú, ruột kết, ung thư biểu mô thực quản, tế bào gan, dạ dày, u thần kinh đệm, phổi, khối u ác tính, xacôm xương, buồng trứng, tuyến tiền liệt, ung thư mô liên kết, thận, tuyến giáp, ung thư màng trong tử cung, u trung biểu mô, ung thư biểu mô gai và ung thư kháng được chất bất kỳ.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị ung thư biểu hiện IGF-1R ở đối tượng cần đến điều trị này, bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc dược phẩm theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến kit chứa ít nhất i) thể tiếp hợp kháng thể-dược chất và/hoặc dược phẩm như được mô tả trên đây và ii) ống tiêm hoặc lọ nhỏ hoặc ống thuốc tiêm trong đó thể tiếp hợp kháng thể-dược chất và/hoặc dược phẩm này được phân phối vào.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ Fig.1A đến Fig.1C: Kháng thể gắn kết với IGF-1R nguyên thể của người bởi các phép phân tích FACS. Fig.1A thể hiện đường cong chuẩn độ, đối với dòng tế bào MCF-7. MFI thể hiện trị số trung bình của cường độ huỳnh quang. Fig.1B thể hiện EC_{50} của cả các kháng thể của chuột và kháng thể khảm kháng IGF-1R đối với dòng tế bào MCF-7. Fig.1C thể hiện B_{max} của các kháng thể khảm kháng IGF-1R đối với dòng tế bào MCF-7.

Các hình vẽ Fig.2A đến Fig.2B: Đánh giá việc nhận biết hIGF-1R bằng cách sử dụng tế bào được gây nhiễm so với tế bào không được gây nhiễm. Fig.2A thể hiện đường cong chuẩn độ của một Ab khảm kháng IGF-1R đối với dòng tế bào IGF-1R⁺. MFI thể hiện trị số trung bình của cường độ huỳnh quang. Fig.2B thể hiện sự gắn kết của các Ab khảm kháng IGF-1R đối với dòng tế bào IGF-1R của người.

Các hình vẽ Fig.3A đến Fig.3B: Đánh giá tính đặc hiệu của các Ab với IGF-1R so với hIR bằng cách sử dụng các tế bào đã được gây nhiễm. Fig.3A thể hiện sự gắn kết của Ab kháng IGF-1R của chuột đối với dòng tế bào được gây nhiễm hIR⁺. Fig.3B thể hiện sự gắn kết của Ab khảm kháng IGF-1R đối với dòng tế bào IR⁺. MFI thể hiện trị số trung bình của cường độ huỳnh quang. GRO5 Mab kháng hIR Mab (Calbiochem) được đưa vào làm đối chứng dương tính.

Fig.4: Sự gắn kết của Ab kháng IGF-1R của chuột đối với dòng tế bào IM-9. MFI thể hiện trị số trung bình của cường độ huỳnh quang. GRO5 Mab kháng hIR được đưa vào làm đối chứng dương tính.

Các hình vẽ Fig.5A đến Fig.5C: Đánh giá việc nhận biết IGF-1R của khỉ. Fig.5A thể hiện đường cong chuẩn độ của Ab khảm kháng IGF-1R đối với dòng tế bào COS-7. MFI thể hiện trị số trung bình của cường độ huỳnh quang. Fig.5B thể hiện EC_{50} của cả kháng thể của chuột và kháng thể khảm kháng IGF-1R đối với dòng tế bào COS-7. Fig.5C thể hiện EC_{50} của các kháng thể khảm kháng IGF-1R đối với cả tế bào đã được gây nhiễm NIH 3T3 hIGF-1R⁺ và dòng tế bào COS-7.

Fig.6: Sơ đồ tín hiệu thu được đối với kỹ thuật SPR dựa trên Biacore X100 bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 được hoạt hoá với nhiều hơn 11000 RU kháng thể của chuột kháng Tag His được ghép hoá học với cơ chất carboxymethyl dextran. Thử nghiệm được thực hiện ở tốc độ dòng 30 μ l/phút ở 25°C bằng cách sử dụng HBS-

EP+ làm dung dịch đậm chạy và pha loãng mẫu. Hình vẽ này thể hiện sự chồng chập của 4 sơ đồ tín hiệu độc lập được sắp thẳng hàng trên trục x khi bắt đầu lần tiêm thứ nhất của chất phân tích và trên trục y theo đường cơ sở được xác định ngay trước lần tiêm thứ nhất này. Sơ đồ tín hiệu thu được bằng cách bắt giữ trình tự chủ yếu của người chứa IGF1R tái tổ hợp có thể hoà tan được đánh dấu bởi các hình thoi. Biểu đồ tín hiệu này thu được với việc bắt giữ trình tự chủ yếu của cynomolgus chứa IGF-1R tái tổ hợp có thể hoà tan được đánh dấu bởi hình tam giác. Trong khi các ký hiệu tương ứng với các vòng tròn trống (5 lần tiêm dung dịch đậm thử nghiệm) và các ký hiệu màu đen tương ứng với các lần tiêm trong khoảng nồng độ tăng dần là c208F2 (5, 10, 20, 40 và 80nM).

Fig.7: Đánh giá tác dụng nội tại của các kháng thể kháng hIGF-1R đối với quá trình phosphoryl hoá thụ thể so với IGF1.

Fig.8: Sự ức chế quá trình phosphoryl hoá IGF-1R đáp ứng với IGF-1 bởi kháng hIGF-1R của chuột

Fig.9: Cường độ tín hiệu bề mặt tế bào của các kháng thể kháng IGF-1R được điều hoà giảm sau khi ủ tế bào ở 37°C. Tế bào MCF-7 được ủ ở 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ với 10µg/ml Ab. Hình vẽ này thể hiện ΔMFI.

Các hình vẽ Fig.10A đến Fig.10B: Sự phân rã bề mặt của kháng thể. Kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào được đánh giá sau 10, 20, 30, 60 và 120 phút ở 37°C. Fig.10A thể hiện% nêu trong mục iGF-1R còn lại so với cường độ tín hiệu đo được ở 4°C. Fig.10B thể hiện phần mềm usinf Prims tính toán bán tồn và sử dụng fit phân rã theo số mũ.

Fig.11: Các Ab kháng hIGF-1R được nội bào hoá. Tế bào được ủ với 10µg/ml Ab của chuột trong 0, 30 hoặc 60 phút ở 37°C. Các tế bào đã được thẩm thấu hoặc không được thẩm thấu và được ủ với IgG-Alexa 488 thứ cấp kháng chuột. Màn hình tương ứng với cường độ tín hiệu w/o thẩm. Tổng tương ứng với cường độ tín hiệu sau khi thẩm thấu tế bào và tế bào chất tương ứng với Ab đã được nội bào hoá. Tên của mỗi kháng thể được đánh giá được mô tả trong phần đầu của mỗi biểu đồ.

Các hình vẽ Fig.12A đến Fig.12B: Tạo hình ảnh nội bào hoá Ab. Fig.12A: tế bào MCF-7 được ủ với m208F2 trong 20 phút ở 4°C và rửa trước khi ủ (W) ở 37°C trong 15 (X), 30 (Y) và 60 (Z) phút. Tế bào đã được cố định và đã được thẩm thấu. Ab

m208F2 được thể hiện bằng cách sử dụng IgG Alexa488 kháng chuột và Lamp-1 bằng cách sử dụng kháng thể của thỏ kháng Lamp-1 và IgG Alexa 555 thứ cấp kháng thỏ. Fig.12B: tế bào MCF-7 được ủ trong 30 phút ở 37°C với kháng thể của chuột kháng hIGF-1R và được nhuộm như được mô tả trên đây. Việc đồng định vị đã được nhận biết bằng cách sử dụng ghép đánh dấu đồng định vị của phần mềm ImageJ.

Fig.13: Sự liên quan của lysosom trong quá trình phân huỷ kháng thể

Fig.14: Độ pH có tính axit làm giảm khả năng gắn kết của năm kháng thể kháng IGF-1R của chuột.

Các hình vẽ Fig.15A đến Fig.15D: Đặc tính gắn kết của dạng được làm giống như của người thứ nhất của c208F2 Mab. Các đặc tính gắn kết của mAb hz208F2 VH3/VL3 được đánh giá đối với dòng tế bào của người MCF-7 (A), đối với dòng tế bào của khỉ COS-7 (B) và đối với dòng tế bào của chuột đã được gây nhiễm biểu hiện thụ thể insulin của người (C). Sự gắn kết của 208F2 mAb của cả chuột và khỉ được đánh giá song song. Dòng kháng thể kháng hIR GRO5 được sử dụng để xác nhận sự biểu hiện của hIR đối với dòng tế bào đã được gây nhiễm (D).

Fig.16: Sự phân rã bề mặt của kháng thể hz208F2 VH3/VL3

Fig.17: Sự chồng chập của biểu đồ tín hiệu thu được với thiết bị Biacore X100 dựa trên SPR ở nhiệt độ 25°C với chip cảm biến CM5 được hoạt hoá đối với cả các tế bào trong dòng với khoảng 12.000 RU kháng thể đơn dòng kháng TagHis của chuột được ghép bằng cách hoá học với cơ chất carboxymetyldextran bằng cách sử dụng HBS-EP+ làm dung dịch đệm chạy ở tốc độ dòng 30µl/phút. Mỗi biểu đồ tín hiệu (biểu đồ thứ nhất được đánh dấu bởi hình tam giác và biểu đồ thứ hai được đánh dấu bởi các hình thoi) tương ứng với chu trình hoàn chỉnh:

1- Tiêm trong một phút dung dịch chứa h-IGF-1R tái tổ hợp (10µg/ml) trên tế bào trong dòng thứ hai.

2- Đối với biểu đồ tín hiệu thứ hai: 5 lần tiêm dung dịch đệm thử nghiệm trong 90 giây mỗi lần

Đối với biểu đồ tín hiệu thứ hai: năm lần tiêm trong khoảng tăng dần của nồng độ dung dịch chứa kháng thể kháng IGF-1R c208F2 trong 90 giây mỗi lần.

3- Phân rã trong 300 giây để xác định tốc độ phân ly động.

4- Tạo ra bề mặt bằng cách tiêm trong 45 giây 10mM Glyxin, dung dịch đệm HCl độ pH=1,5.

Fig.18: Biểu đồ tín hiệu tương ứng với phép trừ của biểu đồ tín hiệu trống (5 lần tiêm HBS-EP+) đối với biểu đồ tín hiệu thu được với khoảng tăng dần của nồng độ dung dịch kháng IGF-1R c208F2 được thể hiện dưới dạng màu xám. Biểu đồ tín hiệu theo lý thuyết tương ứng với mô hình 1:1 với các tham số sau: $k_{on} = (1,206 \pm 0,036) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{off} = (7,81 \pm 0,18) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $R_{max} = 307,6 \pm 0,3 \text{ RU}$ được thể hiện bởi đường mảnh màu đen. Các nồng độ được tính toán của c208F2 được đưa ra trên biểu đồ: chỉ có nồng độ cao nhất (24nM) được cho là không đổi).

Fig.19: Hằng số phân ly tương ứng với trị số trung bình của bốn thử nghiệm đối với mỗi kháng thể và tương ứng với tỷ lệ: $k_{off}/k_{on} \times 10^{12}$ cần được biểu hiện theo đơn vị pM. Cột báo lỗi tương ứng với sai số chuẩn (n=4).

Fig.20: bán tòn tương ứng với trị số trung bình của bốn thử nghiệm đối với mỗi kháng thể và tương ứng với tỷ lệ: $\text{Ln}(2)/k_{off}/3600$ cần được biểu hiện theo đơn vị h. Cột báo lỗi tương ứng với sai số chuẩn (n=4).

Fig.21: Độc tế bào của kháng IGF-1R liên hợp với ba hợp chất khác nhau. Năm kháng thể kháng IGF-1R được liên hợp với E-13, G-13 hoặc F-63. Kháng thể không thích hợp c9G4 cũng được liên hợp với cùng một hợp chất.

Các hình vẽ Fig.22A đến Fig.22C: đánh giá *in vivo* của c208F2-E-13 (Fig.22A), c208F2-G-13 (Fig.22B) và c208F2-F-63 (Fig.22C) trong mô hình ghép khác loài MCF-7.

Các hình vẽ Fig.23A đến Fig.23B: đánh giá *in vivo* của cả c208F2-E-13 (Fig.23A) và c208F2-G-13 (Fig.23B) so với đối chứng ADC (c9G4-E13 và c9G4-G-13) trong mô hình ghép khác loài MCF-7.

Các hình vẽ Fig.24A và Fig.24B: Độ pH có tính axit làm giảm khả năng gắn kết của các kháng thể IGF-1R được làm giống như của người hz208F2 H076/L024 (A) và hz208F2 (H077/L018 (B)).

Fig.25: Đánh giá độc tế bào của c208F2-G-13 đối với các tế bào bình thường.

Fig.26: Độc tế bào của các biến thể được làm giống như của người của hz208F2 liên hợp với G-13. Kháng thể không thích hợp c9G4 cũng liên hợp với cùng một hợp chất.

Fig.27: Đánh giá *in vivo* của các dạng được làm giống như của người của 208F2-G-13 so với c208F2-G-13 trong mô hình ghép khác loài MCF-7.

Các hình vẽ Fig.28A và Fig.28B: Đánh giá *in vivo* của c208F2-G-13 (28A) hoặc hz208F2-4-G-13 (28B) được tiêm 4 lần so với một lần tiêm trong mô hình ghép khác loài MCF-7.

Các hình vẽ Fig.29A và Fig.29B: Đánh giá *in vivo* của c208F2-E-13 (29A) và c208F2-G-13 (29B) trong mô hình ghép khác loài CaOV-3.

Mô tả chi tiết sáng chế

I – Kháng thể (Antibody-Ab)

Các thuật ngữ “kháng thể”, “các kháng thể” “ab”, “Ab”, “MAb” hoặc “globulin miễn dịch” được sử dụng thay thế cho nhau theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể phân lập được, được tạo ra hoặc tái tổ hợp (ví dụ, kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ hoặc nguyên vẹn), các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa hoá trị hoặc các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép) và cả mảnh kháng thể của nó, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn.

Theo một phương án, kháng thể của ADC theo sáng chế là kháng thể tái tổ hợp. Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp” được dùng chỉ kháng thể mà được tạo ra do sự biểu hiện của ADN tái tổ hợp trong tế bào đang sống. Kháng thể tái tổ hợp của ADC theo sáng chế thu được bằng cách sử dụng các phương pháp phòng thí nghiệm về tái tổ hợp di truyền, mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, tạo ra các trình tự ADN mà có thể không được tìm thấy trong các cơ thể sinh học.

Theo phương án khác, kháng thể của ADC theo sáng chế là kháng thể được tổng hợp hoá học.

Cụ thể hơn, phân tử này là glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bởi các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng chứa vùng (hoặc miền) biến đổi của chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là HCVR hoặc VH) và vùng cố định của chuỗi nặng. Vùng cố định của chuỗi nặng chứa ba miền

CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là LCVIR hoặc VL) và vùng cố định của chuỗi nhẹ. Vùng cố định của chuỗi nhẹ chứa một miền, CL. Các vùng VH và VL còn có thể được phân chia thành các vùng siêu biến, vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region-CDR), nằm rải rác với các vùng mà được bảo tồn nhiều hơn, các vùng khung (framework region-FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được bố trí từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết mà tương tác với kháng nguyên. Các vùng cố định của các kháng thể có thể gây ra sự gắn kết của globulin miễn dịch với mô của vật chủ hoặc các yếu tố, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ tế bào tác động) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ bổ trợ cổ điển.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” hoặc “mảnh gắn kết IGF-IR” của kháng thể của ADC theo sáng chế, được dự định biểu thị peptit, polypeptit hoặc protein bất kỳ vẫn có khả năng gắn kết với đích (còn thường được dùng để chỉ kháng nguyên) của kháng thể.

Theo một phương án, “mảnh gắn kết kháng nguyên” này được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh Fv, scFv (sc đối với chuỗi đơn), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc hoặc các lưỡng thể hoặc mảnh bất kỳ của nó mà thời gian bán tồn đã được gia tăng bằng quá trình biến đổi hoá học, như việc bổ sung poly(alkylen) glycol như poly(etylen) glycol (“PEGyl hoá”) (các mảnh được pegyl hoá được gọi là Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG hoặc Fab'-PEG) (“PEG” đối với Poly(Etylen) Glycol) hoặc bằng quá trình hợp nhất vào liposom, các mảnh này có ít nhất một CDR đặc trưng của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn là, “mảnh gắn kết kháng nguyên” này sẽ được cấu thành bởi hoặc sẽ chứa một phần trình tự của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể mà từ đó chúng thu được, một phần trình tự này là đủ để duy trì cùng tính đặc hiệu gắn kết như kháng thể mà từ đó thu được nó và đủ ái lực, tốt hơn là ít nhất là 1/100, theo cách được ưu tiên hơn ít nhất là 1/10, ái lực của kháng thể mà từ đó thu được nó, so với đích. Tốt hơn nữa là, “mảnh gắn kết kháng nguyên” này sẽ được cấu thành bởi hoặc sẽ chứa ít nhất ba CDR CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 của chuỗi nặng biến đổi và ba CDR CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể mà từ đó thu được chúng.

Thuật ngữ “việc gắn kết”, “gắn kết” hoặc thuật ngữ tương tự, được dự định rằng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ của nó, tạo ra phức với kháng nguyên mà tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Việc gắn kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất khoảng 1×10^{-6} M. Các phương pháp xác định xem liệu hai phân tử có gắn kết với nhau hay không cũng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, các thử nghiệm đánh dấu phóng xạ và phương pháp tương tự. Để tránh nghi ngờ, không có nghĩa rằng kháng thể này có thể không gắn kết hoặc gây cản trở, ở mức thấp, với kháng nguyên khác. Tuy nhiên, theo một phương án, kháng thể này chỉ gắn kết với kháng nguyên đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể IGF-1R” sẽ được giải thích tương tự như “kháng thể kháng IGF-1R” và có nghĩa là kháng thể có khả năng gắn kết với IGF-1R.

Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là, epitop của kháng thể được định vị trong miền ngoại bào nêu trong mục iGF-1R của người (cũng được dùng để chỉ IGF-1R ECD).

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ của nó, có khả năng gắn kết với IGF-1R với EC_{50} nằm trong khoảng từ 10×10^{-10} đến 1×10^{-10} và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 8×10^{-10} đến 2×10^{-10} .

Thuật ngữ nồng độ hữu hiệu nửa tối đa (EC_{50}) tương ứng với nồng độ của dược chất, kháng thể hoặc chất độc mà gây ra đáp ứng nửa đường giữa đường gốc và tối đa sau một thời gian tiếp xúc quy định nào đó. Nó thường được sử dụng làm phép đo mức độ hiệu nghiệm của dược chất. Do đó, EC_{50} của đường cong đáp ứng liều chia độ biểu thị nồng độ của hợp chất, trong đó 50% tác dụng tối đa của nó được quan sát. EC_{50} của đường cong đáp ứng liều hữu hạn biểu thị nồng độ của hợp chất, trong đó 50% quần thể dưới dạng đáp ứng, sau khoảng thời gian tiếp xúc quy định. Thông thường, các phép đo nồng độ theo đường cong sigma, gia tăng nhanh chóng theo thay đổi tương đối nhỏ về nồng độ. Việc này có thể được xác định bằng cách toán học bằng phép lấy đạo hàm đường tối ưu.

Theo phương án được ưu tiên, EC_{50} , được xác định theo sáng chế, xác định tính hiệu nghiệm của kháng thể để gắn kết trên IGF-1R ECD được tiếp xúc trên tế bào khối

u của người. Tham số EC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phép phân tích FACS. Tham số EC_{50} phản ánh nồng độ của kháng thể đối với 50% gắn kết tối đa trên IGF-1R của người được biểu hiện trên tế bào khối u của người được thu. Mỗi trị số EC_{50} được tính toán là trung điểm của đường cong đáp ứng liều bằng cách sử dụng chương trình khớp đường cong hồi quy bốn tham số (phần mềm Prism). Tham số này đã được chọn làm đại diện cho các điều kiện sinh lý/bệnh lý.

Thuật ngữ "epitop" là vùng của kháng nguyên mà được gắn kết bởi kháng thể. Các epitop có thể được xác định dưới dạng cấu trúc hoặc chức năng. Nói chung, các epitop chức năng là tập hợp con của các epitop cấu trúc và có các gốc này mà trực tiếp góp phần vào ái lực tương tác. Các epitop cũng có thể có cấu hình, tức là, có các axit amin không tuyến tính. Theo các phương án nhất định, các epitop có thể bao gồm các thể xác định mà là các nhóm bề mặt có hoạt tính hoá học của các phân tử như axit amin, mạch bên đường, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl và theo các phương án nhất định, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều riêng và/hoặc đặc tính điện tích riêng.

Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết sự cạnh tranh để gắn kết IGF-1R có thể được xác định bằng các phương pháp hoặc các kỹ thuật bất kỳ như, nhưng không chỉ giới hạn ở, hoạt tính phóng xạ, Biacore, ELISA, phép đo dòng tế bào, v.v.. Cụm từ “mà cạnh tranh để gắn kết IGF-1R” có nghĩa là mức cạnh tranh ít nhất là 20%, tốt hơn nếu ít nhất là 50% và tốt hơn nữa nếu ít nhất là 70%.

Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết việc xác định mức độ gắn kết với cùng một epitop có thể được xác định bằng các phương pháp hoặc kỹ thuật bất kỳ như, nhưng không chỉ giới hạn ở, hoạt tính phóng xạ, Biacore, ELISA, phép đo dòng tế bào, v.v.. Cụm từ “mà gắn kết với cùng một epitop của IGF-1R” có nghĩa là mức cạnh tranh ít nhất là 20%, tốt hơn nếu ít nhất là 50% và tốt hơn nữa nếu ít nhất là 70%.

Như nêu trên và trái với kiến thức chung, sáng chế tập trung vào các kháng thể IGF-1R đặc hiệu thể hiện khả năng cao cần được nội bào hoá sau khi gắn kết IGF-1R. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể mà “đã được nội bào hoá” hoặc mà “được nội bào hoá” (hai cách trình bày là tương tự) là kháng thể mà được hấp thụ bởi (có nghĩa là nó “đi vào”) tế bào khi gắn kết với IGF-1R trên tế bào của động vật có vú.

Kháng thể này là đáng quan tâm dưới dạng một phần của ADC, do đó nó sẽ gửi hoặc dẫn độc tế bào đã được liên kết vào trong tế bào ung thư được hướng đích. Một khi được nội bào hoá, độc tế bào này gây chết tế bào ung thư.

Điều ngạc nhiên là, tất cả kháng thể theo sáng chế thể hiện cùng một trình tự đối với CDR-H2, CDR-H3 và CDR-L2, 3 CDR khác là khác nhau. Quan sát này dường như nhất quán do nó là một phần của kiến trúc chung mà, liên quan đến tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể, CDR-H3 được mô tả là quan trọng nhất và liên quan nhiều nhất đến sự nhận biết epitop.

Các vấn đề then chốt quan trọng để thành công với liệu pháp ADC được cho là tính đặc hiệu kháng nguyên đích và nội bào hoá của các phức kháng nguyên-kháng thể với tế bào ung thư. Điều hiển nhiên là, các kháng nguyên không nội bào hoá ít hữu hiệu hơn so với kháng nguyên nội bào hoá để phân phối các tác nhân độc tế bào. Các quy trình nội bào hoá có thể thay đổi theo kháng nguyên và phụ thuộc vào nhiều tham số mà có thể bị ảnh hưởng bởi các kháng thể.

Trong ADC, độc tế bào tạo ra hoạt tính độc tế bào và kháng thể đã được sử dụng đáp ứng với tính đặc hiệu kháng tế bào ung thư, cũng như vật truyền để đi vào trong tế bào để gửi chính xác độc tế bào. Do đó, để cải thiện ADC, kháng thể có thể có khả năng cao nội bào hoá vào trong tế bào ung thư được hướng đích. Hiệu quả nội bào hoá do kháng thể gây ra khác nhau đáng kể phụ thuộc vào epitop được hướng đích. Việc lựa chọn các kháng thể IGF-1R nội bào hoá hiệu nghiệm cần đến các dữ liệu thử nghiệm khác nhau nghiên cứu không chỉ sự điều hoà giảm IGF-1R mà còn cả sự nội bào hoá kháng thể IGF-1R tiếp theo với tế bào.

Theo một phương án, việc nội bào hoá kháng thể của ADC theo sáng chế có thể được đánh giá bằng kỹ thuật huỳnh quang miễn dịch hoặc FACS (đo dòng tế bào) (như được minh hoạ dưới đây trong bản mô tả này) hoặc phương pháp hoặc quy trình bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết đặc hiệu với cơ chế nội bào hoá. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể của ADC theo sáng chế có thể tạo ra mức nội bào hoá sau khi gắn kết với IGF-1R ít nhất là 30%, tốt hơn nếu ít nhất là 50% và tốt hơn nữa là 80%.

Phức IGF-1R/kháng thể được nội bào hoá sau khi gắn kết kháng thể với ECD nêu trong mục iGF-1R này và làm giảm số lượng IGF-1R trên bề mặt của tế bào. Việc

giảm này có thể được định lượng bằng phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết như các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế thẩm tách Tây, FACS và kỹ thuật huỳnh quang miễn dịch.

Theo một phương án, do đó, việc giảm này phản ánh quá trình nội bào hoá, tốt hơn là có thể được đo bằng FACS và được biểu thị dưới dạng chênh lệch hoặc delta giữa cường độ huỳnh quang trung bình (Mean Fluorescence Intensity-MFI) đo được ở 4°C với MFI đo được ở 37°C sau thời gian ủ 4 giờ với kháng thể.

Trong ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế, delta này được xác định dựa trên các MFI thu được với các tế bào không được xử lý và các tế bào đã được xử lý bằng kháng thể bằng cách sử dụng i) tế bào ung thư vú MCF7 sau khoảng thời gian ủ 4 giờ với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và ii) kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng Alexa488. Tham số này được xác định khi được tính toán bằng công thức sau: $\Delta(\text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}} - \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}})$.

Chênh lệch này giữa các MFI phản ánh quá trình điều hoà giảm IGF-1R do các MFI tỷ lệ với IGF-1R được biểu hiện trên bề mặt tế bào.

Theo khía cạnh được ưu tiên, các kháng thể là các kháng thể tạo ra $\Delta(\text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}} - \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}})$ đối với MCF-7 ít nhất là 280, tốt hơn nếu ít nhất là 400.

Chi tiết hơn, delta nêu trên đây có thể được đo theo quy trình sau, mà phải được xem xét là ví dụ minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế:

- a) Xử lý và ủ tế bào khối u đáng quan tâm với kháng thể theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy đầy đủ lạnh (4°C) hoặc ấm (37°C);
- b) Xử lý tế bào đã được xử lý ở bước a) và theo cách song song, tế bào không được xử lý với kháng thể thứ cấp;
- c) Đo MFI (thể hiện lượng IGF-1R có mặt trên bề mặt) đối với tế bào đã được xử lý và không được xử lý bằng kháng thể được đánh dấu thứ cấp có khả năng gắn kết với kháng thể theo sáng chế; và
- d) Tính toán delta dưới dạng phép trừ của MFI thu được với tế bào đã được xử lý từ MFI thu được với tế bào không được xử lý.

Dựa vào delta MFI này, tỷ lệ phần trăm nội bào hoá có thể được xác định là:

$$100 \times (\text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}} - \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}}) / \text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}}.$$

Các kháng thể của ADC theo sáng chế, có mặt tốt hơn là theo tỷ lệ phần trăm nội bào hoá MCF7 nằm trong khoảng từ 50% đến 99%, 70% đến 90%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 75% đến 87%.

Ưu điểm đặc biệt của các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này dựa vào tốc độ nội bào hoá của chúng.

Nói chung, đã biết được rằng, đối với ADC, có thể mong muốn rằng các kháng thể được sử dụng có tốc độ nội bào hoá nhanh chóng, tốt hơn là trong 24 giờ tính từ thời điểm dùng kháng thể và, tốt hơn nữa là trong 12 giờ và còn tốt hơn nữa là trong 6 giờ.

Theo sáng chế, tốc độ nội bào hoá, cũng được dùng để chỉ mức giảm kháng thể được gắn kết bề mặt của tế bào hoặc mức suy yếu của kháng thể bề mặt tế bào, được thể hiện dưới dạng $t_{1/2}$ (bán tồn) và tương ứng theo thời gian cần để thu được giảm 50% ΔMFI (khía cạnh này sẽ được hiểu một cách rõ ràng khi đọc các ví dụ nêu dưới đây).

Ưu điểm đặc biệt là các kháng thể của ADC theo sáng chế có $t_{1/2}$ nằm trong khoảng từ 5 đến 25 phút và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 20 phút.

Theo phương án cụ thể, sáng chế liên quan đến ADC, trong đó kháng thể Ab chứa ba CDR chuỗi nặng với CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID No.2 và CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID No.3 và ba CDR chuỗi nhẹ với CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID No.5.

Theo phương án cụ thể, sáng chế liên quan đến ADC trong đó kháng thể Ab chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6.

Theo một phương án, ADC chứa kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng chứa hoặc có các trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 hoặc 3; và ba CDR chuỗi nhẹ chứa hoặc gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6, hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 hoặc 6.

Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ của nó, chứa ba CDR chuỗi nặng bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3; và ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6.

Việc đánh số duy nhất IMGT đã được xác định để so sánh các miền biến đổi bất kỳ của thụ thể kháng nguyên, kiểu chuỗi hoặc các loài [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. Theo cách đánh số duy nhất IMGT, các axit amin được bảo tồn thường có cùng vị trí, ví dụ, cysteine 23 (1st-CYS), tryptophan 41 (CONSERVED-TRP), axit amin kỵ nước 89, cysteine 104 (2nd-CYS), phenylalanine hoặc tryptophan 118 (J-PHE hoặc J-TRP). Việc đánh số duy nhất IMGT có sự phân định tiêu chuẩn hoá của các vùng khung (FR1-IMGT: các vị trí 1 đến 26, FR2-IMGT: 39 đến 55, FR3-IMGT: 66 đến 104 và FR4-IMGT: 118 đến 128) và của các vùng xác định tính hỗ trợ: CDR1-IMGT: 27 đến 38, CDR2-IMGT: 56 đến 65 và CDR3-IMGT: 105 đến 117. Do các khe hở thể hiện các vị trí trống, chiều dài CDR-IMGT (được thể hiện giữa các dấu ngoặc và được tách biệt bởi các dấu chấm, ví dụ [8.8.13]) trở thành các thông tin cố yếu. Việc đánh số duy nhất IMGT được sử dụng trong phép biểu diễn đồ hoạ 2 chiều, được ký hiệu là IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] và trong các cấu trúc 3 chiều trong IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Cần phải hiểu rằng, không có phần mô tả nào mâu thuẫn trong bản mô tả này, các vùng xác định tính hỗ trợ hoặc CDR, có nghĩa là các vùng siêu biến của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch như được xác định theo hệ thống đánh số IMGT.

Tuy nhiên, các CDR cũng có thể được xác định theo hệ thống đánh số Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991 và các lần xuất bản sau đó). Có ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ. Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “CDR” và “các CDR” được sử dụng biểu thị, phụ thuộc vào trường hợp, một hoặc nhiều hoặc thậm chí tất cả các vùng chứa phần lớn gốc axit main đáp ứng với ái lực gắn kết của

kháng thể đối với kháng nguyên hoặc epitop mà nó nhận biết. Để làm đơn giản việc hiểu sáng chế, các CDR theo Kabat không được xác định. Tuy nhiên, các người có hiểu biết trung bình trong ngành cần phải biết rằng việc sử dụng định nghĩa về các CDR theo IMGT, để xác định các CDR theo Kabat.

Theo sáng chế, thuật ngữ “độ đồng nhất” hoặc “tỷ lệ phần trăm độ đồng nhất” giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin có nghĩa là tỷ lệ phần trăm nucleotit hoặc gốc axit amin giống nhau giữa hai trình tự cần được so sánh, thu được sau khi căn thẳng hàn tối ưu, tỷ lệ phần trăm này là hoàn toàn theo thống kê và sự khác nhau giữa hai trình tự được phân bổ ngẫu nhiên dọc theo chiều dài của chúng. Việc so sánh hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được thực hiện theo truyền thống bằng cách so sánh các trình tự sau khi đã căn thẳng hàng chúng một cách tối ưu, việc so sánh này có thể được thực hiện theo đoạn hoặc bằng cách sử dụng “cửa sổ sắp thẳng hàng”. Việc sắp thẳng hàng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, ngoài việc so sánh thủ công, bằng thuật toán đồng nhất cục bộ của Smith và Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán đồng nhất cục bộ của Neddleman và Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], bằng phương pháp tìm kiếm tương tự của Pearson và Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] hoặc bằng phần mềm máy tính bằng cách sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA và TFASTA trong Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, hoặc bằng phần mềm so sánh BLAST NR hoặc BLAST P).

Tỷ lệ phần trăm đồng nhất được tính toán bằng cách xác định số lượng vị trí mà ở đó nucleotit hoặc gốc axit amin là đồng nhất giữa hai trình tự, tốt hơn là giữa hai trình tự đầy đủ, chia số lượng vị trí đồng nhất cho tổng số vị trí trong cửa sổ sắp thẳng hàng và nhân kết quả với 100 để thu được tỷ lệ phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự.

Ví dụ, chương trình BLAST, “trình tự BLAST 2” (Tatusova et al., “Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247–250) có trên <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, có thể được sử dụng với các tham số mặc định (đặc biệt là đối với các tham số “open gap penalty-điểm trừ khe hở”: 5 và “extension gap penalty-điểm trừ khe kéo dài”: 2; ma trận được chọn, ví dụ, là ma trận “BLOSUM 62” được đề xuất bởi chương trình này); tỷ lệ phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự để so sánh được tính toán trực tiếp bởi chương trình này.

Đối với trình tự axit amin ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự axit amin đối chứng, các ví dụ được ưu tiên bao gồm các trình tự chứa trình tự đối chứng, các biến đổi nhất định, đặc biệt là mất, thêm hoặc thay thế ít nhất một axit amin, cắt cụt hoặc kéo dài. Trong trường hợp thay thế một hoặc nhiều axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp, các thay thế được ưu tiên trong đó các axit amin được thay thế là được thay thế bằng các axit amin “tương đương”. Tuy nhiên, trong bản mô tả này, cụm từ “các axit amin tương đương” có nghĩa là biểu thị các axit amin bất kỳ cũng có thể cần được thay thế đối với một trong số các axit amin cấu trúc mà không làm biến đổi các hoạt tính sinh học của các kháng thể tương ứng và các ví dụ cụ thể này được xác định dưới đây.

Các axit amin tương đương có thể được xác định dựa trên độ tương đồng cấu trúc của chúng với các axit amin mà chúng được thay thế hoặc dựa trên kết quả của các thử nghiệm so sánh hoạt tính sinh học giữa các kháng thể khác nhau cũng có thể cần được tạo ra.

Trong ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế, bảng 1 sau tổng kết các thay thế có thể xảy ra cũng có thể cần được thực hiện mà không dẫn đến sự biến đổi đáng kể hoạt tính sinh học của các kháng thể được biến đổi tương ứng; các thay thế ngược có thể thực hiện được trong tự nhiên trong cùng các điều kiện.

Bảng 1

Gốc ban đầu	(Các) thay thế
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met

Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Khía cạnh đặc biệt theo sáng chế là kháng thể của ADC, không gắn kết với thụ thể Insulin (IR). Khía cạnh này là đáng quan tâm do kháng thể được mô tả trong bản mô tả này sẽ không có tác động tiêu cực bất kỳ đối với IR, nghĩa là quá trình chuyển hoá Insulin.

Theo phương án khác, vẫn khía cạnh có lợi khác của kháng thể của ADC theo sáng chế là nó có khả năng gắn kết không chỉ với IGF-1R của người mà còn gắn kết với IGF-1R của khỉ và tốt hơn nữa là với IGF-1R của cynomolgus. Khía cạnh này cũng đáng quan tâm do nó sẽ tạo điều kiện thuận lợi để đánh giá tính độc được đòi hỏi cho các thử nghiệm lâm sàng.

Theo phương án khác nữa, kháng thể của ADC theo sáng chế có thể chứa kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "Mab" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ kháng thể thu được từ quần chứa các thể kháng thể hầu như tương đồng, nghĩa là các kháng thể riêng rẽ của quần thể là đồng nhất ngoại trừ đối với các đột biến có thể có trong tự nhiên mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng là đặc hiệu ở mức cao, được định hướng chống lại epitop đơn lẻ. Kháng thể đơn dòng này có thể được tạo ra bởi một dòng tế bào B hoặc thể lai. Các kháng thể đơn dòng còn có thể là tái tổ hợp, nghĩa là được tạo ra bằng công nghệ protein hoặc tổng hợp hoá học. Các kháng thể đơn dòng cũng có thể phân lập được từ các thư viện kháng thể thể thực khuẩn. Ngoài ra, trái với việc tạo ra kháng thể đa dòng mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau được dẫn hướng chống lại các quyết định kháng

nguyên khác nhau hoặc các epitop, mỗi kháng thể đơn dòng được dẫn hướng chống lại một epitop của kháng nguyên.

Trong bản mô tả này, kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể của chuột, kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người, như được mô tả sau.

Tốt hơn là, kháng thể thu được từ thể lai có nguồn gốc từ chuột được nộp với French collection for microorganism cultures (CNCM, Pasteur Institute, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France), thể lai này thu được bằng cách dung hợp tế bào đơn nhân lách/lympho bào của chuột được gây miễn dịch Balb/C và tế bào của dòng tế bào u tuỷ Sp 2/O-Ag 14.

Theo một phương án, kháng thể IGF-1R của ADC theo sáng chế chứa kháng thể của chuột, sau đây được dùng để chỉ m[tên của kháng thể].

Theo một phương án, kháng thể IGF-1R chứa kháng thể khảm, sau đây được dùng để chỉ c[tên của kháng thể].

Theo một phương án, kháng thể IGF-1R chứa kháng thể được làm giống như của người, sau đây được dùng để chỉ hz[tên của kháng thể].

Để tránh nghi ngờ, trong phần mô tả sau đây, cụm từ “kháng thể IGF-1R” và “[tên của kháng thể]” là tương tự và bao gồm (mà không trái với phần mô tả) các phiên bản của chuột, khảm và được làm giống như của người của kháng thể IGF-1R này hoặc của “[tên của kháng thể]” này. Nếu cần, tiền tố m- (chuột), c- (khảm) hoặc hz- (được làm giống như của người) được sử dụng.

Để dễ hiểu hơn, bảng 2 sau minh hoạ các trình tự CDR, được xác định theo IMGT, đối với các kháng thể được ưu tiên.

Bảng 2

	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID No.
Thống nhất	CDR-H1		1
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	4
		CDR-L2	5

		CDR-L3	6
208F2	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
212A11	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	10
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
214F8 và 213B10	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	12
219D6	CDR-H1		8
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11

Sẽ dễ hiểu đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng tổ hợp bất kỳ của 6 CDR như được mô tả trên đây sẽ được xem xét là một phần của sáng chế.

Như có thể nhìn thấy được trong bảng 2, tất cả các kháng thể trong bản mô tả này được mô tả có cùng một trình tự đối với CDR-H2, CDR-H3 và CDR-L2, đặc tính này là đặc biệt đáng quan tâm như được mô tả trên đây.

Khía cạnh cụ thể liên quan đến ADC trong đó kháng thể là kháng thể của chuột, khác biệt ở chỗ, kháng thể này cũng bao gồm các vùng cố định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể của các loài khác với chuột, đặc biệt là người.

Khía cạnh cụ thể khác liên quan đến ADC trong đó kháng thể là kháng thể khảm (c) khác biệt ở chỗ, kháng thể này cũng bao gồm các vùng cố định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể thuộc các loài khác với chuột, đặc biệt là người.

Kháng thể khảm là kháng thể chứa vùng biến đổi tự nhiên (chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) thu được từ kháng thể thuộc các loài đã nêu trong tổ hợp với các vùng cố định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể thuộc các loài khác với các loài đã nêu này.

Các kháng thể khảm có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền tái tổ hợp. Ví dụ, kháng thể khảm có thể được tạo ra bằng cách tạo dòng ADN tái tổ hợp chứa các vùng gen khởi động và trình tự mã hoá vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng không phải của người, đặc biệt là chuột và trình tự mã hoá vùng cố định của kháng thể của các loài khác nhau, tốt hơn là người. Kháng thể khảm của ADC theo sáng chế được mã hoá bởi một gen tái tổ hợp này có thể, ví dụ là thể khảm chuột-người, đặc biệt là kháng thể này được xác định bởi vùng biến đổi thu được từ ADN của chuột và kiểu tương đương của nó được xác định bởi vùng cố định thu được từ ADN của người.

Theo phương án được ưu tiên, nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế, kháng thể của ADC theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.13 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.13 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.14 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.14 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.10, 5 và 11;

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.15 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.15 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12;

d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.16 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.16 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11; và

e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.17 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.17 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12.

Cụm từ “trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.13 đến 17”, được dự định có nghĩa là các trình tự có ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3 và ngoài ra, ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98%, đồng nhất với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID No.13 đến 17 ngoài các trình tự tương ứng với các CDR (nghĩa là nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3).

Theo phương án được ưu tiên khác, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể của ADC theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.18 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.18 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.19 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.19 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.20 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.20 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;

d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.21 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.21 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.8, 2 và 3; và

e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.22 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.22 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3.

Cụm từ “trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.18 đến 22”, được dự định có nghĩa là các trình tự tương ứng có ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6 và ngoài ra, ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% , đồng nhất với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID No.18 đến 22 ngoài các trình tự tương ứng với các CDR (nghĩa là nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6).

Một phương án của sáng chế đề cập đến ADC trong đó Ab là kháng thể được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.13 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.13 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.18 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.18;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.14 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.14 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.19 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID NO.19;

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.15 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.15 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.20 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.20;

d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.16 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.16 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.21 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.21; và

e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.17 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.17 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.22 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.22.

Các kháng thể khả năng được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được đặc trưng bởi miền cố định và cụ thể hơn là, các kháng thể khả năng này có thể được chọn

hoặc được tạo ra như, mà không chỉ giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD hoặc IgE. Tốt hơn nữa là, theo sáng chế, các kháng thể khảm này là IgG1 hoặc IgG4.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó Ab là kháng thể khảm bao gồm các miền biến đổi VH và VL như được mô tả trên đây ở dạng IgG1. Tốt hơn nữa là, kháng thể khảm này bao gồm miền cố định đối với VH có trình tự nêu trong SEQ ID No.43 và miền Kappa đối với VL có trình tự nêu trong SEQ ID No.45.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó Ab là kháng thể khảm bao gồm các miền biến đổi VH và VL như được mô tả trên đây ở dạng IgG4. Tốt hơn nữa là, kháng thể khảm này bao gồm miền cố định đối với VH có trình tự nêu trong SEQ ID No.44 và miền Kappa đối với VL có trình tự nêu trong SEQ ID No.45.

Theo phương án được ưu tiên, nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế, kháng thể của ADC theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.23 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.23 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.28 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.28;

b) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.24 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.24 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.29 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.29;

c) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.25 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.25 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.30 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.30;

d) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.26 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.26 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.31 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.31; và

e) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.27 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.27 và

chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.32 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.32.

Để rõ ràng hơn, bảng 3 sau đây lần lượt minh hoạ các trình tự của VH và VL, đối với các kháng thể khám được ưu tiên.

Bảng 3

	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID No.
c208F2	Miền biến đổi (VH)		13
		Miền biến đổi (VL)	18
	Chiều dài đầy đủ		23
		Chiều dài đầy đủ	28
c212A11	Miền biến đổi (VH)		14
		Miền biến đổi (VL)	19
	Chiều dài đầy đủ		24
		Chiều dài đầy đủ	29
c214F8	Miền biến đổi (VH)		15
		Miền biến đổi (VL)	20
	Chiều dài đầy đủ		25
		Chiều dài đầy đủ	30
c219D6	Miền biến đổi (VH)		16
		Miền biến đổi (VL)	21
	Chiều dài đầy đủ		26
		Chiều dài đầy đủ	31
c213B10	Miền biến đổi (VH)		17
		Miền biến đổi (VL)	22
	Chiều dài đầy đủ		27
		Chiều dài đầy đủ	32

Khía cạnh cụ thể khác nữa của sáng chế liên quan đến ADC trong đó “Ab” là kháng thể được làm giống như của người khác biệt ở chỗ, các vùng cố định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể của người, lần lượt là vùng lambda hoặc kappa và vùng gama-1, gama-2 hoặc gama-4.

Thuật ngữ “kháng thể được làm giống như của người” có nghĩa là kháng thể mà chứa các vùng CDR thu được từ kháng thể có nguồn gốc không phải người, các phần khác của phân tử kháng thể thu được từ một (hoặc vài) kháng thể của người. Ngoài ra, một số gốc của đoạn khung (được gọi là FR) có thể được biến đổi để bảo tồn ái lực gắn kết.

Kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh của chúng có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các kháng thể được làm giống như của người này được ưu tiên để sử dụng chúng trong các phương pháp bao gồm chẩn đoán *in vitro* hoặc ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh *in vivo*. Các kỹ thuật được làm giống như của người khác, cũng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, như ví dụ, kỹ thuật “ghép CDR” được mô tả bởi PDL trong các patent EP 0 451 216, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 hoặc US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 và US 5,693,761. Các patent Mỹ số 5,639,641 hoặc 6,054,297, 5,886,152 và 5,877,293 cũng có thể được trích dẫn.

Theo phương án đặc biệt theo sáng chế và như sẽ được giải thích chi tiết hơn trong các ví dụ sau, được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể gồm có hz208F2. Quá trình làm giống như của người này cũng có thể được áp dụng cho các kháng thể khác là một phần của sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có:

i) CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3, và

ii) FR1, FR2 và FR3 thu được từ IGHV1-46*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.46), và

iii) FR4 thu được từ IGHJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.48).

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có:

i) CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11, và

ii) FR1, FR2 và FR3 thu được từ IGKV1-39*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.47), và

iii) FR4 thu được từ IGKJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.49).

Theo phương án được ưu tiên, nhưng không giới hạn theo sáng chế, kháng thể bao gồm:

a) chuỗi nặng có CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và FR1, FR2 và FR3 thu được từ IGHV1-46*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.46), và FR4 thu được từ IGHJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.48); và

b) chuỗi nhẹ có CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11 và FR1, FR2 và FR3 thu được từ IGKV1-39*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.47) và FR4 thu được từ IGKJ4*01 dòng mầm của người (SEQ ID No.49).

Theo một phương án, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự nêu trong SEQ ID No.33 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự nêu trong SEQ ID No.35. Kháng thể được làm giống như của người sẽ được gọi sau đây trong bản mô tả này là hz208F2 (“Biến thể 1” hoặc “Var. 1”).

Theo phương án khác, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự nêu trong SEQ ID No.33 trong đó trình tự nêu trong SEQ ID No.33 này chứa ít nhất một đột biến ngược được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95.

Cụm từ “đột biến ngược” hoặc “đột biến nghịch” có nghĩa là đột biến hoặc sự thay thế gốc của người có mặt trong dòng mầm bởi gốc tương ứng có mặt ban đầu trong trình tự của chuột.

Theo phương án khác, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự nêu trong SEQ ID No.33 trong đó trình tự nêu trong SEQ ID No.33 này bao gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 hoặc 17 đột biến ngược được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95.

Để rõ ràng hơn, bảng 4 sau đây minh họa các đột biến ngược được ưu tiên.

Bảng 4

Gốc số	20	34	35	38	48	50	59	61
Chuột	M	I	Y	K	L	W	K	N
Người	V	M	H	R	M	I	S	A

Gốc số	62	70	72	74	76	77	79	82	95
Chuột	E	L	A	K	S	N	A	F	F
Người	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

Theo một phương án, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự nêu trong SEQ ID No.35, trong đó trình tự nêu trong SEQ ID No.35 này chứa ít nhất một đột biến ngược được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 và 87.

Theo một phương án, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự nêu trong SEQ ID No.35, trong đó trình tự nêu trong SEQ ID No.35 này bao gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 đột biến ngược được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 hoặc 87.

Theo phương án khác, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm:

- a) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự nêu trong SEQ ID No.33 trong đó trình tự nêu trong SEQ ID No.33 này chứa ít nhất một đột biến ngược được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95; và
- b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự nêu trong SEQ ID No.35, trong đó trình tự nêu trong SEQ ID No.35 này chứa ít nhất một đột biến ngược được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 và 87.

Để rõ ràng hơn, bảng 5 sau đây minh họa các đột biến ngược được ưu tiên.

Bảng 5

Gốc số	22	53	55	65	71	72	77	87
Chuột	S	R	H	R	Y	S	N	F

Người	T	S	Q	S	F	T	S	Y
-------	---	---	---	---	---	---	---	---

Theo phương án này, kháng thể của ADC theo sáng chế bao gồm tất cả các đột biến ngược được nêu trên đây và tương ứng với kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự nêu trong SEQ ID No.34 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự nêu trong SEQ ID No.36. Kháng thể được làm giống như của người này sẽ được gọi sau đây trong bản mô tả này là hz208F2 (“Biến thể 3” hoặc “Var. 3”).

Theo phương án khác, tất cả các dạng được làm giống như của người nằm trong khoảng từ Biến thể 1 và Biến thể 3 cũng được bao gồm bởi sáng chế. Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế tương ứng với kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự “thống nhất” SEQ ID No.41 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự “thống nhất” SEQ ID No.42. Kháng thể được làm giống như của người, như toàn bộ, sẽ được gọi sau đây trong bản mô tả này là hz208F2 (“Biến thể 2” hoặc “Var.2”).

Theo phương án được ưu tiên, nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế, kháng thể của ADC theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.33 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.33 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11; và

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.34 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.34 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11.

Cụm từ “trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.33 hoặc 34”, được dự định có nghĩa là các trình tự có ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3 và ngoài ra, ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98%, đồng nhất với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID No.33 hoặc 34 ngoài các trình tự tương ứng với các CDR (nghĩa là nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3).

Nếu không được nêu trong các đoạn có liên quan, trong bản mô tả sáng chế, bởi trình tự bất kỳ hoặc trình tự ít nhất 80% với trình tự cụ thể, phải được hiểu rằng trình

tự này ít nhất 80% và tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự tham chiếu. Nếu các trình tự này chứa các trình tự CDR, được dự định có nghĩa là các trình tự có ít nhất các CDR này đồng nhất với các CDR của trình tự tham chiếu, 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98%, đồng nhất với trình tự đầy đủ phải được tính toán đối với trình tự còn lại được định vị ngoài các trình tự tương ứng với các CDR này.

Theo phương án được ưu tiên, nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế, kháng thể theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.35 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.35 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3; và

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.36 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.36 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3.

Cụm từ “trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.35 hoặc 36”, được dự định có nghĩa là các trình tự có ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6 và ngoài ra, ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98%, đồng nhất với trình tự đầy đủ nêu trong SEQ ID No.35 hoặc 36 ngoài các trình tự tương ứng với các CDR (nghĩa là nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6).

Các kháng thể được làm giống như của người được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được đặc trưng bởi miền cố định và tốt hơn nữa là, các kháng thể được làm giống như của người này có thể được chọn hoặc được tạo ra như, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD hoặc IgE. Tốt hơn nữa là, theo sáng chế, các kháng thể được làm giống như của người này là IgG1 hoặc IgG4.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó “Ab” là kháng thể được làm giống như của người bao gồm các miền biến đổi VH và VL như được mô tả trên đây ở dạng IgG1. Tốt hơn nữa là, kháng thể được làm giống như của người bao gồm miền cố định đối với VH có trình tự nêu trong SEQ ID No.43 và miền Kappa đối với VL có trình tự nêu trong SEQ ID No.45.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến ADC trong đó “Ab” là kháng thể được làm giống như của người bao gồm các miền biến đổi VH và VL như được mô tả trên đây ở dạng IgG4. Tốt hơn nữa là, kháng thể được làm giống như của người này bao gồm miền cố định đối với VH có trình tự nêu trong SEQ ID No.44 và miền Kappa đối với VL có trình tự nêu trong SEQ ID No.45.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế liên quan đến ADC trong đó “Ab” là kháng thể được chọn từ:

a) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.37 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.37 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.39 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.39; và

b) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.38 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.38 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.40 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.40.

Để rõ ràng hơn, bảng 6a sau đây minh họa các ví dụ không giới hạn về trình tự của VH và VL đối với biến thể 1 (Var. 1) và biến thể 3 (Var. 3) của kháng thể được làm giống như của người hz208F2. Nó cũng bao gồm trình tự thống nhất đối với biến thể 2 (Var. 2).

Bảng 6a

	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID No.
hz208F2 (var. 1)	Miền biến đổi (VH)		33
		Miền biến đổi (VL)	35
	Chiều dài đầy đủ		37
		Chiều dài đầy đủ	39
hz208F2 (Var. 3)	Miền biến đổi (VH)		34
		Miền biến đổi (VL)	36
	Chiều dài đầy đủ		38
		Chiều dài đầy đủ	40
hz208F2	Miền biến đổi (VH)		41

(Var. 2)		Miền biến đổi (VL)	42
----------	--	--------------------	----

Theo phương án được ưu tiên, nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế, kháng thể của ADC theo sáng chế được chọn từ:

a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80; và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 1;

b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60; và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3; và

c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID Nos.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80; và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế liên quan đến ADC trong đó kháng thể “Ab” được chọn từ:

a) kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80, và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.57; và

b) kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 64, 68 và 78 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 64, 68 hoặc 78 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.60, hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.60.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế liên quan đến ADC trong đó Ab là kháng thể được chọn từ:

a) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.58 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.58 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

b) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.58 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.58 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.61 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.61;

c) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.63 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.63 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

d) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.65 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.65 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

e) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.65 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.65 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.61 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.61;

f) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.67 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.67 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

g) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.69 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.69 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

h) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.69 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.69 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.61 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.61;

i) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.71 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.71 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

j) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.73 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.73 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

k) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.75 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.75 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

l) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.77 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.77 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

m) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.79 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.79 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59;

n) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.79 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.79 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.61 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.61; và

o) kháng thể chứa hoặc gồm có chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.81 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.81 và

chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59.

Theo cách khác, sáng chế liên quan đến ADC trong đó Ab là kháng thể chứa:

a) chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 và 81 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 và 81; và

b) chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.59 và 61 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59 và 61.

Để rõ ràng hơn, bảng 6b sau đây minh họa các ví dụ không giới hạn về trình tự của VH và VL (miền biến đổi và chiều dài đầy đủ) đối với các biến thể khác nhau của kháng thể được làm giống như của người hz208F2.

Bảng 6b

	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO.
hz208F2 H037/L018	Miền biến đổi (VH)		56
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		58
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H037/L021	Miền biến đổi (VH)		56
		Miền biến đổi (VL)	60
	Chiều dài đầy đủ		58
		Chiều dài đầy đủ	61
Hz208F2 H047/L018	Miền biến đổi (VH)		62
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		63
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H049/L018	Miền biến đổi (VH)		64
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		65
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H049/L021	Miền biến đổi (VH)		64
		Miền biến đổi (VL)	60
	Chiều dài đầy đủ		65

		Chiều dài đầy đủ	61
Hz208F2 H051/L018	Miền biến đổi (VH)		66
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		67
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H052/L018	Miền biến đổi (VH)		68
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		69
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H052/L021	Miền biến đổi (VH)		68
		Miền biến đổi (VL)	60
	Chiều dài đầy đủ		69
		Chiều dài đầy đủ	61
Hz208F2 H057/L018	Miền biến đổi (VH)		70
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		71
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H068/L018	Miền biến đổi (VH)		72
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		73
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H070/L018	Miền biến đổi (VH)		74
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		75
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H071/L018	Miền biến đổi (VH)		76
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		77
		Chiều dài đầy đủ	59
Hz208F2 H076/L018	Miền biến đổi (VH)		78
		Miền biến đổi (VL)	57
	Chiều dài đầy đủ		79
		Chiều dài đầy đủ	59
	Miền biến đổi (VH)		78

Hz208F2		Miền biến đổi (VL)	60
H076/L021	Chiều dài đầy đủ		79
		Chiều dài đầy đủ	61
Hz208F2	Miền biến đổi (VH)		80
H077/L018	Chiều dài đầy đủ	Miền biến đổi (VL)	57
			81
		Chiều dài đầy đủ	59

Theo khía cạnh khác, sáng chế là ADC trong đó Ab là kháng thể được chọn từ i) kháng thể được tạo ra bởi thể lai I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 hoặc I-4774 được lưu giữ ở CNCM, Institut Pasteur France lần lượt vào ngày 30 tháng 5 năm 2013, ngày 26 tháng 6 năm 2013, ngày 26 tháng 6 năm 2013, ngày 24 tháng 4 năm 2013 và ngày 26 tháng 6 năm 2013 hoặc ii) kháng thể mà cạnh tranh để gắn kết IGF-1R với kháng thể nêu trong mục i); hoặc iii) kháng thể mà gắn kết với cùng một epitop nêu trong mục iGF-1R gắn kết kháng thể nêu trong mục i).

Thực vậy, được mô tả trong bản mô tả này là thể lai của chuột được chọn từ thể lai I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 và I-4774 được lưu giữ ở CNCM, Institut Pasteur France lần lượt vào ngày 30 tháng 5 năm 2013, ngày 26 tháng 6 năm 2013, ngày 26 tháng 6 năm 2013, ngày 24 tháng 4 năm 2013 và ngày 26 tháng 6 năm 2013.

Cũng được mô tả là axit nucleic phân lập được mã hoá kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Các thuật ngữ “axit nucleic”, “trình tự nucleic”, “trình tự axit nucleic”, “polynucleotit”, “oligonucleotit”, “trình tự polynucleotit” và “trình tự nucleotit”, được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, có nghĩa là trình tự chính xác của nucleotit, được biến đổi hoặc không được biến đổi, xác định mảnh hoặc vùng của axit nucleic, chứa các nucleotit không có trong tự nhiên hoặc không và là ADN sợi kép, ADN sợi đơn hoặc sản phẩm phiên mã của các ADN này.

Các trình tự này đã được phân lập và/hoặc được làm sạch, nghĩa là chúng được lấy mẫu trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ, theo bản sao, môi trường của chúng đã được biến đổi ít nhất một phần. Các axit nucleic phân lập được thu được bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp, ví dụ, bởi tế bào của vật chủ hoặc thu được bằng quá trình tổng hợp hoá học cũng sẽ được kể đến trong bản mô tả này.

Cũng được mô tả là vật truyền chứa axit nucleic mã hoá kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, của ADC theo sáng chế, cụ thể là vật truyền tạo dòng và/hoặc biểu hiện mà chứa trình tự nucleotit này.

Tốt hơn là, vật truyền chứa các yếu tố mà cho phép biểu hiện và/hoặc tiết các trình tự nucleotit trong tế bào của vật chủ nhất định. Do đó, vật truyền có thể chứa vùng gen khởi động, các tín hiệu khởi mào và kết thúc dịch mã, cũng như các vùng gen điều hoà phiên mã thích hợp. Phải có khả năng được duy trì theo cách thích hợp trong tế bào của vật chủ và tuỳ ý có thể có các tín hiệu đặc hiệu mà xác định sự tiết protein đã được dịch mã. Các yếu tố khác nhau này được chọn và được tối ưu hoá bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này theo tế bào của vật chủ được sử dụng. Nhằm mục đích này, các trình tự nucleotit có thể được lồng vào các vật truyền tự sao chép trong vật chủ đã được chọn hoặc vật truyền toàn diện của vật chủ đã được chọn.

Các vật truyền là, ví dụ, các vật truyền có nguồn gốc plasmit hoặc virus. Chúng được sử dụng để biến nạp các tế bào của vật chủ nhằm tạo dòng hoặc biểu hiện các trình tự nucleotit của sáng chế.

Các vật truyền này được tạo ra bằng các phương pháp thường được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và các dòng thu được có thể được đưa vào trong vật chủ thích hợp bằng các phương pháp tiêu chuẩn như chuyển nhiễm liposom, xung điện, tiếp hợp, sốc nhiệt hoặc các phương pháp hoá học.

Các tế bào của vật chủ phân lập được này được biến nạp bởi hoặc chứa vật truyền như được mô tả trên đây.

Tế bào của vật chủ có thể được chọn trong số các hệ sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thật như tế bào vi khuẩn, ví dụ, kể cả tế bào nấm men hoặc tế bào động vật, đặc biệt là tế bào của động vật có vú (trừ tình huống của người). Các tế bào của côn trùng hoặc thực vật cũng có thể được sử dụng.

Cũng được bộc lộ là phương pháp tạo ra kháng thể của ADC theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

a) nuôi cấy trong môi trường với các điều kiện nuôi cấy thích hợp đối với tế bào của vật chủ như được mô tả trên đây; và

b) thu gom kháng thể đã được tạo ra theo cách này từ môi trường nuôi cấy hoặc từ tế bào đã được nuôi cấy này.

Tế bào đã được biến nạp để sử dụng trong phương pháp tạo ra các kháng thể tái tổ hợp của ADC theo sáng chế. Các phương pháp tạo ra kháng thể ở dạng tái tổ hợp bằng cách sử dụng vật truyền và/hoặc tế bào đã được biến nạp bởi vật truyền như được mô tả trên đây, cũng được nêu trong bản mô tả này. Tốt hơn là, tế bào đã được biến nạp bởi vật truyền như đã được mô tả trên đây được nuôi cấy trong các điều kiện mà cho phép biểu hiện kháng thể nêu trên và thu gom kháng thể này.

Như nêu trên, tế bào của vật chủ có thể được chọn trong số các tình huống của hệ sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thật. Cụ thể là, có thể nhận dạng các trình tự nucleotit mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiết trong hệ sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thật. Vật truyền như được mô tả trên đây mang trình tự này do đó có thể được sử dụng theo cách có lợi để tạo ra các protein tái tổ hợp cần được tiết. Thực vậy, việc làm sạch các protein tái tổ hợp đáng quan tâm này sẽ được tạo điều kiện thuận lợi bởi chúng có mặt trong dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào mà không phải là bên trong tế bào của vật chủ.

Kháng thể của ADC theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng quá trình tổng hợp hoá học. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết các phương pháp tổng hợp hoá học, như các kỹ thuật pha rắn hoặc kỹ thuật pha rắn một phần, bằng cách ngưng tụ các mảnh hoặc bằng phương pháp tổng hợp thông thường trong dung dịch. Các polypeptit thu được bằng phương pháp tổng hợp hoá học và có khả năng chứa các axit amin không có trong tự nhiên tương ứng cũng có thể được kể đến.

Kháng thể có thể thu được bằng phương pháp được mô tả trên đây cũng chứa ADC theo sáng chế.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế liên quan đến ADC trong đó AB là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, như được mô tả trên đây để sử dụng làm phương tiện định hướng để phân phối tác nhân độc tế bào ở các vị trí đích của vật chủ, vị trí đích của vật chủ này bao gồm epitop được định vị trong IGF-1R, tốt hơn là miền ngoại bào IGF-1R, tốt hơn nữa là IGF-1R của người (trình tự nêu trong SEQ ID No.50) và vẫn tốt hơn nữa là miền ngoại bào IGF-1R của người (trình tự nêu trong SEQ ID No.51) và vẫn tốt hơn nữa là đầu tận cùng N của miền ngoại bào IGF-1R của

người (trình tự nêu trong SEQ ID No.52), hoặc trình tự biến thể có trong tự nhiên bất kỳ của nó.

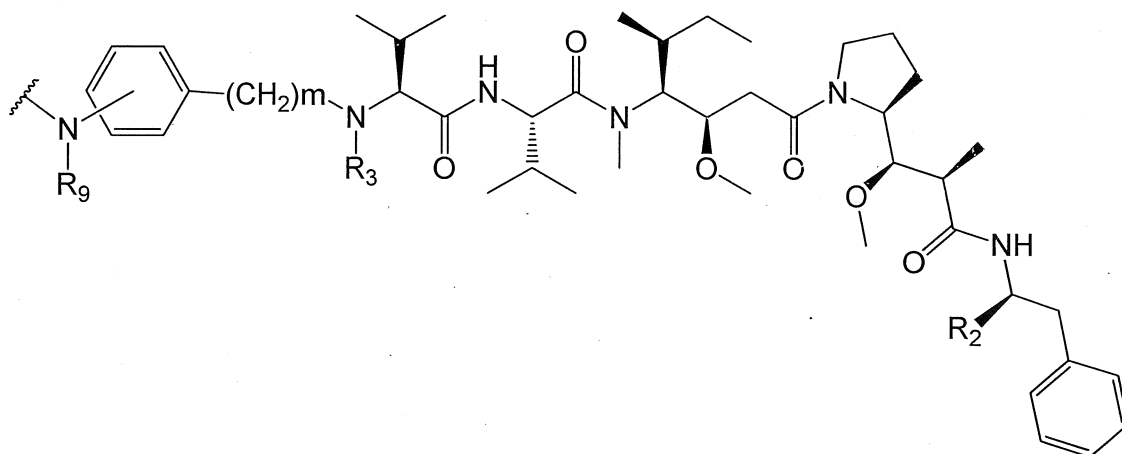
Theo một phương án được ưu tiên, vị trí đích của vật chủ này là vị trí đích của tế bào của động vật có vú, tốt hơn nữa là tế bào của người, tốt hơn nữa là tế bào mà có trong tự nhiên hoặc bằng cách tái tổ hợp di truyền, biểu hiện IGF-1R.

Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, vị trí đích của vật chủ này là vị trí đích của tế bào của đối tượng bị bệnh, tốt hơn là người, bị ung thư, tốt hơn là ung thư biểu hiện IGF-1R hoặc ung thư liên quan đến IGF-1R.

Các loại ung thư biểu hiện IGF-1R hoặc các loại ung thư liên quan đến IGF-1R bao gồm các loại ung thư cụ thể, trong đó tế bào khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức toàn bộ hoặc một phần IGF-1R trên bề mặt của chúng.

II – Dược chất (D)

Gốc dược chất theo sáng chế có công thức (II) sau:



trong đó:

- R_2 là COOH , COOCH_3 hoặc thiazolyl (như thiazol-2-yl),
- R_3 là H hoặc a $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$ (như metyl), cụ thể là nhóm $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$,
- R_9 là H hoặc $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$ (như metyl),
- m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, và
- đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào L.

Thuật ngữ “alkyl” theo sáng chế có nghĩa là chuỗi hydrocacbon no mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ, có thể kể đến các nhóm methyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl, pentyl hoặc hexyl.

Thuật ngữ “(C_x-C_y)alkyl” theo sáng chế có nghĩa là chuỗi alkyl như được xác định trên đây chứa x đến y nguyên tử cacbon. Do đó, nhóm (C₁-C₆)alkyl là chuỗi alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon.

Có lợi, (C₁-C₆)alkyl là (C₁-C₄)alkyl, tốt hơn là (C₁-C₂)alkyl.

Trong số các hợp chất theo sáng chế, một nhóm gốc được chất được ưu tiên đặc biệt tương ứng với các gốc được chất có công thức (II), trong đó R₂ là nhóm COOH.

Nhóm gốc được chất được ưu tiên đặc biệt khác tương ứng với các phần có công thức (II), trong đó R₂ là thiazol (cụ thể là nhóm thiazol-2-yl).

Nhóm khác của gốc được chất được ưu tiên đặc biệt tương ứng với các phần có công thức (II), trong đó R₂ là COOMe.

Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, tốt hơn nữa nếu R₂ là nhóm COOH, COOMe hoặc thiazol-2-yl.

Theo phương án được ưu tiên thứ nhất, R₂ là COOH.

Theo phương án được ưu tiên thứ hai, R₂ là COOMe.

Tốt hơn nếu R₃ là (C₁-C₆)alkyl, tốt hơn là nhóm methyl.

m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, cụ thể là nằm trong khoảng từ 1 đến 6, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 4, tốt hơn là 1 hoặc 2.

Theo phương án được ưu tiên, R₂ là COOH, R₃ là nhóm methyl và m là 1 hoặc 2.

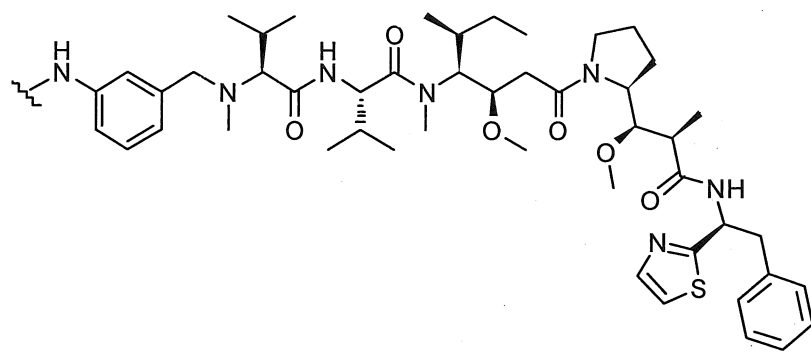
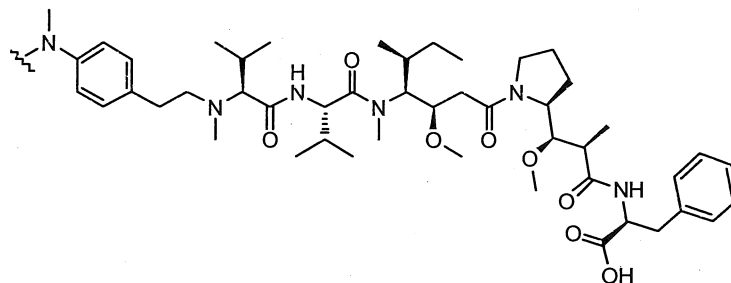
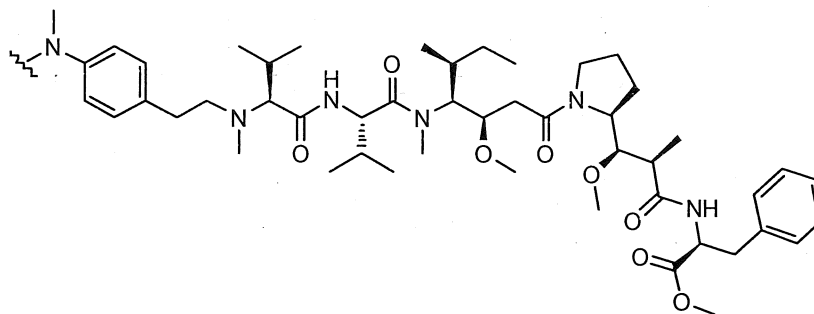
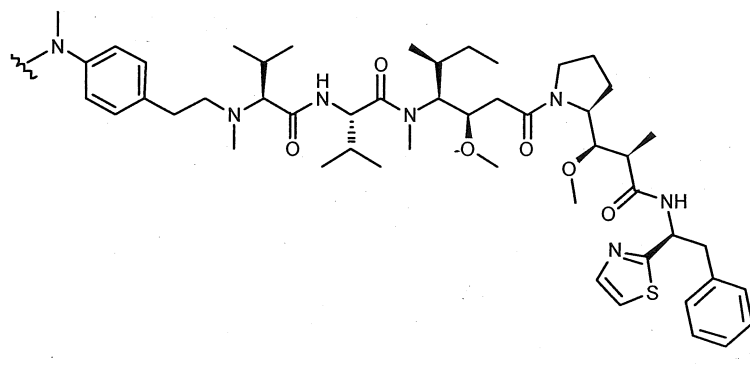
Trong số các gốc được chất theo sáng chế, một nhóm gốc được chất được ưu tiên đặc biệt tương ứng với các gốc được chất có công thức (II), trong đó R₉ là nhóm methyl hoặc hydro.

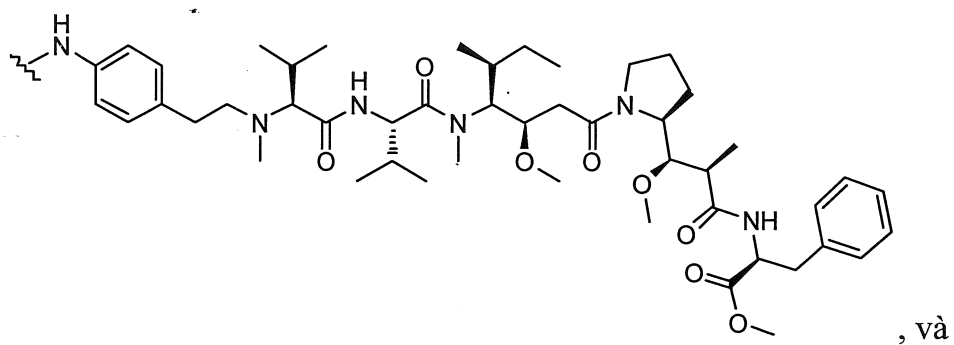
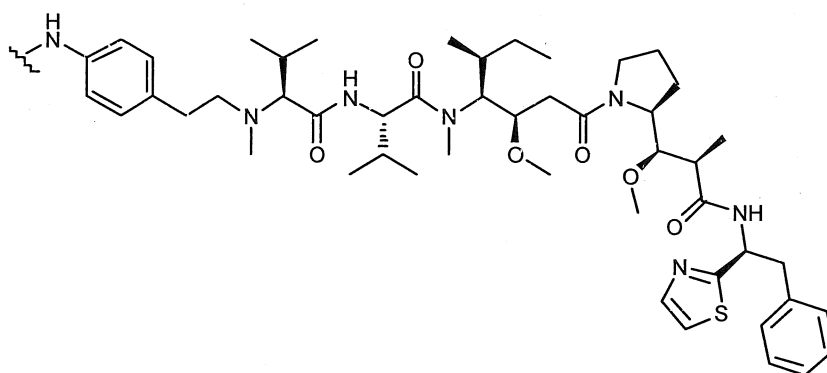
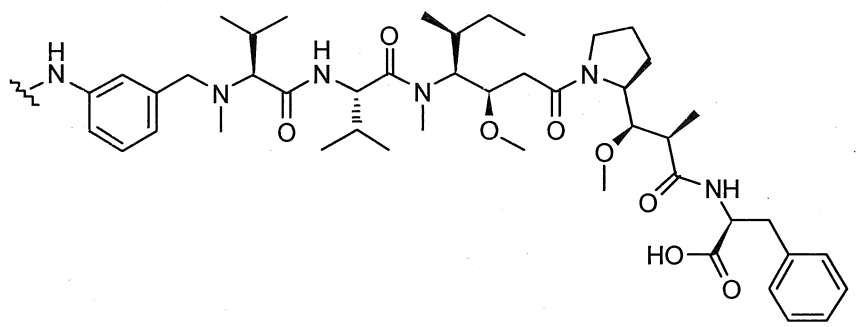
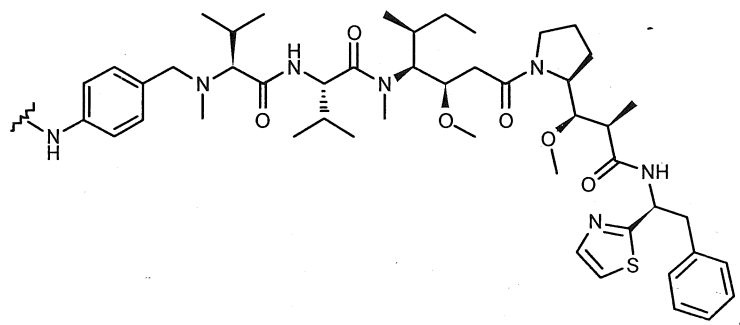
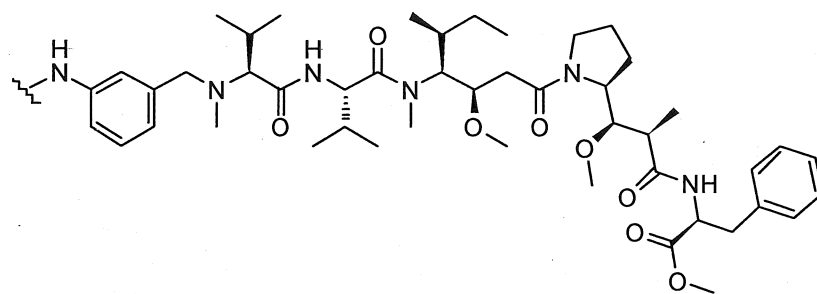
Theo phương án được ưu tiên:

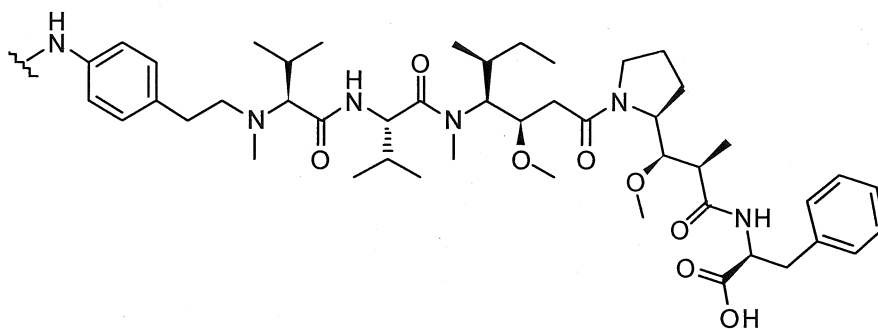
- R₂ là COOH, R₃ là nhóm methyl, R₉ là nhóm methyl và m là 1 hoặc 2, hoặc
- R₂ là COOH, R₃ là nhóm methyl group, R₉ là hydro và m là 1 hoặc 2.

Theo phương án được ưu tiên, nhóm NR_9 được định vị ở vòng phenyl ở vị trí para so với nhóm $(\text{CH}_2)_m$.

Có lợi, nếu gốc được chất được chọn từ các gốc có công thức sau:

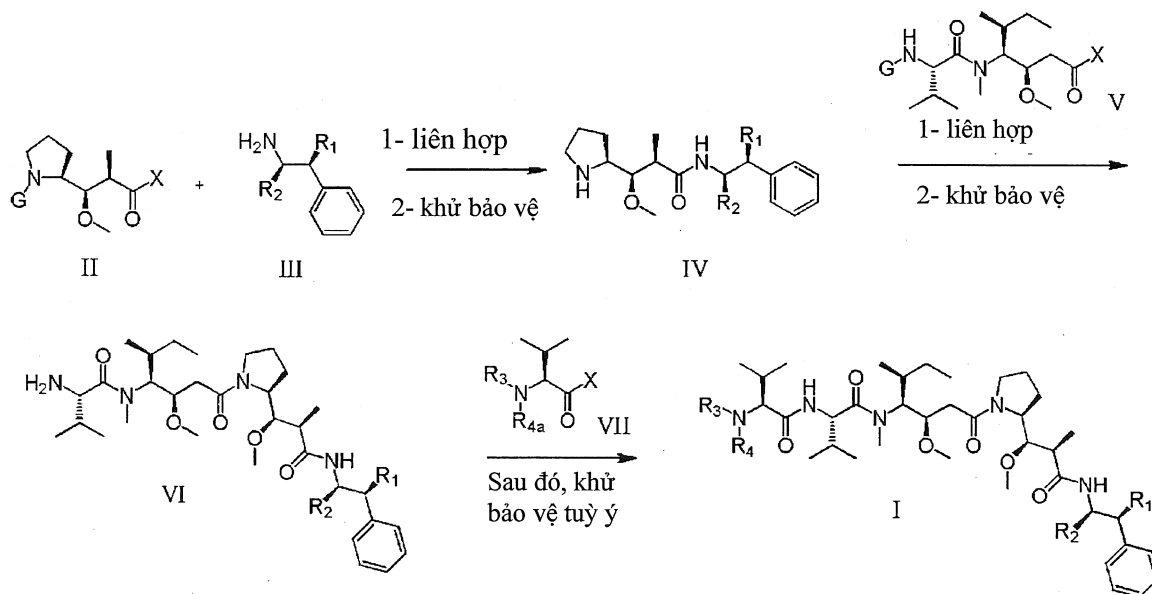






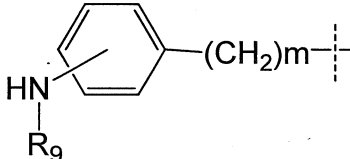
Điều chế dược chất (có công thức DH):

Dược chất được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp chung được mô tả trong sơ đồ tổng hợp sau, tùy ý được bổ sung bởi quá trình hoạt động tiêu chuẩn bất kỳ, nếu cần mà được mô tả trong tài liệu chuyên ngành hoặc đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hoặc được mô tả trong các ví dụ trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.



Sơ đồ 1

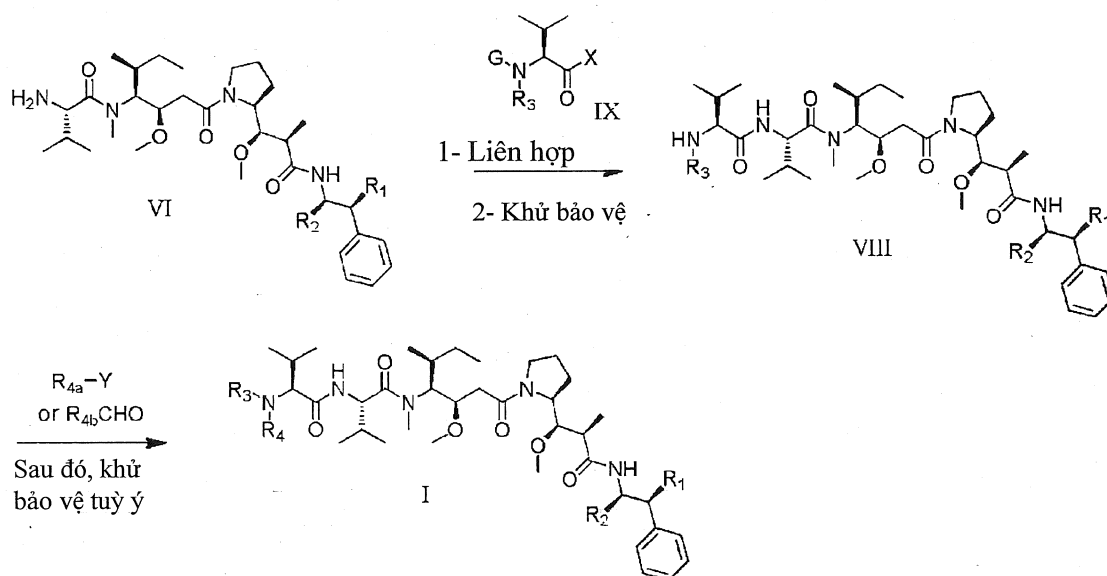
Sơ đồ 1 minh họa phương pháp chung thứ nhất mà có thể được sử dụng để tạo ra dược chất. Trong các công thức chung nêu trên, $R_1 = H$, R_2 và R_3 là như được xác

định trên đây đối với công thức II, R_4 có công thức , R_{4a} là nhóm R_4 như được xác định trên đây tùy ý ở dạng được bảo vệ và G là nhóm bảo vệ.

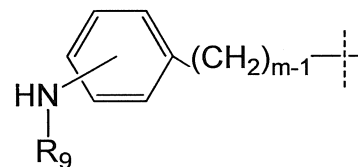
Bước thứ nhất bao gồm việc ngưng tụ hợp chất có công thức (II), được bảo vệ đối với nhóm chức amin của nó bởi nhóm bảo vệ G, với hợp chất có công thức (III). X có thể là nhóm rời chuyển như clo. Trong trường hợp này, bước thứ nhất là phản ứng giữa clorua axit và amin. Phản ứng này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp và kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Theo một phương pháp được đặc biệt ưu tiên, hai chất phản ứng với sự có mặt của bazơ hữu cơ hoặc vô cơ, ví dụ, Et_3N , iPr_2NEt , pyridin, NaH , Cs_2CO_3 , K_2CO_3 trong dung môi như THF, diclometan, DMF, DMSO, ở nhiệt độ cụ thể là nằm trong khoảng từ -20°C đến 100°C . X cũng có thể là hydroxyl (OH). Trong trường hợp này, bước thứ nhất là phản ứng ngưng tụ giữa carboxylic axit có công thức (II) với amin có công thức (III). Phản ứng này có thể được thực hiện theo các phương pháp và kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Theo một phương pháp được đặc biệt ưu tiên, hai chất này gây ra phản ứng với sự có mặt của chất liên hợp như 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimide (EDC), 3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on, amin bậc ba như diisopropyletylamin, trong dung môi không proton có cực như diclometan hoặc DMF, ở nhiệt độ cụ thể là nằm trong khoảng từ -15°C đến 40°C . Theo phương pháp được đặc biệt ưu tiên khác, hai chất này gây ra phản ứng với sự có mặt của diethyl phosphoroxyanidat (DEPC), amin bậc ba như trietylamin, trong dung môi không proton có cực như diclometan hoặc DMF, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -15°C đến 40°C . Phương pháp được đặc biệt ưu tiên khác bao gồm việc làm cho hai chất này phản ứng với sự có mặt của O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronihexaflorophosphat (HATU), amin bậc ba như diisopropyletylamin, trong dung môi không proton có cực như diclometan hoặc DMF, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -15°C đến 100°C .

Sau khi khử bảo vệ hợp chất trung gian bằng cách sử dụng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết («Protective Groups in Organic Synthesis», T.W. Greene, John Wiley & Sons, 2006 và «Protecting Groups», P.J. Kocienski, Thieme Verlag, 1994), hợp chất có công thức (IV) có thể được ngưng tụ với hợp chất có công thức (V) theo các phương pháp và kỹ thuật được mô tả trên đây để tạo ra hợp chất có công thức (VI) sau bước khử bảo vệ. Sau đó, hợp chất này có thể, sau khi ngưng tụ với hợp chất trung gian có công thức (VII) và khử bảo vệ tùy ý, để tạo ra dược chất. Hợp chất có công thức (VI) cũng có thể được liên

hợp với hợp chất có công thức (VII'), trong đó R'_3 là tiền chất R_3 , cụ thể là nhóm R_3 được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ. Việc liên hợp tiếp theo khử bảo vệ nhóm R'_3 để tạo ra R_3 có thể được thực hiện theo cùng các quy trình như được mô tả trên đây.



Sơ đồ 2 minh họa phương pháp chung thứ hai mà có thể được sử dụng để tạo ra được chất. Trong các công thức chung trên đây, G là nhóm bảo vệ, $R_1 = H$, R_2 , R_3 và



R_{4a} là như được xác định trên đây, và R_{4b} có công thức

Ở bước thứ nhất, hợp chất có công thức (IX) được bảo vệ đối với nhóm chức amin của nó bởi nhóm bảo vệ G được ngưng tụ với hợp chất có công thức (VI). X có thể là nhóm rời chuyển ví dụ clo. Trong trường hợp này, bước thứ nhất là phản ứng giữa clorua axit và amin. Phản ứng này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp và kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Theo một phương pháp được đặc biệt ưu tiên, hai chất gây ra phản ứng với sự có mặt của bazơ hữu cơ hoặc vô cơ như Et_3N , iPr_2NEt , pyridin, NaH , Cs_2CO_3 , K_2CO_3 trong dung môi như THF, diclometan, DMF, DMSO ở nhiệt độ cụ thể là nằm trong khoảng từ -20° đến $100^\circ C$. X cũng có thể là hydroxyl. Trong trường hợp này, bước thứ nhất là phản ứng ngưng tụ giữa carboxylic axit có công thức (IX) và amin có công thức (VI). Phản ứng này có thể được thực hiện theo các phương pháp và kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Theo một phương pháp được đặc biệt

ưu tiên, hai chất gây ra phản ứng với sự có mặt của 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimide (EDC), 3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on, amin bậc ba như diisopropyletylamin, trong dung môi không proton có cực như diclometan hoặc DMF, ở nhiệt độ cụ thể là nằm trong khoảng từ -15°C đến 40°C . Theo phương pháp được đặc biệt ưu tiên khác, hai chất này gây ra phản ứng với sự có mặt của diethyl phosphoroxyanidat (DEPC), amin bậc ba như trietylamin, trong dung môi không proton có cực như diclometan hoặc DMF, ở nhiệt độ cụ thể là nằm trong khoảng từ -15°C đến 40°C .

Sau khi khử bảo vệ hợp chất trung gian, sử dụng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, hợp chất có công thức (VIII) thu được có thể tạo ra được chất sau phản ứng với R_4Y . Trong trường hợp này, Y là nhóm rời chuyển như Cl, Br, I, OSO_2CH_3 , OSO_2CF_3 hoặc O-Tosyl. Phản ứng được thực hiện với sự có mặt của bazơ hữu cơ hoặc vô cơ như Et_3N , iPr_2NEt , NaH, Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , trong dung môi khan có cực như diclometan, THF, DMF, DMSO ở nhiệt độ cụ thể là nằm trong khoảng từ -20°C đến 100°C . Theo phương pháp được đặc biệt ưu tiên khác, hợp chất có công thức (VIII) gây ra phản ứng với aldehyt có công thức $\text{R}_{4b}\text{-CHO}$, trong đó R_{4b} tương ứng với tiền chất R_4 . Trong trường hợp này, phản ứng là quá trình amin hoá khử với sự có mặt của chất khử như NaBH_4 , NaBH_3CN , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, trong dung môi có cực như 1,2-dicloetan, diclometan, THF, DMF, MeOH, với sự có mặt tùy ý của titan isopropoxit (IV), ở độ pH mà có thể được kiểm soát bằng việc bổ sung axit như axit axetic ở nhiệt độ cụ thể là nằm trong khoảng từ -20°C đến 100°C .

Trong các sơ đồ tổng hợp trên đây, được chất có thể tạo ra được chất khác sau bước phản ứng bổ sung như bước xà phòng hoá, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết, trong đó nhóm R_2 là este (COOMe), được thay đổi thành nhóm R_2 là carboxylic axit (COOH).

Nếu muốn để phân tách được chất chứa ít nhất một nhóm chức bazơ ở trạng thái muối cộng axit, việc này có thể thực hiện được bằng cách xử lý bazơ tự do của được chất (chứa ít nhất một nhóm chức bazơ) với axit thích hợp, tốt hơn là với lượng tương đương. Cụ thể là, axit thích hợp có thể là axit trifloaxetic.

III – Phân tử liên kết (L)

Các thuật ngữ "phần tử liên kết", "đơn vị liên kết", "L" hoặc "liên kết" theo sáng chế có nghĩa là, gốc hoá học là liên kết cộng hoá trị hoặc mạch của các nguyên tử mà gắn cộng hoá trị kháng nguyên vào ít nhất một được chất.

Phần tử liên kết có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các chất liên hợp protein có hai nhóm chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl)xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai nhóm chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Axit 1-isothiocyantobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat làm ví dụ để tiếp hợp các chất độc tế bào với hệ dẫn hướng. Các chất phản ứng liên kết ngang có thể là BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) là có bán trên thị trường (ví dụ, của Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., U.S.A).

Phần tử liên kết có thể là "không phân cắt được" hoặc "có thể phân cắt được".

Theo phương án được ưu tiên, thuộc "phần tử liên kết có thể phân cắt được" tạo điều kiện thuận lợi để giải phóng được chất trong tế bào. Ví dụ, phần tử liên kết không bền với axit, phần tử liên kết nhạy với peptidaza, phần tử liên kết không bền với ánh sáng, phần tử liên kết dimetyl hoặc phần tử liên kết chứa disulfua có thể được sử dụng. Theo phương án được ưu tiên, phần tử liên kết có thể phân cắt được dưới các điều kiện nội bào, sao cho việc phân cắt phần tử liên kết này giải phóng được chất ra khỏi kháng thể trong môi trường nội bào.

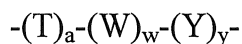
Ví dụ, theo một số phương án, phần tử liên kết có thể phân cắt được bởi chất phân cắt mà có mặt trong môi trường nuôi bào (ví dụ, trong lysosom hoặc endosom hoặc caveolea). Phần tử liên kết này có thể, ví dụ, là phần tử liên kết peptidyl mà được phân cắt bởi peptidaza nội bào hoặc enzym proteaza, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lysosom hoặc endosom proteaza. Thông thường, phần tử liên kết peptidyl có

chiều dài ít nhất hai axit amin liên tiếp hoặc ít nhất ba axit amin liên tiếp hoặc ít nhất hai axit amin hoặc ít nhất ba axit amin. Các chất phân cắt có thể bao gồm cathepsins B và D và plasmin, tất cả trong số chúng là đã biết để thủy phân các dẫn xuất được chất dipeptit dẫn đến được chất hoạt hoá bên trong tế bào đích. Ví dụ, phần tử liên kết peptidyl mà có thể phân cắt bởi cathepsin-B proteaza phụ thuộc thiol, mà được biểu hiện ở mức cao trong mô ung thư, có thể được sử dụng (ví dụ, phần tử liên kết bao gồm hoặc là Phe-Leu hoặc Gly-Phe-Leu-Gly). Theo phương án cụ thể, phần tử liên kết peptidyl có thể phân cắt bởi proteaza nội bào bao gồm hoặc là Val-Cit hoặc Phe-Lys. Một ưu điểm sử dụng quá trình giải phóng được chất bằng phân giải protein nội bào là được chất thường có độc lực giảm khi được tiếp hợp và độ ổn định huyết thanh của các thể tiếp hợp thường ở mức cao.

Theo phương án khác, phần tử liên kết có thể phân cắt được là nhạy với độ pH, nghĩa là, dễ bị thủy phân ở các giá trị độ pH nhất định. Thông thường, phần tử liên kết nhạy độ pH là có thể thủy phân trong các điều kiện axit. Ví dụ, phần tử liên kết không bền với axit mà có thể bị thủy phân trong lysosom (ví dụ, hydrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, cis-aconitic amit, orthoeste, axetal, ketal, hoặc tương tự) có thể được sử dụng. Các phần tử liên kết này là tương đối ổn định trong các điều kiện độ pH trung tính, như các điều kiện trong máu, nhưng không ổn định ở độ pH thấp hơn 5,5 hoặc 5,0, khoảng giá trị độ pH của lysosom. Theo các phương án nhất định, phần tử liên kết có thể thủy phân là phần tử liên kết thioete (như, ví dụ, thioete được gắn vào được chất thông qua liên kết axylhydrazon).

Theo các phương án khác nữa, phần tử liên kết là có thể phân cắt trong các điều kiện khử (ví dụ, phần tử liên kết disulfua). Các phần tử liên kết disulfua là đã được biết đến trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, các phần tử liên kết mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng SATA (N-suxinimidyl-S-axetylthioaxetat), SPDP (N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat), SPDB (N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrat) và SMPT (N-suxinimidyl-oxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)toluen).

Theo các phương án được ưu tiên nhất định, đơn vị phần tử liên kết có thể có công thức chung sau:



trong đó:

T là đơn vị kéo căng;

a là 0 hoặc 1;

W là đơn vị axit amin;

w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12;

Y là đơn vị đệm;

y là 0, 1 hoặc 2.

Đơn vị kéo căng (T), nếu có mặt, liên kết kháng thể với đơn vị axit amin (W) nếu có mặt hoặc với đơn vị đệm nếu có mặt hoặc trực tiếp với dược chất. Các nhóm chức hữu ích mà có thể có mặt trên kháng thể, được tạo ra trong tự nhiên hoặc được tạo ra bằng cách hoá học, bao gồm sulfhydryl, amino, hydroxyl, nhóm hydroxyl anome của hydratecacbon và carboxyl. Các nhóm chức thích hợp là sulfhydryl và amino. Các nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng cách khử các liên kết disulfua nội phân tử, nếu có mặt. Theo cách khác, các nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng phản ứng của nhóm amino của gốc lysin của kháng thể với 2-iminothiolan hoặc các chất phản ứng để tạo ra sulfhydryl khác. Theo phương án cụ thể, kháng thể được tạo ra để mang một hoặc nhiều lysin. Cụ thể hơn, kháng thể có thể được tạo ra để mang một hoặc nhiều Xystein (ấn phẩm của ThioMabs).

Theo các phương án cụ thể nhất định, đơn vị kéo căng tạo ra liên kết với nguyên tử lưu huỳnh của kháng thể. Nguyên tử lưu huỳnh có thể thu được từ nhóm sulfhydryl (-SH) của kháng thể đã được khử.

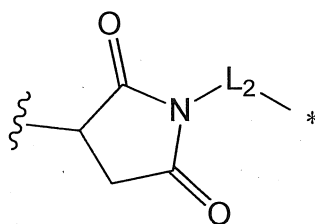
Theo các phương án cụ thể nhất định khác, đơn vị kéo căng được liên kết với kháng thể thông qua liên kết disulfua giữa nguyên tử lưu huỳnh của kháng thể và nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị kéo căng.

Theo phương án cụ thể khác, nhóm phản ứng của đơn vị kéo căng có vị trí phản ứng mà có thể phản ứng với nhóm amino của kháng thể. Nhóm amino có thể là nhóm arginin hoặc lysin. Vị trí phản ứng thích hợp của amin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các este được hoạt hoá (như succinimit este, 4-nitrophenyl este, pentaflorophenyl este), anhydrit, clorua axit, sulfonyl clorua, isoxyanat và isothioxyanat.

Theo khía cạnh khác nữa, nhóm chức phản ứng của đơn vị kéo căng có vị trí phản ứng mà phản ứng với nhóm hydratecacbon được biến đổi mà có thể có mặt trên

kháng thể. Theo phương án cụ thể, kháng thể được glycosyl hoá enzym để tạo ra gốc hydratcacbon hoặc được glycosyl hoá có trong tự nhiên. Hydratcacbon có thể được oxy hoá ở mức nhẹ với chất phản ứng như natri periodat và đơn vị carbonyl thu được của hydratcacbon được oxy hoá có thể được ngưng tụ với đơn vị kéo căng mà chứa nhóm chức như hydrazit, oxim, amin phản ứng, hydrazin, thiosemicarbazit, hydrazin carboxylat hoặc arylhydrazit.

Theo một phương án cụ thể, đơn vị kéo căng có công thức sau:



trong đó

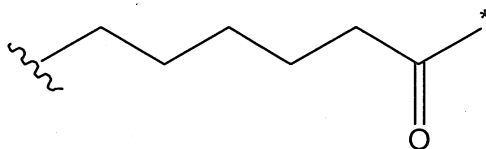
L_2 là (C_4-C_{10}) xycloalkyl-carbonyl, (C_2-C_6) alkyl hoặc (C_2-C_6) alkyl-carbonyl (các gốc xycloalkyl hoặc alkyl được liên kết với nguyên tử nitơ của gốc maleimit),

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào đơn vị axit amin, nếu có mặt, với đơn vị đệm, nếu có mặt hoặc với dược chất **D**, và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào kháng thể **Ab**.

Thuật ngữ “ (C_4-C_{10}) xycloalkyl” theo sáng chế có nghĩa là vòng hydrocacbon có 4 đến 10 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclopentyl, xyclohexyl và tương tự.

Có lợi, nếu L_2 có thể là (C_2-C_6) alkyl-carbonyl như pentyl-carbonyl có công thức sau:



trong đó

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào đơn vị axit amin, nếu có mặt, vào đơn vị đệm, nếu có mặt hoặc dược chất **D**; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào nguyên tử nitơ của gốc maleimit.

Đơn vị axit amin (W), nếu có mặt, liên kết đơn vị kéo căng (T) nếu có mặt hoặc theo cách khác kháng thể với đơn vị đệm (Y) nếu đơn vị đệm có mặt hoặc với được chất nếu đơn vị đệm không có mặt.

Như nêu trên, $(W)_w$ là không có mặt ($w = 0$) hoặc có thể là đơn vị dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit, hexapeptit, heptapeptit, octapeptit, nonapeptit, decapeptit, undecapeptit hoặc dodecapeptit, trong đó axit amin tạo ra các peptit có thể khác nhau.

Do đó, $(W)_w$ có thể được thể hiện theo công thức sau: $(W1)_{w1}(W2)_{w2}(W3)_{w3}(W4)_{w4}(W5)_{w5}$, trong đó mỗi W1 đến W5 thể hiện, độc lập với nhau, đơn vị axit amin và mỗi w1 đến w5 là 0 hoặc 1.

Theo một số phương án, đơn vị axit amin $(W)_w$ có thể bao gồm các gốc axit amin như các gốc có trong tự nhiên, cũng như các axit amin nhỏ và các chất tương tự axit amin không có trong tự nhiên, như xitruilin.

Gốc axit amin của đơn vị axit amin $(W)_w$ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tryptophan, prolin, lysin được bảo vệ hoặc không được bảo vệ bằng axetyl hoặc formyl, arginin, arginin được bảo vệ hoặc không được bảo vệ bằng các nhóm tosyl hoặc nitro, histidin, ornithin, ornithin được bảo vệ bằng axetyl hoặc formyl, và xitruilin. Các thành phần phân tử liên kết axit amin làm ví dụ tốt hơn là bao gồm dipeptit, tripeptit, tetrapeptit hoặc pentapeptit, đặc biệt là dipeptit hoặc tripeptit.

Các dipeptit làm ví dụ bao gồm: Val-Cit, Ala-Val, Ala-Ala, Val-Ala, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosyl-Arg, Phe-N⁹-Nitro-Arg.

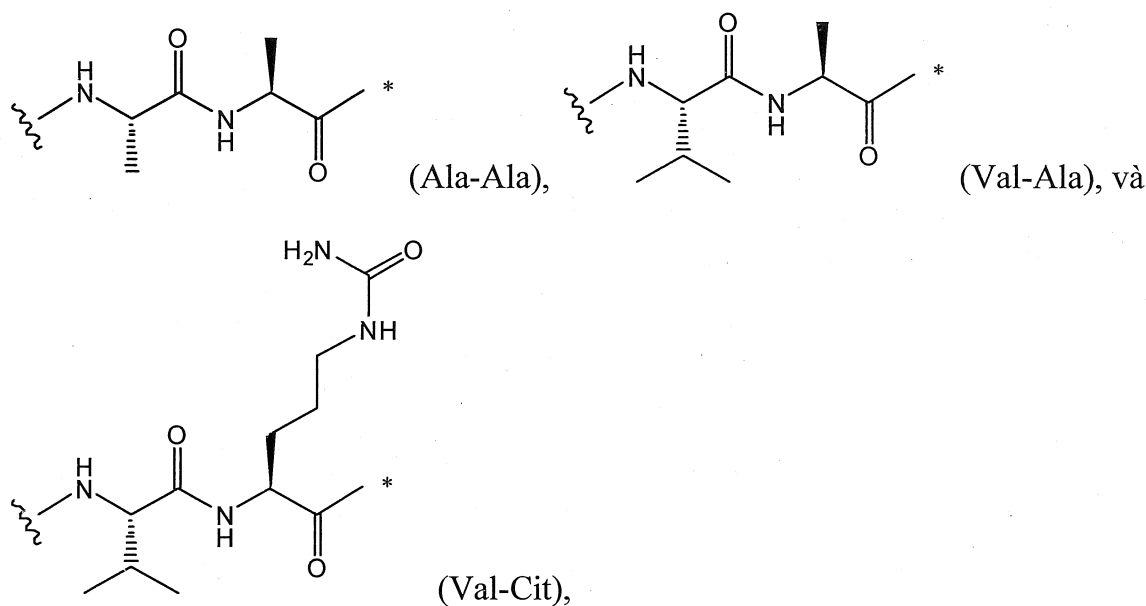
Các tripeptit làm ví dụ bao gồm: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys.

Các tetrapeptit làm ví dụ bao gồm: Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO.53), Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO.54).

Pentapeptit làm ví dụ bao gồm: Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO.55).

Theo phương án cụ thể, $(W)_w$ có thể là dipeptit (nghĩa là $w = 2$) như Val-Cit, hoặc phân tử liên kết không có đơn vị axit amin ($w=0$). Khi phân tử liên kết không có đơn vị axit amin, tốt hơn là cũng không có đơn vị đệm.

Theo phương án được ưu tiên, $w = 0$ (nghĩa là $(W)_w$ là một liên kết đơn) hoặc $w = 2$ (nghĩa là $(W)_w$ là dipeptit) và do đó $(W)_w$ có thể được chọn từ phân tử có công thức:



và cụ thể là Val-Cit,

trong đó

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào đơn vị đệm nếu có mặt hoặc vào dược chất **D**;

và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào L_2 .

Các thành phần liên kết axit amin có thể được tạo ra và được tối ưu hoá về tính chọn lọc của chúng để phân cắt enzym bởi enzym cụ thể, ví dụ, proteaza kết hợp khối u, cathepsin B, C và D hoặc plasmin proteaza.

Đơn vị axit amin của phân tử liên kết có thể được phân cắt enzym bởi enzym bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proteaza kết hợp khối u để giải phóng dược chất.

Đơn vị axit amin có thể được tạo ra và được tối ưu hoá về tính chọn lọc của nó để phân cắt enzym bởi proteaza kết hợp khối u cụ thể. Các đơn vị thích hợp là các đơn

vị và sự phân cắt của chúng được xúc tác bởi các proteaza, cathepsin B, C và D, và plasmin.

Đơn vị đệm (Y), nếu có mặt, liên kết đơn vị axit amin nếu có mặt hoặc đơn vị kéo căng nếu có mặt hoặc theo cách khác kháng thể với dược chất. Các đơn vị đệm thuộc hai dạng chung: tự thiêu và không tự thiêu. Đơn vị đệm không tự thiêu là đơn vị trong đó một phần hoặc tất cả đơn vị đệm vẫn được gắn kết với dược chất sau khi phân cắt enzym của đơn vị axit amin ra khỏi thể tiếp hợp kháng thể-dược chất. Các ví dụ về đơn vị đệm không tự thiêu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở đơn vị đệm (glyxin-glyxin) và đơn vị đệm glyxin. Để giải phóng dược chất, phản ứng thủy phân độc lập sẽ diễn ra trong tế bào đích để phân cắt đơn vị glyxin-dược chất được gắn kết.

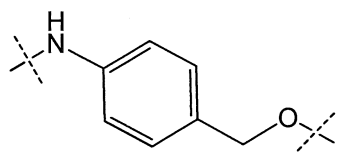
Theo phương án cụ thể, đơn vị đệm không tự thiêu (Y) là Gly.

Theo cách khác, tiếp hợp kháng thể-dược chất chứa đơn vị đệm không tự thiêu có thể giải phóng dược chất mà không cần bước thủy phân riêng biệt. Theo các phương án này, (Y) là gốc của đơn vị rượu p-aminobenzylic (PAB) mà được liên kết với (W)_w thông qua nguyên tử nitơ của nhóm PAB và được liên kết trực tiếp với dược chất thông qua nhóm este, cacbonat, carbamat hoặc etc.

Các ví dụ khác về các đơn vị đệm tự thiêu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất thơm mà tương đương điện tử với nhóm PAB như các gốc của các dẫn xuất 2-aminoimidazol-5-metanol và ortho hoặc para-aminobenzylaxetal. Các đơn vị đệm có thể được sử dụng mà trải qua quá trình đóng vòng dễ dàng khi quá trình thủy phân được gắn kết amit, như các amit của axit 4-aminobutyric được thể và không được thể, các hệ vòng bixyclo[2.2.1] và bixyclo[2.2.2] được thể thích hợp và các amit của axit 2-aminophenylpropionic.

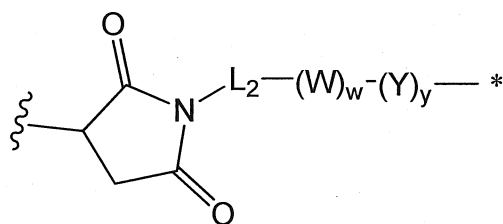
Theo phương án khác, đơn vị đệm là đơn vị bis(hydroxymetyl)styren (BHMS) mạch nhánh, mà có thể được sử dụng để hợp nhất các dược chất bổ sung.

Theo phương án cụ thể, đơn vị đệm (Y) là PAB-carbonyl với PAB có công thức



(oxy của đơn vị PAB được liên kết với carbonyl), và $y = 1$ hoặc phần tử liên kết không có đơn vị đệm ($y=0$).

Theo phương án cụ thể, phần tử liên kết có công thức (III) sau:

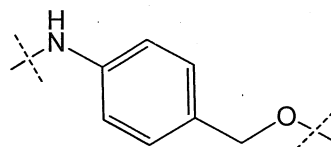


(III)

trong đó

L_2 là (C_4-C_{10}) cycloalkyl-carbonyl, (C_2-C_6) alkyl hoặc (C_2-C_6) alkyl-carbonyl (carbonyl của các gốc này, nếu có mặt, được liên kết với $(W)_w$),

W là đơn vị axit amin, với w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 5,

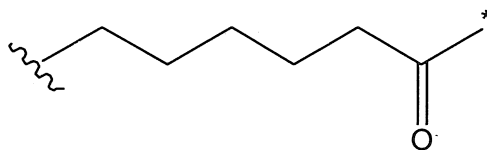


Y là PAB-carbonyl, với PAB là (oxy của đơn vị PAB được liên kết với carbonyl), và y là 0 hoặc 1 (tốt hơn là y là 0 khi w là 0 và y là 0 hoặc 1 khi w nằm trong khoảng từ 1 đến 5),

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào dược chất **D**, và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào kháng thể **Ab**.

Có lợi là, L_2 là (C_2-C_6) alkyl-carbonyl như pentyl-carbonyl có công thức sau:

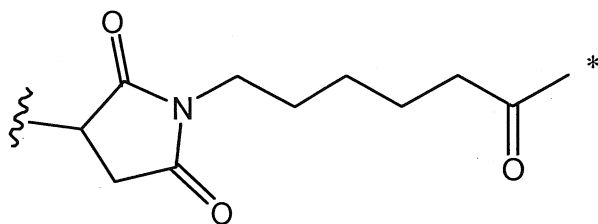
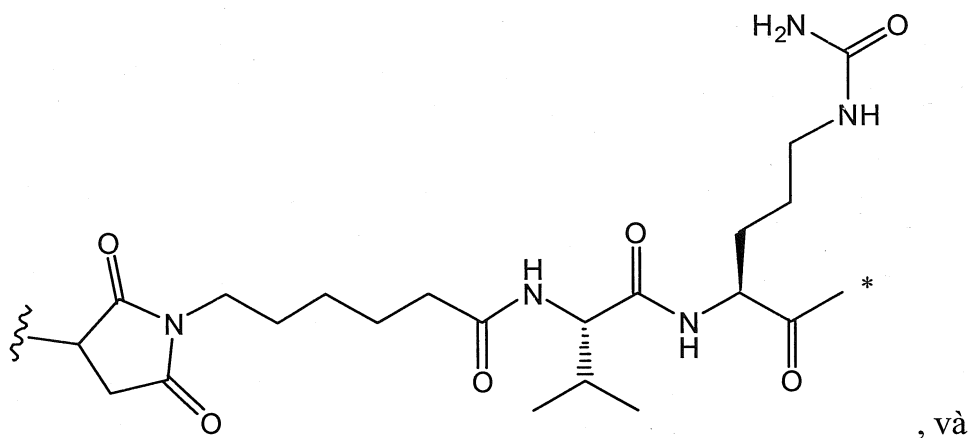
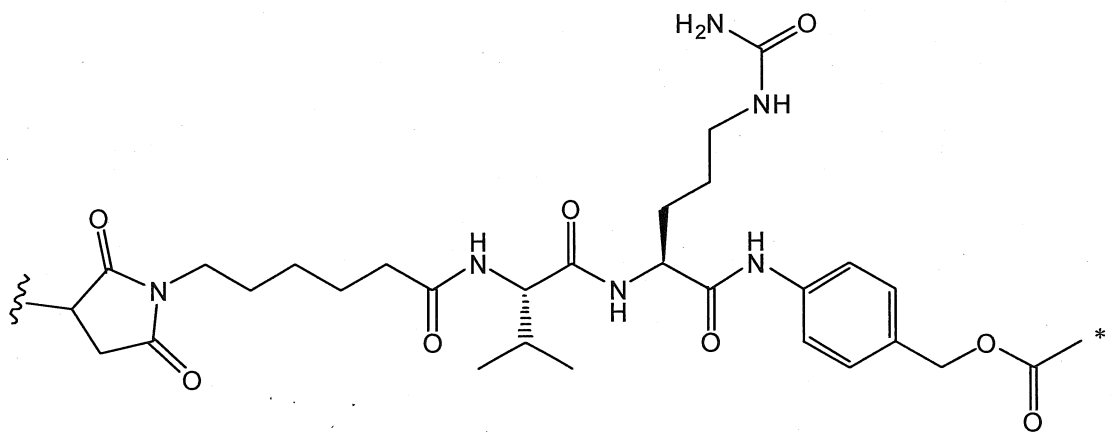


trong đó

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào $(W)_w$; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào nguyên tử nitơ của gốc maleimit.

Theo phương án được ưu tiên, phần tử liên kết **L** được chọn từ phần tử có công thức:



trong đó dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào dược chất **D** và đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào kháng thể **Ab**.

IV – Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC)

Theo phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết như, nhưng không chỉ giới hạn ở, i) phản ứng của nhóm ưa nhân của kháng thể với chất phản ứng liên kết hoá trị hai theo phản ứng với nhóm ưa nhân của dược chất hoặc ii) phản ứng của nhóm ưa nhân của dược chất với chất phản ứng liên kết hoá trị hai theo phản ứng với nhóm ưa nhân của kháng thể.

Nhóm ưa nhân trên kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm amin đầu tận cùng N, các nhóm amin mạch bên (ví dụ lysin), các nhóm thiol mạch bên và các nhóm đường hydroxyl hoặc amino khi kháng thể được glycosyl hoá.

Nhóm ưa nhân của dược chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm amin, thiol và hydroxyl và tốt hơn là các nhóm amin.

Các nhóm amin, thiol, và hydroxyl là các nhóm ưa nhân và có khả năng phản ứng để tạo ra các liên kết cộng hoá trị với các nhóm ưa điện tử trên các gốc liên kết và các chất phản ứng liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các este hoạt hoá như NHS este, HOBt este, haloformat và halogenua axit; alkyl và benzyl halogenua như haloaxetamid; aldehyt; keton; carboxyl; và các nhóm maleimide. Kháng thể có thể có các disulfua trong chuỗi có thể khử được, nghĩa là các cầu xystein. Kháng thể có thể được tạo ra phản ứng để tiếp hợp với các chất phản ứng liên kết bằng các xử lý với chất khử như DTT (dithiothreitol). Mỗi cầu xystein do đó sẽ tạo ra, theo lý thuyết, hai nhóm ưa nhân thiol phản ứng. Các nhóm ưa nhân bổ sung có thể được đưa vào kháng thể thông qua phản ứng bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Theo ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế, các nhóm thiol phản ứng có thể được đưa vào kháng thể bằng cách đưa vào một hoặc nhiều gốc xystein.

Các thể tiếp hợp kháng thể-dược chất cũng có thể được tạo ra bằng cách biến đổi kháng thể để đưa các gốc ưa điện tử, mà có thể phản ứng với các phần tử thể ưa nhân trên chất phản ứng liên kết. Các đường của kháng thể được glycosyl hoá có thể được oxy hoá để tạo ra các nhóm aldehyt hoặc keton mà có thể phản ứng với nhóm amin của các chất phản ứng liên kết hoặc dược chất. Các nhóm bazơ imin Schiff thu được có thể tạo ra liên kết ổn định hoặc có thể được khử để tạo ra liên kết amin ổn định. Theo một phương án, phản ứng của phần hydratecacbon của kháng thể được glycosyl hoá với galactose oxidase hoặc natri meta-periodat có thể thu được các nhóm carbonyl (aldehyt và keton) trong protein mà có thể phản ứng với các nhóm thích hợp trên dược chất. Theo phương án khác, protein chứa serin đầu tận cùng N hoặc các gốc threonine có thể phản ứng với natri meta-periodat, dẫn đến tạo ra aldehyt thay thế cho axit amin thứ nhất.

Theo phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế được tạo ra bằng cách tạo ra gốc dược chất-phần tử liên kết theo quá trình liên hợp

giữa nhóm ưa nhân của kháng thể (ví dụ nhóm SH của gốc xystein) và nhóm ưa điện tử của gốc dược chất-phần tử liên kết (ví dụ maleimit).

1. Dược chất-phần tử liên kết

Gốc dược chất-phần tử liên kết có thể được tạo ra bằng cách liên hợp:

- phần tử liên kết với dược chất,
- một phần của phần tử liên kết với dược chất trước khi hoàn thành quá trình tổng hợp phần tử liên kết,
- phần tử liên kết với phần hoặc tiền chất của dược chất trước khi hoàn thành quá trình tổng hợp dược chất, hoặc
- một phần của phần tử liên kết với một phần hoặc tiền chất của dược chất trước khi hoàn thành quá trình tổng hợp phần tử liên kết và dược chất.

Các phản ứng liên hợp là các phản ứng mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết giữa nhóm ưa nhân và nhóm ưa điện tử.

Cụ thể là, nhóm ưa nhân có thể là nhóm amin, thiol hoặc hydroxyl. Theo phương án được ưu tiên, nhóm ưa nhân là nhóm amin bậc một hoặc bậc hai.

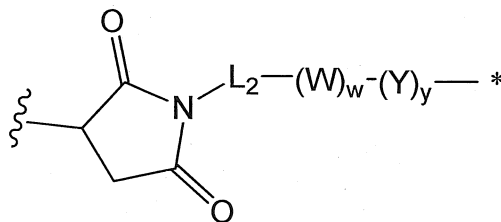
Nhóm ưa điện tử có thể là nhóm carboxylic axit (COOH) tùy ý ở dạng dược hoạt hoá hoặc gốc cacbonat este được hoạt hoá.

Thuật ngữ “dạng dược hoạt hoá” của carboxylic axit có nghĩa là carboxylic axit trong đó gốc OH của nhóm chức COOH đã được thay thế bằng nhóm rời chuyển được hoạt hoá (LG) cho phép liên hợp nhóm carboxylic axit được hoạt hoá với nhóm amino để tạo ra liên kết amit và giải phóng hợp chất LG-H. Các dạng dược hoạt hoá có thể là các este được hoạt hoá, amit được hoạt hoá, anhydrua hoặc axyl halogenua như axyl clorua. Các este được hoạt hoá bao gồm các dẫn xuất được tạo ra bằng phản ứng của nhóm carboxylic axit với N-hydroxybenzotriazol hoặc N-hydroxysuxinimit.

Thuật ngữ “cacbonat este được hoạt hoá” có nghĩa là cacbonat este bao gồm gốc $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}$ trong đó hoặc là nhóm rời chuyển tốt cho phép liên hợp cacbonat este được hoạt hoá với nhóm amino để tạo ra gốc carbamat và giải phóng hợp chất ROH. Nhóm R của cacbonat este được hoạt hoá bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-

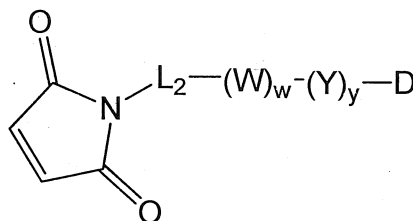
nitro-phenyl, pentaflorophenyl, 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl và các nhóm benzyl, tốt hơn là các nhóm p-nitro-phenyl và pentaflorophenyl.

Khi phân tử liên kết có công thức (III) sau:



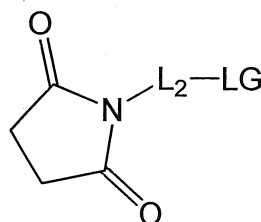
(III)

gốc được chất-phân tử liên kết có công thức (IV) sau:



(IV)

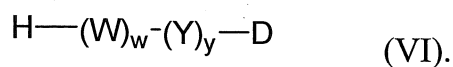
và bước cuối cùng của quá trình tổng hợp gốc được chất-phân tử liên kết thường là liên hợp giữa hợp chất có công thức (V) sau:



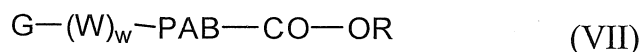
(V)

trong đó, L_2 là như được xác định trên đây và LG là nhóm rời chuyển đặc biệt là halogenua như clorua hoặc nhóm thu được từ N-hydroxysuxinimit,

và hợp chất có công thức (VI) sau:



Khi $y = 1$ và $\text{Y} = \text{PAB-carbonyl}$, hợp chất có công thức (VI) có thể được tạo ra bằng cách liên hợp giữa được chất (DH) và hợp chất có công thức (VII) sau, tốt hơn là dạng được bảo vệ của nó:



trong đó W và w như được xác định trên đây và R là như được xác định trong định nghĩa về cụm từ “cacbonat este được hoạt hoá” và G là H hoặc nhóm bảo vệ.

Khi hợp chất có công thức (VII) ở dạng được bảo vệ, bước cuối cùng của quá trình khử bảo vệ là cần thiết.

Khi $y = 0$, hợp chất (VI) có công thức $H-(W)_w-D$, trong đó $(W)_w$ và tốt hơn là D gồm có các đơn vị axit amin. Do đó, hợp chất (VI) có thể được tạo ra trong trường hợp này bằng phương pháp tổng hợp peptit thông thường mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

2. Ab-Phản tử liên kết-Dược chất

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế gồm có việc liên hợp giữa xystein có mặt trên kháng thể và nhóm ưa điện tử của gốc dược chất-phản tử liên kết, tốt hơn là với gốc maleimit có mặt trên gốc dược chất-phản tử liên kết.

Việc liên hợp maleimit-xystein có thể được thực hiện bằng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Nói chung, các kháng thể không chứa nhiều, nếu có, nhóm xystein thiol tự do và phản ứng mà có thể được liên kết với gốc dược chất. Hầu hết các gốc xystein thiol trong kháng thể tồn tại như các cầu disulfua và phải được khử bằng chất khử như dithiothreitol (DTT) hoặc TCEP, trong các điều kiện khử một phần hoặc hoàn toàn. Lượng (tỷ lệ dược chất/kháng thể) của ADC có thể được kiểm soát theo vài cách khác nhau, bao gồm: (i) giới hạn lượng mol dư của hợp chất trung gian dược chất-phản tử liên kết (D-L) hoặc chất phản ứng liên kết so với kháng thể, (ii) giới hạn thời gian hoặc nhiệt độ phản ứng tiếp hợp và (iii) khử một phần hoặc có giới hạn các điều kiện để biến đổi xystein thiol.

Cấu trúc được liên kết disulfua nêu trong mục IgG của người bây giờ được thiết lập (xem trong Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23). Trong thực tế, có nhiều tính tương tự và một số sự khác nhau liên quan đến các cấu trúc được liên kết disulfua của 4 lớp phụ IgG của người, cụ thể là IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Tất cả các lớp phụ IgG luôn chứa 12 cầu disulfua trong chuỗi và các khác nhau thuộc về các liên kết disulfua trong chuỗi của chúng được tạo ra giữa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Mỗi liên kết

disulfua trong chuỗi được kết hợp với miền IgG riêng rẽ, nghĩa là các miền biến đổi (VL và VH) và cố định (CL, CH1, CH2 và CH3). Hai chuỗi nặng được liên kết trong vùng bản lề của chúng bởi nhiều cầu disulfua khác nhau: 2 đối với IgG1 và IgG4, 4 đối với IgG2 và 11 đối với IgG3. Các chuỗi nặng và nhẹ nêu trong mục igG1 được nối bởi liên kết disulfua giữa gốc xystein cuối cùng của chuỗi nhẹ và gốc thứ năm của chuỗi nặng, trong khi đó đối với các lớp phụ khác, IgG2, IgG3 và IgG4, chuỗi nhẹ được liên kết với chuỗi nặng bởi liên kết disulfua giữa gốc xystein cuối cùng của chuỗi nhẹ và gốc xystein thứ ba của chuỗi nặng, mà được định vị ở giao diện của các miền VH và CH1. Các cấu trúc liên kết disulfua khác với các cấu trúc cổ điển này đã được mô tả đối với IgG2 và IgG4 (tham khảo Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23). Các liên kết disulfua trong chuỗi được tiếp xúc trong dung môi ở mức cao và do đó phản ứng nhiều hơn nữa so với các liên kết disulfua liên chuỗi, mà bị chìm trong các cấu trúc dạng tấm beta kháng song song trong mỗi miền và không được tiếp xúc với dung môi. Đối với các lý do này, trong khi đó kiểu tương đương, việc liên hợp sẽ diễn ra đối với các gốc xystein được tiếp xúc trong chuỗi sau khi khử không đáng kể. Do đó, mỗi cầu disulfua trong chuỗi có thể tạo ra, theo lý thuyết, hai vị trí tiếp hợp.

Các nhóm ưa nhân bổ sung có thể được đưa vào trong kháng thể thông qua phản ứng của lysin với 2-iminothiolan (chất phản ứng Traut) dẫn đến sự chuyển hoá của amin thành thiol. Các nhóm thiol phản ứng cũng có thể được đưa vào trong kháng thể (hoặc mảnh của nó) bằng cách thao tác di truyền một, hai, ba, bốn hoặc nhiều gốc xystein (ví dụ, tạo ra các kháng thể đột biến bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin xystein không nguyên thể). US 7521541 biểu thị phương pháp thao tác di truyền các kháng thể bằng cách đưa vào các axit amin xystein phản ứng.

Các axit amin xystein có thể được thao tác ở vị trí phản ứng trong kháng thể và mà không tạo ra các liên kết disulfua liên chuỗi hoặc nội phân tử (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Các xystein thiol được thao tác có thể phản ứng với các chất phản ứng liên kết hoặc các chất phản ứng được chất-phần tử liên kết theo sáng chế mà có các nhóm ưa điện tử phản ứng với thiol như maleimide hoặc alpha-halo amit để tạo ra ADC với các kháng thể được thao tác xystein và các gốc được chất. Do đó, việc định vị gốc được chất có thể được tạo ra, được kiểm soát và đã biết. Lượng được chất có thể được kiểm soát do các nhóm xystein thiol được

thao tác thường phản ứng với các chất phản ứng liên kết phản ứng với thiol hoặc chất phản ứng được chất-phần tử liên kết với hiệu suất cao. Kỹ thuật thao tác kháng thể IgG để đưa vào axit amin xystein bằng cách thay thế ở vị trí đơn lẻ trên chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ tạo ra hai xystein mới trên kháng thể đối xứng. Lượng được chất gần bằng 2 có thể đạt được với gần như đồng nhất của sản phẩm tiếp hợp ADC.

Khi nhiều hơn một nhóm ưa nhân hoặc nhóm ưa điện tử của kháng thể phản ứng với hợp chất trung gian được chất-kháng thể hoặc chất phản ứng liên kết tiếp theo chất phản ứng gốc được chất, thì sản phẩm thu được là hỗn hợp gồm các hợp chất ADC với sự phân bố các gốc được chất được gắn vào kháng thể, ví dụ 1, 2, 3, v.v. Các phương pháp sắc ký lỏng như sắc ký pha ngược polyme (polymeric reverse phase-PLRP) và tương tác kỵ nước (hydrophobic interaction-HIC) có thể tách biệt các hợp chất trong hỗn hợp bởi trị số lượng được chất. Tuy nhiên, việc tạo ra ADC có trị số lượng được chất đơn (p) có thể được phân tách, các ADC có trị số tải đơn này vẫn có thể là hỗn hợp dị tương đồng bởi các gốc được chất có thể được gắn vào, thông qua phần tử liên kết, ở các vị trí khác nhau trên kháng thể.

Đối với một vài thể tiếp hợp kháng thể-được chất, tỷ lệ được chất có thể được giới hạn bởi số lượng vị trí gắn trên kháng thể. Lượng được chất cao, ví dụ tỷ lệ được chất >5 , có thể gây ra sự quần tụ, tính không hoà tan hoặc mất tính thấm của tế bào của các thể tiếp hợp kháng thể-được chất nhất định. Thông thường, các gốc được chất ít hơn so với lượng tối đa theo lý thuyết được tiếp hợp với kháng thể trong thời gian phản ứng tiếp hợp.

Lượng được chất cũng được dùng để chỉ tỷ lệ được chất-kháng thể (DAR) là số trung bình của các được chất/tác nhân gắn kết tế bào.

Trong trường hợp kiểu tương đương IgG1 và IgG4, trong đó các được chất được gắn kết với xystein sau khi khử kháng thể một phần, lượng được chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 8 được chất (D)/kháng thể, nghĩa là trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, và 8 gốc được chất được gắn cộng hoá trị với kháng thể.

Trong trường hợp kiểu tương đương IgG2, trong đó các được chất được gắn kết vào xystein sau khi khử kháng thể một phần, lượng được chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 12 được chất (D)/kháng thể, nghĩa là trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 và 12 gốc được chất được gắn cộng hoá trị với kháng thể.

Các chế phẩm chứa ADC bao gồm nhóm tác nhân gắn kết tế bào, ví dụ các kháng thể, được tiếp hợp với các dược chất nằm trong khoảng từ 1 đến 8 hoặc 1 đến 12.

Số lượng trung bình của dược chất/kháng thể trong chế phẩm chứa ADC từ phản ứng tiếp hợp có thể được đặc trưng bởi các phương tiện thông thường như tia tử ngoại, HPLC pha ngược, HIC, phép đo phổ khối, thử nghiệm ELISA và điện di.

Theo phương án không giới hạn phạm vi của sáng chế, được thể hiện trong bản mô tả này là sự tiếp hợp với kháng thể c208F2. Trong trường hợp này, dược chất được liên hợp với ít nhất một xystein được chọn từ i) đối với chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.28, gốc Cys. ở vị trí 214 và ii) đối với chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.23, các gốc Cys. ở vị trí 223, 229 và 232.

Theo phương án không giới hạn phạm vi của sáng chế, được thể hiện trong bản mô tả này là sự tiếp hợp với kháng thể c208F2. Trong trường hợp này, dược chất được liên hợp với hai, ba hoặc bốn xystein được chọn từ i) đối với chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.28, gốc Cys. ở vị trí 214 và ii) đối với chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.23, các gốc Cys. ở vị trí 223, 229 và 232

Theo phương án không giới hạn phạm vi của sáng chế, được thể hiện trong bản mô tả này là sự tiếp hợp với kháng thể hz208F2 (ar. 1). Trong trường hợp này, dược chất được liên hợp với ít nhất một xystein được chọn từ i) đối với chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.39, gốc Cys. ở vị trí 214 và ii) đối với chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.37, các gốc Cys. ở vị trí 223, 229 và 232.

Theo phương án không giới hạn phạm vi của sáng chế, được thể hiện trong bản mô tả này là sự tiếp hợp với kháng thể hz208F2 (var. 3). Trong trường hợp này, dược chất được liên hợp với hai, ba hoặc bốn xystein được chọn từ i) đối với chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.40, gốc Cys. ở vị trí 214 và ii) đối với chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.38, các gốc Cys. ở vị trí 223, 229 và 232

Cách khác bao gồm việc liên hợp lysin. Kháng thể có thể chứa, ví dụ, nhiều gốc lysin mà không phản ứng với hợp chất trung gian dược chất-phần tử liên kết (D-L) hoặc chất phản ứng liên kết. Chỉ có hầu hết các nhóm lysin phản ứng có thể phản ứng với chất phản ứng liên kết phản ứng amin. Ngoài ra, chỉ có hầu hết các nhóm xystein thiol phản ứng có thể phản ứng với chất phản ứng liên kết phản ứng với thiol.

Nếu các hợp chất theo sáng chế được gắn kết với lysin, lượng dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 80 dược chất (D)/kháng thể tế bào, mặc dù giới hạn trên là 40, 20, 10 hoặc 8 có thể là được ưu tiên. Các chế phẩm chứa ADC chứa nhóm tác nhân gắn kết tế bào, ví dụ, các kháng thể, được tiếp hợp với các dược chất với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 80, 1 đến 40, 1 đến 20, 1 đến 10 hoặc 1 đến 8.

ADC có công thức (I) theo sáng chế có thể ở dạng muối dược dụng.

Theo sáng chế thuật ngữ “dược dụng” có nghĩa là có thể được sử dụng để bào chế dược phẩm mà nói chung, an toàn không độc và không có sự không mong muốn sinh học hoặc không mong muốn khác và có thể chấp nhận được để sử dụng trong thú y cũng như sử dụng trong dược phẩm dùng cho người.

Thuật ngữ “muối dược dụng” của hợp chất có nghĩa là muối mà dược dụng như được xác định trong bản mô tả này và có hoạt tính dược lý mong muốn của hợp chất ban đầu.

Cụ thể, các muối dược dụng bao gồm:

(1) các muối cộng của axit dược dụng được tạo ra với các axit vô cơ dược dụng như axit clohydric, axit bromhydric, axit phosphoric, axit sulfuric và các axit tương tự; hoặc được tạo ra với các axit hữu cơ dược dụng như axit axetic, axit trifloaxetic, axit propionic, axit succinic, axit fumaric, axit malic, axit tartric, axit xitric, axit ascorbic, axit maleic, axit glutamic, axit benzoic, axit salixylic, axit toluensulfonic, axit metansulfonic, axit stearic, axit lactic và các axit tương tự; và

(2) các muối cộng của bazơ dược dụng được tạo ra khi proton axit có mặt trong hợp chất ban đầu được thay thế bằng ion kim loại, ví dụ, ion kim loại kiềm, ion kim loại kiềm thổ hoặc ion nhôm; hoặc kết hợp với bazơ hữu cơ dược dụng như lysin, arginin và bazơ tương tự; hoặc với bazơ vô cơ dược dụng như natri hydroxit, kali cacbonat, canxi hydroxit và bazơ tương tự.

Các muối này có thể được tạo ra từ các hợp chất của sáng chế chứa nhóm chức bazơ hoặc axit và các axit hoặc bazơ tương ứng bằng cách sử dụng các phương pháp hoá học thông thường.

V – Điều trị bệnh

Cuối cùng, sáng chế đề xuất ADC như được mô tả trên đây để sử dụng làm dược chất, cụ thể là để điều trị ung thư.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức (I) như được xác định trên đây để sử dụng làm thuốc, cụ thể là để điều trị ung thư.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) như được xác định trên đây để sản xuất thuốc, đặc biệt là được dự định để điều trị ung thư.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị ung thư, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho người cần đến điều trị này dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) như được xác định trên đây.

Ung thư, tốt hơn là được chọn từ các loại ung thư liên quan đến IGF-1R bao gồm tế bào khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức toàn bộ hoặc một phần protein IGF-1R trên bề mặt của chúng.

Cụ thể hơn là, các loại ung thư này là ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư biểu mô thực quản, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày, u thần kinh đệm, ung thư phổi, khối u ác tính, xacôm xương, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư mô liên kết, ung thư thận, ung thư tuyến giáp, ung thư màng trong tử cung, u tế bào Schwann, u nguyên bào thần kinh, ung thư tế bào vảy ở miệng, u trung biểu mô, xacôm cơ trơn và hiện tượng khác được chất bất kỳ hoặc ung thư.

Để tránh nghi ngờ, theo ung thư biểu hiện IGF-1R kháng dược chất, phải được hiểu rằng không chỉ có các loại ung thư kháng dược chất mà ban đầu biểu hiện IGF-1R mà cả các loại ung thư mà ban đầu không biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức IGF-1R mà biểu hiện IGF-1R một khi chúng trở nên kháng quá trình điều trị trước.

Mục đích khác của sáng chế là dược phẩm chứa ADC như được mô tả trong bản mô tả này.

Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa ADC của sáng chế với ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược dạng lỏng dược dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tá dược dạng lỏng dược dụng” hoặc “tá dược” được dự định để biểu thị hợp chất hoặc hỗn hợp của các hợp chất có trong dược phẩm không gây ra phản ứng thứ cấp và mà cho phép, ví dụ, tạo điều kiện thuận lợi cho việc

dùng (các) hoạt chất, làm gia tăng tuổi thọ của nó và/hoặc hiệu quả của nó trong cơ thể, làm gia tăng khả năng hoà tan của nó trong dung dịch hoặc cũng cải thiện sự chuyển hoá của nó. Các tá dược dạng lỏng được dùng và các tá dược là đã biết và sẽ được chấp nhận bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này do chức năng tự nhiên và cách dùng (các) hoạt chất đã được chọn.

Hoạt chất này có thể được dùng ở các dạng đơn vị, trong hỗn hợp với các chất mang dùng trong dược phẩm thông thường, cho động vật hoặc cho người. Các dạng đơn vị thích hợp bao gồm các dạng dùng qua đường miệng và các dạng dùng qua đường ngoài đường tiêu hoá (dưới da, trong da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch).

Là dược phẩm dạng rắn, để dùng qua đường miệng, có thể sử dụng viên nén, viên tròn, bột (nang gelatin dạng rắn hoặc mềm) hoặc hạt. Trong các dược phẩm này, hoạt chất của sáng chế được trộn với một hoặc nhiều chất pha loãng trợ như tinh bột, xeluloza, sucroza, lactoza hoặc silic oxit, trong dòng khí argon. Các dược phẩm này cũng có thể chứa các chất không phải chất pha loãng, ví dụ, một hoặc nhiều chất làm trơn như magie stearat hoặc bột talc, chất tạo màu, chất bao ngoài (viên nén được bao ngoài) hoặc véc-ni.

Tốt hơn, nếu các dược phẩm vô trùng để dùng ngoài đường tiêu hoá có thể là dung dịch chứa nước hoặc không chứa nước, các huyền phù hoặc nhũ tương. Là dung môi hoặc tá dược dạng lỏng, có thể sử dụng nước, propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật, cụ thể là dầu ôliu, các este hữu cơ dùng để tiêm, ví dụ, etyl oleat hoặc các dung môi hữu cơ, thích hợp khác. Các dược phẩm này cũng có thể chứa các chất bổ trợ, cụ thể là chất thấm ướt, chất đẳng trương, chất tạo nhũ tương và chất làm ổn định. Việc làm vô trùng có thể được thực hiện theo nhiều cách, ví dụ, bằng cách lọc hợp vệ sinh, bằng cách đưa các chất vô trùng vào trong dược phẩm, bằng cách bức xạ hoặc bằng cách gia nhiệt. Chúng cũng có thể được tạo ra ở dạng dược phẩm vô trùng dạng rắn mà có thể được hoà tan khi sử dụng trong nước vô trùng hoặc môi trường vô trùng dùng để tiêm khác.

Tốt hơn là, các ADC này sẽ được dùng qua đường dùng nội hấp, cụ thể là qua đường tĩnh mạch, qua đường trong cơ, trong da, trong bụng hoặc dưới da hoặc qua đường miệng. Theo cách được ưu tiên hơn, dược phẩm chứa ADC theo sáng chế sẽ được dùng vài lần, theo trình tự.

Do đó, sáng chế còn đề cập đến kit chứa ít nhất i) thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo sáng chế và/hoặc được phẩm theo sáng chế và ii) ống tiêm hoặc lọ nhỏ hoặc ống thuốc tiêm trong đó thể tiếp hợp kháng thể-được chất và/hoặc được phẩm này được phân phối vào.

Các chế độ dùng của chúng, các liều lượng và dạng được phẩm tối ưu có thể được xác định theo các tiêu chuẩn nói chung được tính đến trong việc thiết lập điều trị được chấp nhận đối với người bệnh như, ví dụ, tuổi hoặc thể trọng của người bệnh, mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý nói chung, sự dung nạp với việc điều trị và tác dụng thứ cấp được kể đến.

Các đặc tính và ưu điểm của sáng chế sẽ thấy được tiếp theo trong phần mô tả các ví dụ thực hiện sáng chế và các hình vẽ mà phần giải thích của chúng được thể hiện dưới đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra các kháng thể của chuột tăng kháng IGF-1R ECD

Để tạo ra các kháng thể đơn dòng của chuột (Mab) kháng miễn ngoại bào của người (ECD) của thụ thể IGF-1 của người (hIGF-1R), 5 chuột BALB/c được gây miễn dịch 3 lần dưới da bằng 10 μ g rhIGF-1R protein (R&D Systems, Cat N°391-GR). Theo cách khác, ba lần gây miễn dịch bổ sung với 10 μ g miễn ngoại bào của chuột (ECD) nêu trong mục iGF-1R (R&D Systems, Cat N°6630-GR /Fc) được thực hiện đối với một vài động vật. Lần gây miễn dịch thứ nhất được thực hiện với sự có mặt của tá được Freund đầy đủ (Sigma, St Louis, MD, USA). Tá được Freund không đầy đủ (Sigma) được bổ sung vào các lần gây miễn dịch tiếp theo. Ba ngày trước khi dung hợp, chuột được gây miễn dịch được lặp lại với 10 μ g rhIGF-1R protein. Sau đó, tế bào lá lách và tế bào lympho lần lượt được tạo ra bằng cách truyền vào lá lách và bằng cách cắt nhỏ hạch bạch huyết ở đầu gần, thu hoạch từ 1 trong số 5 chuột đã được gây miễn dịch (được chọn sau khi chuẩn độ huyết thanh tất cả các chuột) và được dung hợp với tế bào u tuỷ SP2/0-Ag14 (ATCC, Rockville, MD, USA). Quy trình dung hợp được mô tả bởi Kohler và Milstein (Nature, 256:495-497, 1975). Sau đó, tế bào đã được dung hợp được chọn lọc HAT. Nói chung, để tạo ra các kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh chức năng của chúng, đặc biệt là có nguồn gốc từ chuột, có thể kể đến các kỹ thuật mà được mô tả một cách cụ thể là trong sổ tay “Antibodies” (Harlow and

Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988). Khoảng 10 ngày sau khi dung hợp, các khuẩn lạc tế bào lai được sàng lọc. Đối với lần sàng lọc đầu tiên, dịch nổi chứa các thể lai được đánh giá đối với quá trình tiết Mab tăng kháng IGF-1R ECD protein bằng cách phân tích FACS bằng cách sử dụng tế bào khối u vú của người MCF7 (ATCC) và/hoặc tế bào COS7 của khỉ (thận của khỉ xanh châu Phi SV40 đã được biến nạp) mà biểu hiện IGF-1R của khỉ trên bề mặt tế bào của chúng. Chính xác hơn, để chọn lọc bằng phép đo dòng tế bào, 10^5 tế bào (MCF7 hoặc COS7) được gia cấy vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ trong PBS chứa 1% BSA và 0,01% natri azit (dung dịch đệm FACS) ở 4°C. Sau 2 phút ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút, dung dịch đệm được loại bỏ và dịch nổi chứa thể lai cần được thử nghiệm được bổ sung vào. Sau 20 phút ủ ở 4°C, tế bào đã được rửa hai lần và kháng thể của dê kháng chuột được tiếp hợp Alexa 488 1/500° được pha loãng trong dung dịch đệm FACS (#A11017, Molecular Probes Inc., Eugene, USA) được bổ sung vào và ủ trong 20 phút ở 4°C. Sau lần rửa cuối cùng bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào đã được phân tích bằng FACS (Facsclibur, Becton-Dickinson) sau khi bổ sung propidi iodua vào mỗi ống ở nồng độ cuối cùng 40µg/ml. Các lỗ chứa tế bào đơn lẻ và tế bào được ủ với kháng thể được tiếp hợp Alexa 488 thứ cấp được đưa vào làm các đối chứng âm tính. Các đối chứng kiểu tương đương đã được sử dụng trong mỗi thử nghiệm (Sigma, ref M90351MG). Ít nhất 5000 tế bào được đánh giá để tính toán trị số trung bình của cường độ huỳnh quang (MFI).

Ngoài ra, thử nghiệm nội bào hoá được thực hiện để chỉ chọn các kháng thể nội bào hoá. Đối với thử nghiệm này, dòng tế bào khối u MCF7 được nuôi cấy trong RMPI 1640 mà không có đỏ phenol với 1% L-glutamin và 10% FACS trong 3 ngày trước thử nghiệm. Sau đó, đã tách các tế bào bằng cách sử dụng trypsin và 100µl huyền phù tế bào ở 4×10^5 tế bào/ml được gia cấy trong các đĩa có 96 lỗ trong RPMI1640 mà không có đỏ phenol với 1% L-glutamin và 5% FBS. Sau 2 phút ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút, các tế bào được tạo huyền phù trong 50µl dịch nổi chứa thể lai hoặc dung dịch chứa kháng thể đối chứng (các đối chứng dương tính và kiểu tương đương ở 1µg/ml). Sau 20 phút ở 4°C, các tế bào đã được ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 2000 vòng/phút và đã được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh lạnh (4°C) hoặc ấm (37°C). Sau đó, các tế bào đã được ủ trong 2 giờ ở 37°C hoặc ở 4°C. Tiếp đó, rửa các tế bào ba lần bằng dung dịch đệm FACS. Kháng thể của dê

kháng chuột IgG được đánh dấu Alexa 488 được ủ trong 20 phút và các tế bào đã được rửa ba lần trước khi phân tích FACS đối với quần thể tế bào âm tính với propidi iodua.

Sau khi phân tích FACS, hai tham số đã được xác định: (i) chênh lệch của tín hiệu huỳnh quang được phát hiện trên bề mặt của tế bào được ủ ở 4°C với các tín hiệu thu được với tế bào được ủ ở 37°C với một dịch nổi chứa thể lai và (ii) tỷ lệ phần trăm nêu trong mục iGF-1R còn lại trên bề mặt tế bào.

Tỷ lệ phần trăm của hIGF 1R còn lại được tính toán như sau: % IGF-1R còn lại = $(\text{MFI}_{\text{Ab } 37^{\circ}\text{C}} / \text{MFI}_{\text{Ab } 4^{\circ}\text{C}}) \times 100$.

Ngoài ra, ba ELISA được thực hiện (trước hoặc sau khi tạo dòng) để nghiên cứu sự gắn kết của các kháng thể đối với các protein tái tổ hợp của người (hIGF-1R) và (mIGF-1R) của chuột và đối với protein thụ thể Insulin tái tổ hợp của người (hIR). Thể lai sàng lọc kháng thể thể hiện sự gắn kết đối với rh- và/hoặc rm-IGF-1R và không gắn kết đối với rhIR được giữ lại. Tóm lại, đĩa ELISA có 96 lỗ (Costar 3690, Corning, NY, USA) được gia cấy 100µl/lỗ rhIGF-1R protein (R&D Systems, cat N°391-GR) ở 0,6µg/ml hoặc rmIGF-1R protein (R&D Systems, cat N°6630-GR/Fc) ở 1µg/ml hoặc rhIR protein (R&D Systems, cat N°1544-IR/CF) ở 1µg/ml trong PBS qua đêm ở 4°C. Sau đó, phong bế các đĩa với PBS chứa 0,5% gelatin (#22151, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) trong 2 giờ ở 37°C. Một khi dung dịch đệm bão hòa được xả ra bằng cách gõ nhẹ các đĩa, 100µl mỗi dung dịch pha loãng dịch nổi được bổ sung vào mỗi lỗ (dịch nổi thể lai không được pha loãng hoặc dung dịch pha loãng theo bậc chứa dịch nổi) và ủ trong 1 giờ ở 37°C. Sau ba lần rửa, 100µl IgG đa dòng của dê kháng chuột được tiếp hợp horseradish peroxidaza (#115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) được bổ sung vào ở nồng độ pha loãng 1/5000 trong PBS chứa 0,1% gelatin và 0,05% Tween 20 (trọng lượng) trong 1 giờ ở 37°C. Sau đó, các đĩa ELISA được rửa 3 lần và nền TMB (#UP664782, Uptima, Interchim, France) được bổ sung vào. Sau 10 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, làm ngừng phản ứng bằng cách sử dụng dung dịch axit sulfuric 1M và đo mật độ quang học ở 450nm.

Thể lai sàng lọc kháng thể đáng quan tâm được mở rộng và tạo dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Một khi đã được tạo kiểu tương đương, một dòng của mỗi mã được mở rộng và được làm đông lạnh. Mỗi kháng thể đáng quan tâm được tạo ra trong

hệ thống sản xuất *in vitro* được gọi là CellLine (Integra Biosciences) để tiếp tục xác định đặc tính.

Các thử nghiệm bổ sung để hướng đến các phân tích FACS có tính đặc hiệu gắn kết được thực hiện đối với tế bào IM9 (IR của người biểu hiện nguyên bào lympho B) cũng như đối với tế bào đã được gây nhiễm hIGF-1R so với tế bào không được gây nhiễm.

Tất cả các dữ liệu tương ứng với các kháng thể đã được chọn được tổng kết trong bảng 7 và chứng minh rằng năm kháng thể đã được chọn nhận biết tốt IGF-1R nguyên thể của người được biểu hiện trên tế bào ung thư vú MCF-7 hoặc trên tế bào đã được gây nhiễm. Chúng cũng đã nhận biết IGF-1R của khỉ trên tế bào COS-7. Các kháng thể này không phản ứng ngang với thụ thể insulin của người được biểu hiện ở mức cao trên tế bào IM9. Cũng đã thấy rằng các kháng thể này nhận biết kém rhIGF-1R ECD protein khi được gia cây trực tiếp vào các đĩa ELISA.

Bảng 7

Tên thể lai	Kiểu tương đương	CNCM	ELISA (SNT ở 5µg/ml) D.O			Thử nghiệm nội bào hoá MCF7 (SNT ở 5µg/ml)				FACS (SNT at 5µg/ml)			
			450nm			MFI		Δ (MFI 4°C - MFI 37°C)	IM9 (h IR ⁺)	Cos-7 (IGF1R ⁺ của khí)	Tf hIGF1R ⁺	Không có tế bào Tf (h IGF1R)	
			rh IGF-1R	rm IGF-1R	rh Insulin R	4°C	37°C						
208F2	IgG1 K	I-4757	0.163	0.099	0.140	355	94	261	4	106	2197	22	
212A11	IgG1 K	I-4773	0.232	0.102	0.141	390	106	284	7	125	2187	23	
213B10	IgG1 K	I-4774	0.399	0.127	0.110	386	115	271	7	122	2055	23	
214F8	IgG1 K	I-4775	0.349	0.102	0.115	386	111	275	7	132	2137	20	
219D6	IgG1 K	I-4736	0.329	0.112	0.106	349	106	243	7	114	2110	21	

Ví dụ 2: Kháng thể gắn kết với IGF-1R nguyên thể của người bằng phân tích FACS

Năm kháng thể IGF-1R của chuột được tạo khảm. Các đặc tính gắn kết của kháng thể IGF-1R của cả chuột và khảm được đánh giá bằng các phân tích FACS đối với dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến vú MCF-7 của người (ATCC#HTB-22) sử dụng các nồng độ kháng thể gia tăng. Đối với mục đích đó, tế bào (1×10^6 tế bào/ml) được ủ với các kháng thể IGF-1R trong 20 phút ở 4°C trong dung dịch đệm FACS (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, chúng được rửa ba lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối trước khi được rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Sự gắn kết của các kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay đối với tế bào có thể sống được mà được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua (mà nhuộm tế bào chết). Lượng tối đa cường độ tín hiệu thu được với mỗi kháng thể được tạo ra là $B_{\max}$ và được biểu hiện theo trị số trung bình của cường độ huỳnh quang (MFI). EC_{50} của gắn kết được thể hiện theo số mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

Đường cong chuẩn độ của mỗi Ab của chuột hoặc khảm biểu thị rằng tất cả các kháng thể được tạo ra có khả năng nhận biết dạng IGF-1R nguyên thể với khả năng bão hoà thông thường (Fig.1A). Để phân hạng kháng thể và để so sánh các đặc tính gắn kết của Ab của cả chuột và khảm, EC_{50} gắn kết của mỗi hợp chất được xác định bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính. Việc so sánh EC_{50} của mỗi Ab của chuột với dạng khảm tương ứng của nó thể hiện rằng 2 dạng đã thể hiện cùng đặc tính gắn kết biểu thị rằng việc tạo khảm hoá Ab không tác động đến việc nhận biết IGF-1R (Các hình vẽ Fig.1B đến Fig.C). Các trị số EC_{50} và $B_{\max}$ của các kháng thể khảm được tổng kết trong bảng 8.

Bảng 8

AC	B _{max}	EC ₅₀
c208F2	981	6.7E-10
c212A11	991	6.7E-10
c214F8	1069	5.0E-10
c219D6	993	4.7E-10
c213B10	1103	4.4E-10

Ví dụ 3: Xác nhận tính đặc hiệu của kháng thể bằng cách sử dụng tế bào được gây nhiễm IGF-1R hoặc IR hoặc tế bào IM9 mà biểu hiện mức IR đáng kể

Để xác nhận tính đặc hiệu của các kháng thể được tạo ra đối với IGF-1R so với IR, các thể gây nhiễm ổn định biểu hiện hIGF-1R hoặc hIR được đánh giá bằng phân tích FACS. Tóm lại, nồng độ gia tăng của các mAb khảm được ủ với tế bào trong 20 phút ở 4°C trong dung dịch đệm FACS (PBS, 0,1%BSA, 0,01% NaN₃). Sau đó, tế bào được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trước khi được ủ trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối và sau đó rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Sự gắn kết của các kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay đối với tế bào có thể sống được mà được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua (mà nhuộm tế bào chết). EC₅₀ gắn kết được biểu hiện theo mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

Các đường cong chuẩn độ thu được đối với dòng tế bào được gây nhiễm hIGF-1R (Fig.2A) so với tế bào không được gây nhiễm (Fig.2B) xác nhận tính đặc hiệu gắn kết của các Ab khảm đối với IGF-1R của người. Các trị số EC₅₀ và B_{max} được tổng kết trong bảng 9.

Bảng 9

Ac	B _{max}	EC ₅₀ (M)
c208F2	2008	3.2E-10
c212A11	2513	4.4E-10
c214F8	2094	2.7E-10
c219D6	2521	5.5E-10
c213B10	2029	3.3E-10

Để xác nhận sự không có mặt gắn kết của các kháng thể của cả chuột và khảm đối với hIR, dòng tế bào ổn định biểu hiện IR của người (hIR) được sử dụng. Việc nhận biết hIR bề mặt tế bào của người bởi Ab của cả chuột và khảm được thực hiện bằng phân tích FACS. Nồng độ gia tăng của các mAb của chuột hoặc khảm được ủ đối với dòng tế bào được gây nhiễm hIR⁺ trong 20 phút ở 4°C trong dung dịch đệm FACS (PBS, 0,1%BSA, 0,01% NaN₃). Sau đó, tế bào được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trước khi được ủ trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối và sau đó rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Việc gắn kết của các kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay đối với tế bào có thể sống được mà được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua (mà nhuộm tế bào chết). EC₅₀ gắn kết được biểu hiện theo mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0). Kháng thể kháng hIR dòng GRO5 được sử dụng làm đối chứng dương tính. Các kháng thể 9G4 của chuột và khảm được đưa vào làm các kháng thể không phù hợp.

Mức độ biểu hiện cao của hIR trên bề mặt tế bào của tế bào được gây nhiễm được xác nhận bằng cách sử dụng kháng thể kháng hIR thương mại GRO5 (Fig.3A và Fig.3B). Thậm chí bằng cách sử dụng các nồng độ cao của các hIGF-1R Ab của chuột (Fig.3A) hoặc khảm (Fig.3B), không quan sát được sự gắn kết trên bề mặt tế bào của tế bào được gây nhiễm hIR⁺. Các kết quả này biểu thị rằng không phải Ab kháng hIGF-1R của chuột cũng không phải khảm đã nhận dạng hIR.

Tính đặc hiệu nhận biết này của hIGF-1R so với IR cũng đã được chứng minh, bằng cách phân tích FACS, bằng cách sử dụng tế bào IM9, dòng tế bào u lympho B mà biểu hiện hIR (Fig.4). Đối với các phân tích FACS này, quy trình là giống như quy trình được mô tả trên đây và các kháng thể của chuột được sử dụng để ngăn ngừa khả năng phản ứng ngang của Ab kháng người thứ cấp (tế bào IM9 biểu hiện Ig của người trên bề mặt tế bào). Các kết quả được thể hiện trên Fig.4 đã chứng minh một lần nữa rằng tín hiệu được mong đợi được quan sát bằng cách sử dụng kháng thể kháng hIR GRO5 trong khi không có kháng thể của chuột nào được đánh giá thể hiện tín hiệu gắn kết đáng kể bất kỳ đối với dòng tế bào này.

Ví dụ 4: Kháng thể gắn kết với IGF-1R nguyên thể của khỉ bằng phân tích FACS và Biacore

Một trong số các yêu cầu đầu tiên đối với các nghiên cứu độc điều hoà là để phát hiện loài động vật thích hợp để đánh giá hợp chất được chọn. Do đây kháng thể được mô tả trong bản mô tả này là không có khả năng nhận biết IGF-1R của chuột, loài tương tự nhất để đánh giá độc là động vật linh trưởng không phải người (NHP).

Để đánh giá sự gắn kết của các kháng thể kháng IGF-1R đối với IGF-1R của khỉ, sự gắn kết của các kháng thể kháng hIGF-1R của cả chuột và khảm thứ nhất được đánh giá bằng FACS đối với dòng tế bào COS-7 bằng cách sử dụng nồng độ kháng thể gia tăng. Tế bào (1×10^6 tế bào/ml) được ủ với các kháng thể kháng IGF-1R trong 20 phút ở 4°C trong dung dịch đệm FACS (PBS, 0,1%, BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, tế bào được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trước khi được ủ trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối và cuối cùng rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Việc gắn kết của các kháng thể kháng IGF-1R được đánh giá ngay đối với tế bào có thể sống được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua (mà nhuộm tế bào chết). EC_{50} gắn kết được biểu hiện theo mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

Đường cong chuẩn độ thu được đối với dòng tế bào của khỉ COS-7 thể hiện rằng, tất cả Ab kháng hIGF-1R nhận biết một cách đặc hiệu IGF-1R được biểu hiện trên bề mặt của dòng tế bào của khỉ (Fig.5A). Việc xác định, EC_{50} đối với mỗi Ab của chuột và khảm biểu thị rằng 2 dạng lỗ được so sánh liên quan đến các đặc tính gắn kết của chúng đối với IGF-1R của khỉ (Fig.5B). Các kết quả này thể hiện rằng tất cả kháng hIGF-1R được tạo ra nhận biết IGF-1R của khỉ.

Việc so sánh EC_{50} gắn kết trên tế bào COS-7 so với các tế bào IGF-1R được gây nhiễm được thực hiện để xác nhận độ lớn nhận biết kháng thể khảm đối với IGF-1R của người so với khỉ. Các kết quả được thể hiện trên Fig.5C biểu thị việc nhận biết tương tự các IGF-1R của người và khỉ bởi tất cả các kháng thể.

Để xác nhận việc nhận biết dạng khác của khỉ, tế bào được gây nhiễm với dạng IGF-1R của khỉ *Cynomolgus* để tạo ra IGF-1R ECD có thể hoà tan của khỉ và các thử

thử nghiệm Biacore được thực hiện với một trong số các kháng thể khảm (c208F2) để so sánh các đặc tính gắn kết của nó hIGF-1R hoặc IGF-1R của Cynomolgus.

Các thử nghiệm nhận biết được thực hiện trên thiết bị Biacore X100 bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 được hoạt hoá bởi kháng thể kháng Tag His (His bắt giữ kit GE Healthcare số 28-9950-56). Hơn 11000 RU kháng thể được ghép hoá học trên cơ chất cacboxymetyldextran bằng cách sử dụng ngành hoá học kit amin. Các thử nghiệm được thực hiện ở 25°C với tốc độ dòng 30µl/phút bằng cách sử dụng dung dịch đệm HBS-EP (GE Healthcare) làm dung dịch đệm chạy và pha loãng mẫu. Sơ đồ động một chu kỳ được sử dụng để xác định các tham số động học gắn kết của dạng khảm của kháng thể 208F2 (c208F2) đối với hIGF-1R so với Macaca IGF-1R

Dung dịch chứa phiên bản tái tổ hợp có thể hoà tan của cấu trúc bậc bốn dị tương đồng IGF-1R gồm có các chuỗi 2 α và các miền ngoại bào của các chuỗi 2 β được biểu hiện với 10-His tag đầu tận cùng C bổ sung, dựa vào trình tự của người (R&D Systems số 305-GR-50) hoặc một trong số cynomolgus (được tạo ra nội bộ) được tiêm 1 phút đối với tế bào đo dòng thứ cấp ở nồng độ pha loãng được xác định để bắt giữ khoảng 160 RU kháng nguyên. Sau pha bắt giữ, dung dịch đệm chạy được tiêm 5 lần (mỗi lần tiêm 90 giây) hoặc khoảng tăng dần gồm 5 nồng độ của c208F2 được tiêm (mỗi lần tiêm 90 giây) trên cả hai tế bào đo dòng. Khi kết thúc lần tiêm thứ năm, dung dịch đệm chạy được chuyển qua để xác định tốc độ phân ly.

Sau đó, bề mặt được tạo ra với việc tiêm 10mM Glyxin, dung dịch đệm HCl có độ pH=1,5 trong 30 giây.

Tín hiệu được tính toán tương ứng với sự khác nhau giữa đáp ứng của tế bào đo dòng 2 (với IGF-1R được bắt giữ) và đáp ứng của tế bào đo dòng 1 (mà không có các phân tử IGF-1R bất kỳ) (Fig.6).

Đối với mỗi phân tử IGF-1R (người hoặc cyno), tín hiệu do tiêm khoảng nồng độ tăng dần c208F2 được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi tín hiệu thu được với 5 lần tiêm dung dịch đệm (viện dẫn hai lần). Biểu đồ tín hiệu thu được được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Biaevaluation với mô hình theo tỷ lệ 1:1. Tốc độ động học được đánh giá độc lập (2 tốc độ động học gắn kết c208F2 mỗi với mỗi IGF-1R) hoặc thông

thường (cùng tốc độ động học gắn kết c208F2 đối với IGF-1R của người và cynomolgus). Chất lượng fit được đánh giá theo tỷ lệ Chi2/Rmax thấp hơn 0,05 RU.

Tốc độ động học gắn kết (xem bảng 10) được xác định riêng biệt đối với mỗi IGF-1R là gần bằng và fit của cả hai biểu đồ tín hiệu với cùng tốc độ động học là thuộc chất lượng tốt.

Kháng thể c208F2 cũng nhận biết IGF-1R tái tổ hợp của người và cynomolgus với hằng số phân ly (KD) khoảng 0,2nM. Các ái lực được xác định trong nghiên cứu này tương ứng với các ái lực chức năng (các ái lực) của các kháng thể đối với hàm lượng IGF-1R của người và cynomolgus được bắt giữ khoảng 160 RU.

Bảng 10

IGF1R	kon [1/M.s]	koff [1/s]	Kd [nM]	Chi2/Rmax
human	1,52E+06	3,40E-04	0,23	0,045
cynomolgus	1,85E+06	3,10E-04	0,17	0,032
Hum. & Cyno.	1,52E+06	3,33E-04	0,22	0,039

Ví dụ 5: Tác dụng nội tại của các kháng thể được tạo ra đối với quá trình phosphoryl hoá IGF-1

Đã biết được rằng các kháng thể có thể gây ra tác dụng chủ vận khi chúng gắn kết với các thụ thể tyrosin kinaza. Do chúng ta có thể không muốn chọn các kháng thể chủ vận này, việc đánh giá quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R được nghiên cứu bằng cách sử dụng các kháng thể khảm.

Đối với mục đích đó, tế bào MCF-7 được ủ trong môi trường không chứa huyết thanh qua đêm. Sau đó, IGF-1 (100 nM) hoặc Ab được thử nghiệm được bổ sung vào (10µg/ml) trong 10 phút ở 37°C. Xả thải môi trường và tế bào được cạo trong dung dịch đệm phân giải (độ pH=7,5) chứa 10mM dung dịch đệm Tris HCl (độ pH=7,5), 15% NaCl (1 M), 10% cơ chất tẩy rửa (10mM Tris-HCl, 10% dung dịch đệm phân giải Igepal) (Sigma Chemical Co.), 5% natri deoxycholat (Sigma Chemical Co.), 1 viên nén TM đầy đủ chứa cốc tai chất ức chế proteaza (Roche), 1% nhóm cốc tai II chứa chất ức chế phosphatasa (Calbiochem), trong 90 phút ở 4°C. Dung dịch phân giải được lọc bằng cách ly tâm ở 4°C, gia nhiệt trong 5 phút ở 100°C và được giữ ở -20°C hoặc được nạp trực tiếp vào 4 đến 12% gel SDS-PAGE. Việc ủ kháng thể sơ cấp được thực

hiện trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó ủ với các kháng thể thứ cấp được liên kết HRP được thực hiện trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các màng được rửa trong TBST trước khi hiển thị hoá protein với ECL. Các phép thẩm tách được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm Image J. Các trị số phospho-protein được tiêu chuẩn hoá với GAPDH. Quá trình phosphoryl hoá của hIGF-1R đáp ứng với IGF-1 được xem là 100% kích thích. Tác dụng của các Ab kháng hIGF-1R đối với quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R được xác định là % phosphoryl hoá do IGF-1 gây ra.

Các kết quả được mô tả trên Fig.7 thể hiện trị số trung bình theo % pIGF-1R đáp ứng với các Ab kháng IGF-1R của 3 thử nghiệm độc lập $\pm$ S.D. so với IGF-1. Như được minh hoạ đối với quá trình phosphoryl hoá đáng kể hoặc nhỏ (<10%) của hIGF-1R được phát hiện khi tế bào MCF-7 được ủ với 10 μ g Ab kháng IGF-1R.

Ví dụ 6: Ức chế quá trình phosphoryl hoá IGF-1R đáp ứng với IGF-1 bởi các kháng thể IGF-1R của chuột

Để đặc trưng hoá các kháng thể được chọn, khả năng của chúng ức chế quá trình phosphoryl hoá do IGF1 gây ra được nghiên cứu. Đối với mục đích đó, tế bào MCF-7 được ủ trong môi trường không chứa huyết thanh qua đêm. Sau đó, tế bào được ủ trong 5 phút với các Ab của chuột kháng hIGF-1R trước khi bổ sung IGF-1 trong 2 phút ở 37°C. Môi trường được xả thải và tế bào được cạo trong dung dịch đệm phân giải (độ pH=7,5) chứa 10mM dung dịch đệm Tris HCl (độ pH=7,5), 15% NaCl (1M), 10% cơ chất tẩy rửa (10mM Tris-HCl, 10% dung dịch đệm phân giải Igepal) (Sigma Chemical Co.), 5% natri deoxycholat (Sigma Chemical Co.), 1 viên nén TM đầy đủ chứacocktail chất ức chế proteaza (Roche), 1% bộcocktail chất ức chế phosphatase II (Calbiochem), trong 90 phút ở 4°C. Dung dịch phân giải được lọc bằng cách ly tâm ở 4°C, gia nhiệt trong 5 phút ở 100°C và giữ ở -20°C hoặc nạp trực tiếp vào 4 đến 12% gel SDS-PAGE. Việc ủ kháng thể sơ cấp được thực hiện trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó việc ủ với các kháng thể thứ cấp được liên kết HRP được thực hiện trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Màng được rửa trong TBST trước khi hiển thị hoá protein với ECL. Các phép thẩm tách được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm Image J. Các trị số phospho-protein được tiêu chuẩn hoá với GAPDH.

Quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R đáp ứng với IGF-1 được xem là 100% kích thích. Tác dụng của các Ab kháng hIGF-1R đối với quá trình phosphoryl hoá của hIGF-1R được xác định là % phosphoryl hoá do IGF-1 gây ra.

Tất cả các Ab kháng IGF-1R ức chế mạnh mẽ quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R đáp ứng với IGF-1 (giảm > 80%) (Fig.8). Các chất ức chế tốt nhất của quá trình phosphoryl hoá hIGF-1R do IGF1 gây ra là m208F2, m212A11 và m214F8 Mab.

Ví dụ 7: Nghiên cứu quá trình nội bào hoá IGF-1R sau khi gắn kết các kháng thể IGF-1R được tạo ra bằng phân tích FACS

Các tế bào MCF-7 được ủ với 10µg/ml kháng thể khảm ở 4°C trong 20 phút. Sau đó, tế bào được rửa và ủ ở 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ. Lượng kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp. ΔMFI được xác định như sự khác nhau giữa MFI được đo ở 4°C và MFI được đo ở 37°C sau thời gian ủ 4 giờ tương ứng với lượng nội bào hoá Ab. ΔMFI được thể hiện trên Fig.9 và bảng 11. Tỷ lệ phần trăm nội bào hoá ở 10µg/ml Ab được tính toán như sau $100 \times (MFI \text{ ở } 4^\circ\text{C} - MFI \text{ ở } 37^\circ\text{C}) / MFI \text{ ở } 4^\circ\text{C}$ và được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 11

Ab	% nội bào hoá	ΔMFI	ΔMFI_ EC ₅₀
c208F2	83	288	1.8E-10
c212A11	80	322	2.7E-10
c214F8	87	403	2.2E-10
c219D6	80	353	4.4E-10
c231B10	85	369	2.3E-10

Để xác định nếu các kháng thể mà cũng nhận biết IGF-1R của khí có khả năng nội bào hoá thụ thể này, cùng thử nghiệm nội bào hoá được thực hiện. Các kết quả được tổng kết trong bảng 12 biểu thị rằng tất cả các kháng thể được thử nghiệm có khả năng gây ra quá trình nội bào hoá IGF-1R của khí.

Bảng 12

Abs	Các Ab của chuột		Các Ab khảm	
	Δ MFI	% nội bào hoá	Δ MFI	% nội bào hoá
208F2	53	74	52	67
212A11	83	73	98	75
214F8	76	71	98	72
219D6	80	71	102	74
213B10	84	74	101	73

Động học giảm kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào còn được đánh giá nữa. Đối với mục đích đó, tế bào MCF-7 được tạo hạt trong các đĩa có 96 lỗ và ủ với 10 μ g/ml của chuột trong 20 phút ở 4°C. Sau đó, tế bào được rửa để loại bỏ kháng thể không được gắn kết và trong môi trường ở 37°C trong 10, 20, 30, 60 hoặc 120 phút. Ở mỗi thời điểm, tế bào được ly tâm và sau đó bề mặt được đánh dấu trên nước đá với IgG-Alexa488 kháng chuột thứ cấp để xác định lượng kháng thể còn lại trên bề mặt tế bào. Cường độ huỳnh quang đối với mỗi Ab của chuột và đối với mỗi thời điểm được tiêu chuẩn hoá bởi tín hiệu ở 4°C (% IGF-1R còn lại) và fit với sự phân rã theo số mũ để xác định bán tòn ($t_{1/2}$). $t_{1/2}$ được xem là thời gian cần để thu được quá trình giảm 50% tín hiệu. Như được minh hoạ trên Fig.10, hàm lượng bề mặt của tất cả các Ab của chuột được giảm nhanh chóng trong 30 phút đầu tiên và giảm là hầu như tối đa trong 60 phút ủ (Fig.10A). Bán tòn được tính toán nằm trong khoảng từ 10 đến 18 phút theo Ab của chuột (Fig.10B).

Để xác nhận rằng việc giảm tín hiệu bề mặt tế bào là do quá trình nội bào hoá Ab và không phải do việc rơi rụng thụ thể, tế bào được ủ với các Ab của chuột trong 0, 30 và 60 phút ở 37°C (Fig.11). Sau đó, tế bào được cố định và thẩm thấu hoặc không thẩm thấu để xác định kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào (w/o thẩm thấu) và tổng tín hiệu kháng thể tương ứng với Ab được gắn kết bề mặt tế bào + nội bào hoá (với sự thẩm thấu). Lượng Ab được nội bào hoá (tế bào chất) được xác định như sau: MFI sau khi thẩm thấu – MFI w/o thẩm thấu. Thử nghiệm này biểu thị rằng việc giảm Ab được gắn kết bề mặt tế bào là do sự gia tăng của Ab trong tế bào chất biểu thị rằng các Ab

được nội bào hoá (Fig.11). Ngoài ra, việc phân huỷ các Ab được bắt đầu sau 1 giờ ủ như được chỉ định bởi việc giảm tính hiệu sau khi thẩm thấu (Tổng cộng).

Ví dụ 8: Nghiên cứu quá trình nội bào hoá IGF-1R sau khi gắn kết các kháng thể IGF-1R được tạo ra bằng phân tích cùng tiêu điểm

Để xác nhận nữa về quá trình nội bào hoá của kháng thể, việc soi kính hiển vi cùng tiêu điểm được thực hiện để đánh giá sự phân bố dưới tế bào của các kháng thể sau khi di chuyển tế bào. Tế bào được ủ với các Ab kháng hIGF-1R ở 37°C, được cố định và thẩm thấu. Do đó, tế bào được nhuộm và sử dụng kháng thể thứ cấp Alexa-488 và với kháng thể của thỏ kháng Lamp-1 mà được thể hiện bằng cách sử dụng IgG kháng thỏ thứ cấp Alexa 555. Trước khi ủ ở 37°C, Ab 208F2 của chuột được định vị trên màng tế bào MCF-7 (Fig.12A). Không có quá trình đồng định vị nào với tác nhân đánh dấu lysosom, lamp-1 được lưu ý sử dụng ghép đánh dấu đồng định vị của phần mềm Image J. Kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào được giảm mạnh sau 15 phút ủ ở 37°C. Đồng thời với việc giảm kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào, kháng thể nội bào được phát hiện trong túi bóng. Quá trình đồng định vị hiếm có với lamp-1 có thể được quan sát. Sau 30 phút ủ, kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào rất khó được phát hiện. Tuy nhiên, quá trình đồng định vị của Ab vào trong lysosom gia tăng. Sau 1 giờ ủ, Ab nội bào nhuộm giảm cũng như số lượng đồng định vị với lamp-1. Động học này của kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào và sự lắng đọng nội bào của nó tương quan với động học phân rã bề mặt của kháng thể đo được bởi FACS. Ngoài ra, như đã được mô tả với các nghiên cứu FACS, sự phân huỷ của các Ab của chuột được bắt đầu sau 1 giờ ủ bằng kính hiển vi cùng tiêu điểm.

Quá trình nội bào hoá của tất cả các kháng thể hIGF-1R của chuột khác và quá trình đồng định vị của chúng với Lamp-1 cũng được đánh giá (Fig.12B). Sau 30 phút ủ ở 37°C, kháng thể nội bào được phát hiện và quá trình đồng định vị với lamp-1 có thể được quan sát biểu thị rằng tất cả các kháng thể kháng IGF-1R được chọn là được nội bào hoá hữu hiệu vào trong lysosom.

Ví dụ 9: Ức chế sự phân huỷ Ab sử dụng chất ức chế lysosom, Bafilomycin A1

Để xác nhận rằng các kháng thể đạt đến lysosom là chúng được phân huỷ, tế bào được xử lý hoặc không được xử lý với bafilomycine A1, chất ức chế tiềm ẩn chức năng lysosom. Sau đó, tế bào được ủ với 10µg/ml Ab cần được thử nghiệm ở 4°C, rửa và ủ trong 2 giờ ở 37°C. Ab được nội bào hoá được phát hiện sau quá trình thẩm thấu tế bào sử dụng Ab thứ cấp kháng IgG-Alexa 488 của chuột. Việc bổ sung bafilomycine A1 đã ngăn ngừa sự phân huỷ Ab nội bào (Fig.13) biểu thị rằng các Ab được nội bào hoá hữu hiệu và được thoái hoá vào trong lysosom.

Ví dụ 10: Tác dụng của độ pH đối với gắn kết kháng thể-IGF-1R

Do các kháng thể được chọn dựa trên khả năng nội bào hoá của chúng và được thể hiện trên đây để đồng định vị với nội thể sớm trước khi đi vào trong khoang lysosom, phương pháp đáng quan tâm được xem xét để chọn các kháng thể mà độ ổn định gắn kết Ab/hIGF-1R được điều biến liên quan đến môi trường độ pH và tốt hơn là các kháng thể mà được phân ly theo cách ưu tiên ra khỏi IGF-1R khi môi trường độ pH trở nên có tính axit. Thực vậy, sự khác nhau chủ yếu giữa các nội thể sớm và lysosom là độ pH khoang của chúng: trong khoang nội thể, độ pH bằng khoảng 6 trong khi trong khoang lysosom độ pH bằng khoảng 4,5.

Đã biết được rằng một khi được nội bào hoá sau phối tử gắn kết (IGF1), hIGF-1R trở về bề mặt tế bào qua quá trình tuần hoàn.

Không muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, giả thiết được mô tả trong bản mô tả này là các kháng thể mà có xu hướng nhiều hơn cần được giải phóng ra khỏi đích của chúng sớm ở độ pH axit sẽ có khả năng là đích ưu tiên tuần hoàn vào màng và do đó có thể được xem là các ứng viên tốt hơn đối với phương pháp ADC.

Để nghiên cứu nếu một vài kháng thể thể hiện đặc tính này và để tương quan đặc tính này với hoạt tính độc tế bào, việc gắn kết của các Mab của chuột kháng hIGF-1R đối với dòng tế bào MCF-7 được thực hiện trong các dung dịch đệm ở độ pH khác nhau. Nồng độ gia tăng của các mAb của chuột được ủ đối với dòng tế bào MCF-7 trong 20 phút ở 4°C trong giá trị độ pH khác nhau nằm trong khoảng từ 5 đến 8. Sau đó, tế bào được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa

488 trong dung dịch đệm FACS. Tế bào được ủ trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối và sau đó rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Sự gắn kết của các kháng thể kháng hIGF-1R được thực hiện ngay đối với tế bào có thể sống được mà được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua mà nhuộm tế bào chết. EC₅₀ gắn kết được thể hiện theo mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0). Tất cả các kháng thể của chuột kháng IGF-1R được chọn thể hiện khả năng gắn kết thấp ở độ pH axit như được minh họa trên Fig.14.

Sự gắn kết của các Mab được làm giống như của người kháng IGF-1R đối với dòng tế bào MCF-7 được thực hiện trong dung dịch đệm ở độ pH khác nhau. Nồng độ gia tăng của các mAb được làm giống như của người được ủ đối với dòng tế bào MCF-7 trong 20 phút ở 4°C trong giá trị độ pH khác nhau nằm trong khoảng từ 5 đến 8. Sau đó, tế bào được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trong dung dịch đệm FACS. Tế bào được ủ trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối và sau đó rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Sự gắn kết của các kháng thể được làm giống như của người kháng IGF-1R được thực hiện ngay đối với tế bào có thể sống được mà được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua mà nhuộm tế bào chết. EC₅₀ gắn kết được thể hiện theo mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0). Các kháng thể được làm giống như của người kháng IGFR thể hiện khả năng gắn kết thấp ở độ pH axit như được minh họa trên Fig.24.

Ví dụ 12: Đánh giá dạng được làm giống như của người của 208F2 Mab

12.1 Đánh giá sự gắn kết và nội bào hoá của dạng được làm giống như của người thứ nhất hz208F2 VH3/VL3 (cũng được dùng để chỉ hz208F2 H026/L024)

Sự gắn kết của dạng được làm giống như của người thứ nhất của c208F2 mAb được đánh giá đối với các dòng tế bào MCF-7, COS-7 và NIH 3T3 IR⁺. Nồng độ gia tăng của m208F2, c208F2 hoặc hz208F2 VH3VL3 được bổ sung vào mỗi dòng tế bào trong 20 phút ở 4°C. Sau đó, tế bào được rửa và sự gắn kết của mAb được thử nghiệm được thể hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp tương ứng. Để xác nhận sự biểu hiện nêu trong mục iR của người đối với dòng tế bào được gây nhiễm, kháng thể

kháng hIR thương mại dòng GRO5 được sử dụng và khả năng nhận biết của nó được minh hoạ trên (Fig.15D).

So sánh dạng được làm giống như của người với dạng của chuột hoặc dạng khảm đối với MCF-7 (Fig.15A) hoặc tế bào COS-7 của khỉ (Fig.15B) thể hiện khả năng chặt chẽ đối với 3 dạng được thử nghiệm. Quy trình làm giống như của người không làm thay đổi tính đặc hiệu nhận biết của kháng thể mà hoàn toàn có thể so sánh với các dạng của chuột hoặc dạng khảm liên quan đến sự không có mặt khả năng phản ứng ngang đối với thụ thể insulin của người (Fig.15C).

EC_{50} được tính toán của dạng được làm giống như của người thứ nhất của 208F2 đối với dòng tế bào của người MCF-7 và dòng tế bào của khỉ COS-7 là tương tự với EC_{50} được xác định với dạng của chuột hoặc dạng khảm của mAb 208F2.

Khả năng của mAb hz208F2 VH3/VL3 cần được nội bào hoá được đánh giá bằng phép đo dòng tế bào. Tế bào MCF-7 được ủ với 10 μ g/ml kháng thể ở 4°C trong 20 phút. Sau đó, tế bào được rửa và ủ ở 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ. Lượng kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp. Δ MFI được xác định là sự khác nhau giữa MFI được đo ở 4°C và MFI được đo ở 37°C sau thời gian ủ 4 giờ tương ứng với lượng Ab được nội bào hoá. Δ MFI được thể hiện trên Fig.16 và bảng 13. Tỷ lệ phần trăm nội bào hoá ở 10 μ g/ml Ab được tính toán như sau: $100 * (MFI \text{ ở } 4^{\circ}C - MFI \text{ ở } 37^{\circ}C) / MFI \text{ ở } 4^{\circ}C$ và được thể hiện trong bảng 13. Do đó, hz208F2 VH3/VL3 được làm giống như của người có các đặc tính gắn kết và nội bào hoá tương tự như các đặc tính được đo với các kháng thể 208F2 của chuột và khảm tương ứng.

Bảng 13a

	Δ MFI	% i% nội bào hoá
m208F2	294	88
c208F2	278	82
H208F2 VH3/VL3	344	87

12.2 Đánh giá sự gắn kết của dạng được làm giống như của người hz208F2 tiếp theo

mAb 208F2 được làm giống như của người và các đặc tính gắn kết của mười sáu biến thể được làm giống như của người (bao gồm dạng thứ nhất được mô tả trong mục 12.1) được đánh giá. Các đặc tính gắn kết của các biến thể được làm giống như của người được đánh bằng phân tích FACS đối với dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến vú MCF-7 của người và dòng tế bào của khỉ Cos-7 bằng cách sử dụng các nồng độ kháng thể gia tăng. Đối với mục đích đó, tế bào (1×10^6 tế bào/ml) được ủ với các kháng thể kháng IGF-1R trong 20 phút ở 4°C trong dung dịch đệm FACS (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, chúng được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối trước khi được rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Sự gắn kết của các kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay đối với tế bào có thể sống được mà được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua (mà nhuộm tế bào chết). EC_{50} của gắn kết được thể hiện theo mol (M) được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính (GraphPad Prims 4.0).

EC_{50} của các biến thể được làm giống như của người mà thể hiện tất cả các biến thể được làm giống như của người thể hiện các đặc tính gắn kết tương đương đối với các dòng tế bào của cả người và khỉ.

EC_{50} của các kháng thể được làm giống như của người được tổng kết trong bảng 13b.

Bảng 13b

		EC50 (M)	
		MCF-7	Cos-7
Kháng thể được làm giống như của người	hz208F2 H026/L024	7.09E-10	5.1E-10
	hz208F2 H037/L018	4.9E-10	7.4E-10
	hz208F2 H047/L018	7.7E-10	9.2E-10
	hz208F2 H049/L018	4.9E-10	6.9E-10
	hz208F2 H051/L018	5.7E-10	7.2E-10
	hz208F2 H052/L018	8.4E-10	9.9E-10
	hz208F2 H057/L018	5.8E-10	8.3E-10
	hz208F2 H068/L018	1.1E-09	1.2E-09
	hz208F2 H070/L018	4.6E-10	7.3E-10
	hz208F2 H071/L018	5.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H076/L018	6.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H077/L018	7.7E-10	1.1E-09
	hz208F2 H037/L021	4.8E-10	8.2E-10
	hz208F2 H049/L021	6.6E-10	8.5E-10
	hz208F2 H052/L021	5.7E-10	1.2E-09
	hz208F2 H076/L021	5.8E-10	1.1E-09

12.3 Đánh giá quá trình nội bào hoá của dạng được làm giống như của người khác hz208F2

Tế bào MCF-7 được ủ với 10µg/ml kháng thể được làm giống như của người ở 4°C trong 20 phút. Sau đó, tế bào được rửa và ủ ở 4°C hoặc 37°C trong 4 giờ. Lượng kháng thể được gắn kết bề mặt tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp trên tế bào kế dòng FacsCalibur (Becton Dickinson). ΔMFI được xác định là sự khác nhau giữa MFI được đo ở 4°C và MFI được đo ở 37°C sau thời gian ủ 4 giờ tương ứng với lượng Ab được nội bào hoá. ΔMFI được thể hiện trong bảng 13c. Tỷ lệ phần trăm nội bào hoá ở 10µg/ml Ab được tính toán như sau: $100 \times (\text{MFI ở } 4^\circ\text{C} - \text{MFI ở } 37^\circ\text{C}) / \text{MFI ở } 4^\circ\text{C}$. Kháng thể được làm giống như của người hz208F2 H077/L018 có khả năng gây ra nội bào hoá đáng kể IGF-1R.

Bảng 13c

	Δ MFI	% nội bào hoá
hz208F2 H077/L018	468	88

Ví dụ 13: Xác định hằng số phân ly (K_D) của gắn kết năm kháng thể kháng IGF-1R (c208F2, c213B10, c212A11, c214F8 và c219D6) và phiên bản được làm giống như của người (VH3/VL3) của kháng thể 208F2 đối với IGF-1R tái tổ hợp có thể hoà tan của người

Hằng số phân ly (K_D) gắn kết các kháng thể đối với IGF-1R tái tổ hợp có thể hoà tan của người được xác định bởi tỷ lệ giữa hằng số phân ly (k_{off}) và hằng số kết hợp (k_{on}). Thử nghiệm động học được thực hiện trên thiết bị Biacore X100 bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 được hoạt hoá bởi kháng thể đơn dòng của chuột kháng Tag His. Khoảng 12000 RU kháng thể được ghép hoá học với cơ chất cacboxymetyldextan sử dụng ngành hoá học kit amin.

Các thử nghiệm được thực hiện ở 25°C với tốc độ dòng 30 μ l/phút sử dụng dung dịch đệm HBS-EP+ (GE Healthcare) làm dung dịch đệm chạy và pha loãng mẫu.

Sơ đồ động học một chu trình được sử dụng để xác định các tham số động học của gắn kết kháng thể kháng IGF-1R đối với IGF-1R tái tổ hợp có thể hoà tan của người được bắt giữ bởi 10 Histidine-tag hai đầu tận cùng C của nó.

1- Dung dịch chứa phiên bản tái tổ hợp có thể hoà tan có cấu trúc bậc bốn dự tương đồng IGF-1R của người: các chuỗi 2 α và các miền ngoại bào của các chuỗi 2 β được biểu hiện với 10-His tag đầu tận cùng C (R&D Systems catalogue number 305-GR-50) được tiêm trong một phút vào tế bào đo dòng thứ hai ở nồng độ 10 μ g/ml. Trị số trung bình 587 RU (với độ lệch chuẩn 24 RU) thụ thể có thể hoà tan được bắt giữ ở mỗi 24 chu kỳ được thực hiện đối với nghiên cứu này.

2- Sau pha bắt giữ, dung dịch đệm chạy được tiêm 5 lần (mỗi lần tiêm 90 giây) hoặc khoảng gia tăng của 5 nồng độ của một trong số sáu kháng thể được tiêm (mỗi lần tiêm 90 giây) đối với cả hai tế bào đo dòng.

Khi kết thúc lần tiêm thứ năm, dung dịch đệm chạy được chuyển qua trong 5 phút để xác định tốc độ phân ly.

3- Sau đó, bề mặt được tạo ra với việc tiêm 10mM Glyxin, dung dịch đệm HCl độ pH=1,5 trong 45 giây.

Tín hiệu được tính toán tương ứng với sự khác nhau giữa đáp ứng của tế bào đo dòng 2 (với IGF-1R được bắt giữ) và đáp ứng của tế bào đo dòng 1 (mà không cần phải có các phân tử IGF-1R bất kỳ).

Mỗi với mỗi IGF-1R, tín hiệu do tiêm khoảng nồng độ gia tăng của một kháng thể được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi tín hiệu thu được với 5 lần tiêm dung dịch đệm (viện dẫn hai lần) xem Fig.17.

Biểu đồ tín hiệu thu được được phân tích bằng phần mềm Biaevaluation với mô hình theo tỷ lệ 1:1.

Bốn thử nghiệm được thực hiện đối với mỗi kháng thể sử dụng hai khoảng nồng độ khác nhau: 40, 20, 10, 5 và 2,5nM đối với hai thử nghiệm đầu tiên và: 24, 12, 6, 3 và 1,5nM đối với hai thử nghiệm cuối cùng thực hiện đối với mỗi kháng thể.

Đối với 6 kháng thể được thử nghiệm trong thử nghiệm này, các dữ liệu thử nghiệm cũng được khớp với mô hình theo tỷ lệ 1:1 với trị số k_{off} đáng kể khi nồng độ cao hơn được xác định là không đổi và bốn nồng độ khác được tính toán (xem Fig.18).

Các hằng số phân ly (K_D) được tính toán theo tỷ lệ: k_{off}/k_{on} và bán tồn của các phức hệ được tính toán theo tỷ lệ: $\ln(2)/k_{off}$ được thể hiện trên các hình vẽ Fig.19 và Fig.20. Chúng tương ứng với trị số trung bình của bốn thử nghiệm độc lập được thực hiện đối với mỗi kháng thể. Cột báo lỗi tương ứng với các sai số chuẩn ($n=4$) của các trị số.

Hằng số phân ly nằm trong khoảng từ 10 đến 100pM. Kháng thể c208F2 thể hiện ái lực yếu hơn (trị số hằng số phân ly cao hơn) đối với h-IGF-1R (với K_D khoảng 75pM) và phiên bản được làm giống như của người của nó ít nhất cũng tốt như phiên bản khảm (với K_D khoảng 60pM). Bốn kháng thể khảm kháng IGF-1R khác thể hiện ái lực hoàn toàn tương tự đối với hIGF1-R (với K_D khoảng 30pM). Sự khác nhau về các ái lực chủ yếu được liên kết với tốc độ phân ly hoặc bán tồn thu được của các phức hệ.

Với 208F2, bán tồn của phức hệ nằm trong khoảng từ 2 đến 3 giờ với các phiên bản khảm và được làm giống như của người (VH3/VL3). Đối với bốn kháng thể khảm khác, bán tồn trung bình nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,4 giờ.

Có động học phân ly rất chậm được liên kết một cách rõ ràng với cấu trúc hoá trị hai của các kháng thể mà có khả năng gắn kết đồng thời bởi cả hai nhánh Fab của chúng với hai phân tử h-IGF-1R liền kề. Trong trường hợp này, hàm lượng của các phân tử IGF-1R được bắt giữ có thể có tác động đối với tốc độ phân ly. Các ái lực được xác định trong nghiên cứu này tương ứng với các ái lực chức năng (hoặc các ái lực) của các kháng thể đối với hàm lượng h-IGF-1R được bắt giữ khoảng 600RU. Sự khác nhau 3 lần của KD được quan sát giữa các dữ liệu được thể hiện trên đây (bảng 10) và các trị số được thể hiện trong ví dụ 13 được liên kết với sự thay đổi mức độ bắt giữ hIGF-1R (600RU so với 160 RU trong ví dụ 4).

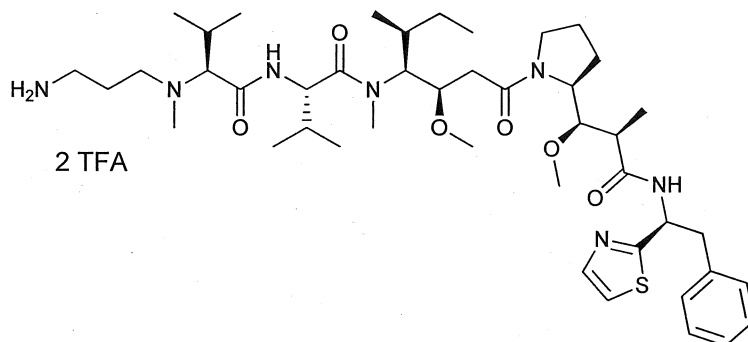
Ví dụ 14: Tổng hợp được chất của sáng chế

Các chữ viết tắt sau được sử dụng trong các ví dụ sau:

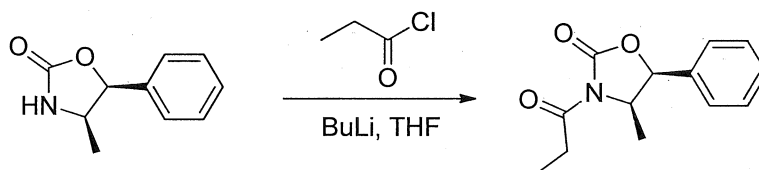
aq.	nước
ee	lượng dư chất đồng phân đối ảnh
equiv	đương lượng
ESI	ion hoá tia điện
LC/MS	sắc ký lỏng kết hợp với phép đo phổ khối
HPLC	sắc ký lỏng hiệu năng cao
NMR	cộng hưởng từ hạt nhân
sat.	bão hoà
UV	tia tử ngoại

Ví dụ so sánh 1

(S)-2-((S)-2-((3-aminopropyl)(methylamino)-3-methylbutanamido)-N-((3R,4S,5S)-3-methoxy-1-((S)-2-((1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((S)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)ethyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-N,3-dimethylbutanamit, axit bis trifloaxetic

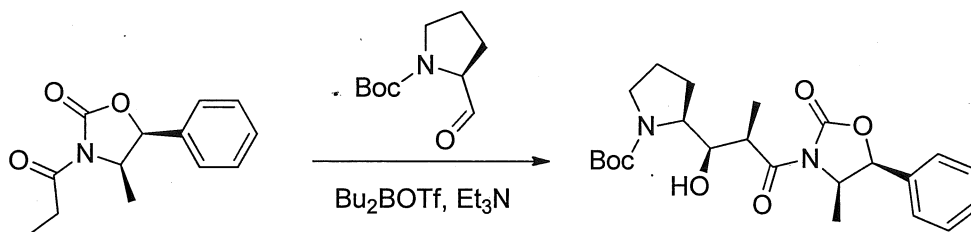


Hợp chất 1A: (4R, 5S)-4-metyl-5-phenyl-3-propanoyl-1,3-oxazolidin-2-on



Hoà tan (4R, 5S)-4-metyl-5-phenyl-1,3-oxazolidin-2-on (5,8g, 32,7mmol, 1,00 đương lượng) trong tetrahydrofuran (THF, 120mL) trong khí trơ. Làm lạnh hỗn hợp này đến -78°C và thêm nhỏ giọt *n*-butyllithi (14,4mL) vào. Sau khi khuấy trộn trong 30 phút ở -78°C , thêm propanoyl clorua (5,7mL) vào. Tiếp tục khuấy trộn trong 30 phút ở -78°C sau đó qua đêm ở nhiệt độ môi trường. Cô đặc hỗn hợp phản ứng, sau đó hoà tan lại trong 200mL nước. Điều chỉnh độ pH của dung dịch này đến 7 bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hoà. Chiết pha trong nước này 3 lần bằng 100mL etyl axetat (EtOAc). Gôm các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 6,8g (89%) hợp chất 1A dưới dạng dầu màu vàng.

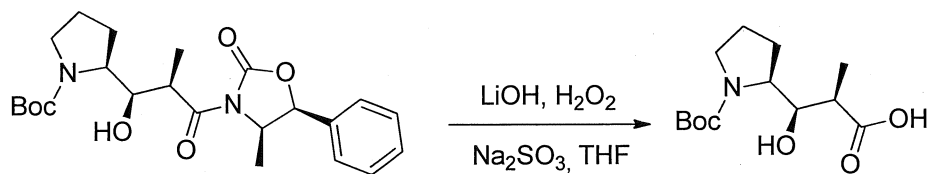
Hợp chất 1B: *tert*-butyl (2S)-2-[(1R,2R)-1-hydroxy-2-metyl-3-[(4R,5S)-4-metyl-2-oxo-5-phenyl-1,3-oxazolidin-3-yl]-3-oxopropyl]pyrrolidin-1-carboxylat



Hoà tan hợp chất 1A (17,6g, 75,45mmol, 1,00 đương lượng) trong diclometan (DCM, 286mL) trong khí trơ. Làm lạnh dung dịch này bằng bể nước đá. Thêm nhỏ giọt triethylamin (TEA, 12,1mL, 1,15 đương lượng) và Bu₂BOTf (78,3mL, 1,04 đương lượng) vào trong khi giữ nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng này thấp hơn 2°C . Tiếp tục

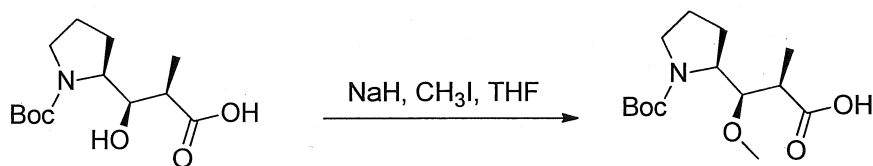
khuấy trộn ở 0°C trong 45 phút, sau đó làm lạnh phản ứng này đến -78°C. Thêm nhỏ giọt dung dịch chứa *tert*-butyl (2S)-2-formylpyrrolidin-1-carboxylat (8,5g, 42,66mmol, 0,57 đương lượng) trong DCM (42mL) vào. Tiếp tục khuấy trộn trong 2 giờ ở -78°C, sau đó trong 1 giờ ở 0°C và cuối cùng 1 giờ ở nhiệt độ môi trường. Trung hoà phản ứng này bằng 72mL dung dịch đệm phosphat (độ pH = 7,2 đến 7,4) và 214mL metanol và làm lạnh đến 0°C. Thêm nhỏ giọt dung dịch chứa 30% hydroperoxit trong metanol (257mL) vào trong khi duy trì nhiệt độ thấp hơn 10°C. Tiếp tục khuấy trộn trong 1 giờ ở 0°C. Trung hoà phản ứng này bằng 142mL nước, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Chiết dung dịch nước thu được 3 lần bằng 200mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và ete dầu mỏ (EtOAc:PE = 1:8) để thu được 13,16g (40%) hợp chất **1B** dưới dạng dầu không màu.

Hợp chất 1C: Axit (2R,3R)-3-[(2S)-1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]pyrrolidin-2-yl]-3-hydroxy-2-metylpropanoic



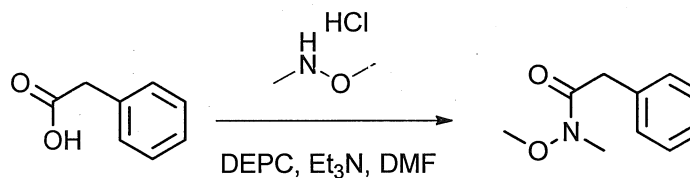
Hoà tan hợp chất **1B** (13,16g, 30,43mmol, 1,00 đương lượng) trong THF (460mL) với sự có mặt của hydro peroxit (dung dịch nước 30%, 15,7mL), sau đó làm lạnh bằng bể nước đá. Thêm nhỏ giọt dung dịch nước chứa lithi hydroxit (0,4mol/L, 152,1mL) vào trong khi giữ nhiệt độ của phản ứng thấp hơn 4°C. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng này trong 2,5 giờ ở 0°C. Thêm nhỏ giọt dung dịch nước chứa Na₂SO₃ (1mol/L, 167,3mL) trong khi giữ nhiệt độ ở 0°C. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng này trong 14 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó trung hoà bằng 150mL dung dịch natri bicarbonat bão hoà lạnh và rửa 3 lần bằng 50mL DCM. Độ pH của dung dịch nước được điều chỉnh để nằm trong khoảng từ 2 đến 3 bằng 1M dung dịch nước chứa KHSO₄. Chiết dung dịch nước này 3 lần bằng 100mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa một lần bằng dung dịch NaCl bão hoà, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 7,31g (88%) hợp chất **1C** dưới dạng dầu không màu.

Hợp chất 1D: Axit (2R,3R)-3-[(2S)-1-[(*tert*-butoxy)carbonyl]pyrrolidin-2-yl]-3-methoxy-2-methylpropanoic

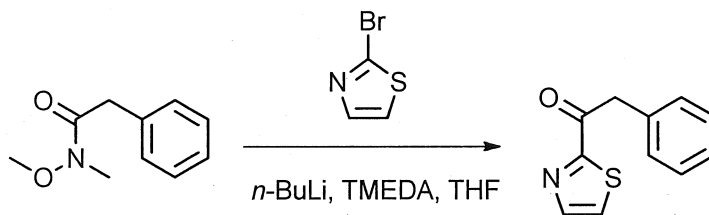


Hoà tan hợp chất **1C** (7,31g, 26,74mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong THF (135mL) với sự có mặt nêu trong mục iodometan (25,3mL). Làm lạnh môi trường phản ứng bằng bể nước đá sau đó thêm từng phần NaH (60% trong dầu, 4,28g) vào. Cho phép phản ứng khuấy trộn 3 ngày ở 0°C và sau đó trung hoà bằng 100mL dung dịch nước natri bicacbonat bão hoà và rửa 3 lần bằng 50mL ete. Độ pH của dung dịch nước được điều chỉnh đến 3 bằng 1M dung dịch nước KHSO₄. Chiết dung dịch nước này 3 lần bằng 100mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa một lần bằng 100mL Na₂S₂O₃ (dung dịch nước 5%), một lần bằng dung dịch NaCl bão hoà, sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 5,5g (72%) hợp chất **1D** dưới dạng dầu không màu.

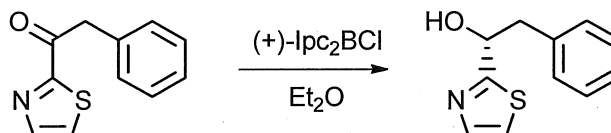
Hợp chất 1E: *N*-methoxy-*N*-metyl-2-phenylaxetamit



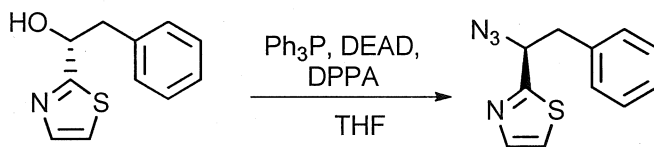
Hoà tan axit 2-phenylaxetic (16,2g, 118,99mmol, 1,00 đương lượng) trong dimetylformamit (DMF, 130mL) sau đó làm lạnh đến -10°C. Thêm diethyl phosphoroxyanidat (DEPC, 19,2mL), methoxy(metyl)amin hydroclorua (12,92g, 133,20mmol, 1,12 đương lượng) và trietylamin (33,6mL) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 30 phút ở -10°C sau đó 2,5 giờ ở nhiệt độ môi trường. Sau đó, chiết hỗn hợp này hai lần bằng 1 lít EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa hai lần bằng 500mL NaHCO₃ (bão hoà), một lần bằng 400mL nước, sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp EtOAc và PE (1:100 đến 1:3) để thu được 20,2g (95%) hợp chất **1E** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 1F: 2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethan-1-on

Hoà tan tetrametyletylendiamin (TMEDA, 27,2mL) trong THF 300mL) trong khí trơ, sau đó làm lạnh đến -78°C trước khi thêm nhỏ giọt *n*-BuLi (67,6 mL, 2,5M) vào. Thêm nhỏ giọt 2-bromo-1,3-thiazol (15,2mL) vào và tiếp tục khuấy trộn 30 phút ở -78°C . Thêm nhỏ giọt hợp chất 1E (25g, 139,50mmol, 1,00 đương lượng) được hoà tan trong THF (100mL) vào. Tiếp tục khuấy trộn trong 30 phút ở -78°C sau đó 2 giờ ở -10°C . Trung hoà phản ứng này bằng 500mL KHSO_4 (bão hoà), sau đó chiết 3 lần bằng 1 lít EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa hai lần bằng 400mL nước và hai lần bằng 700mL NaCl (bão hoà), sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:100 đến 1:10) để thu được 25g (88%) hợp chất 1F dưới dạng dầu màu vàng.

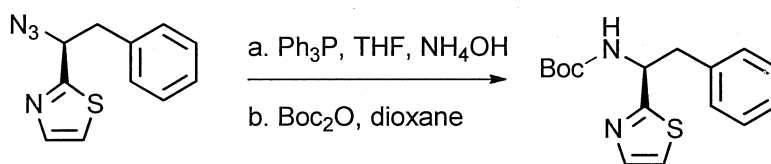
Hợp chất 1G: (1R)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethan-1-ol

Trong khí trơ, thêm nhỏ giọt dung dịch chứa hợp chất 1F (15g, 73,8mmol, 1,00 đương lượng) trong ete (300mL) vào (+)-B-clodiisopinocampheylboran ((+)-Ipc₂BCl, 110,8mL). Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 24 giờ ở 0°C , sau đó trung hoà bằng 300mL hỗn hợp (1:1) gồm NaOH (dung dịch 10%) và H_2O_2 (dung dịch 30%) và cuối cùng chiết ba lần bằng 500mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa hai lần bằng 300mL K_2CO_3 (bão hoà) và một lần bằng 500mL NaCl (bão hoà), sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:20 đến 1:2) để thu được 6,3g (42%) hợp chất 1G dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 1H: 2-[(1S)-1-azido-2-phenylethyl]-1,3-thiazol

Hoà tan hợp chất **1G** (6g, 29,23mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong THF (150mL) với sự có mặt của triphenylphosphin (13g, 49,56mmol, 1,70 đương lượng), sau đó làm lạnh đến 0°C. Thêm nhỏ giọt diethylazodicarboxylat (DEAD, 7,6mL) vào, tiếp theo diphenylphosphorylazit (DPPA, 11mL), sau đó lấy ra khỏi bể làm lạnh và cho phép dung dịch khuấy trộn 48 giờ ở nhiệt độ môi trường. Cô đặc môi trường dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:100 đến 1:30) để thu được 8g hợp chất **1H** được làm sạch một phần dưới dạng dầu màu vàng. Hợp chất **1H** được sử dụng như trong bước tiếp theo.

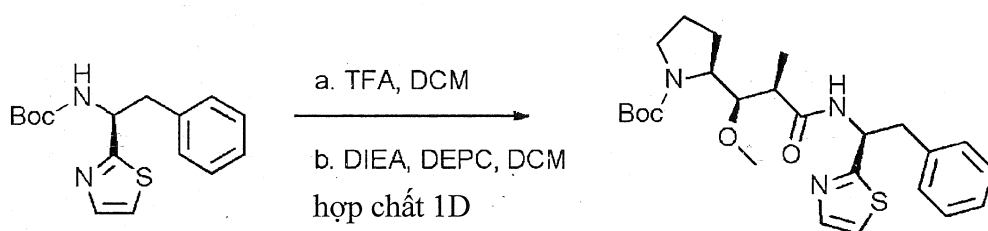
Hợp chất 1I: *tert*-butyl *N*-[(1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl] carbamat.



Hoà tan hợp chất **1H** (6,5g, 28,2mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong THF (100mL) với sự có mặt của triphenylphosphin (6,5g, 33,9mmol, 1,20 đương lượng) và gia nhiệt đến 50°C trong 2 giờ. Sau đó, thêm amoniac (70mL) vào và tiếp tục gia nhiệt trong 3 giờ. Làm lạnh phản ứng, trung hoà bằng 500mL nước, sau đó chiết 3 lần bằng 500mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ và chiết hai lần bằng 500mL 1N HCl. Gom các pha trong nước, đưa đến độ pH=8 đến 9 bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit (dung dịch 10%) vào, sau đó chiết 3 lần bằng 500mL DCM. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 4,8g (83%) (1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethan-1-amin dưới dạng dầu màu vàng. Sau đó, hợp chất này được bảo vệ bằng nhóm Boc ((*tert*-butoxy)carbonyl) sao cho nó có thể được làm sạch. Hoà tan hỗn hợp này trong khí trơ trong 1,4-dioxan (40mL), sau đó làm lạnh đến 0°C. Thêm nhỏ giọt (Boc)₂O (10,26g, 47,01mmol, 2,00 đương lượng) được pha loãng trong 20mL 1,4-dioxan vào. Lấy ra khỏi bể làm lạnh và dung dịch được cho khuấy

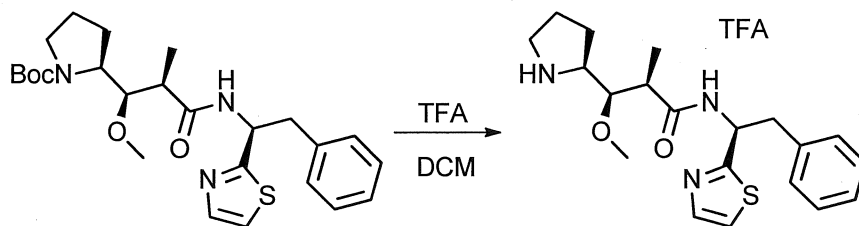
trộn qua đêm ở nhiệt độ môi trường trước khi được trung hoà bằng 300mL nước và chiết hai lần bằng 500mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:100 đến 1:20, ee = 93%). Sau đó, kết tinh lại hỗn hợp trong hỗn hợp hexan/axeton (khoảng từ 5 đến 10/1, 1g/10mL) để thu được 6g (84%) hợp chất **1I** dưới dạng chất rắn màu trắng (ee > 99%).

Hợp chất 1J: *tert*-butyl (2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metyl-2-[[[(1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)etyl]carbamoyl]etyl]pyrrolidin-1-carboxylat



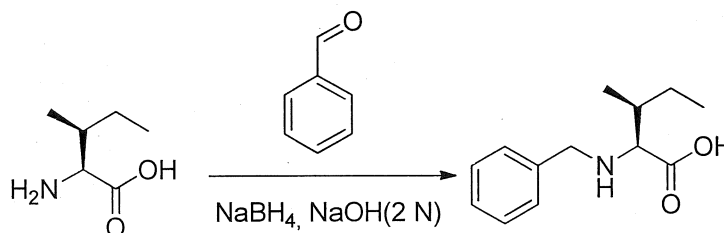
Hoà tan hợp chất **1I** (3g, 9,86mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong 10mL DCM. Thêm axit trifloaxetic (TFA, 10mL) vào và dung dịch này được cho phép khuấy trộn qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 2,0g (64%) (1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethan-1-amin; axit trifloaxetic dưới dạng dầu màu vàng. Hoà tan lại hợp chất trung gian này trong 20mL DCM mà sau đó thêm hợp chất **1D** (1,8g, 6,26mmol, 1,05 đương lượng), DEPC (1,1g, 6,75mmol, 1,13 đương lượng) và diisopropyletylamin (DIEA, 1,64g, 12,71mmol, 2,13 đương lượng) vào. Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:100 đến 1:3) để thu được 2,3g (81%) hợp chất **1J** dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hợp chất 1K: (2R,3R)-3-metoxi-2-metyl-*N*-[(1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)etyl]-3-[(2S)-pyrrolidin-2-yl]propanamit; axit trifloaxetic



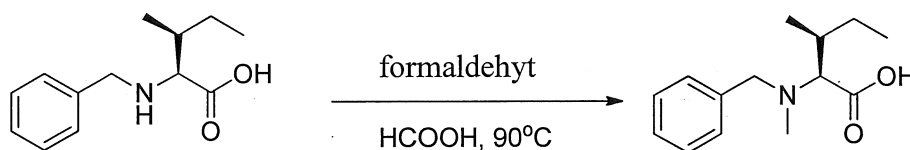
Hoà tan hợp chất **1J** (2,25g, 4,75mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong 10mL DCM. Thêm TFA (10mL) vào và dung dịch được cho phép khuấy trộn qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 2,18g (94%) hợp chất **1K** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 1L: Axit (2S,3S)-2-(benzylamino)-3-methylpentanoic

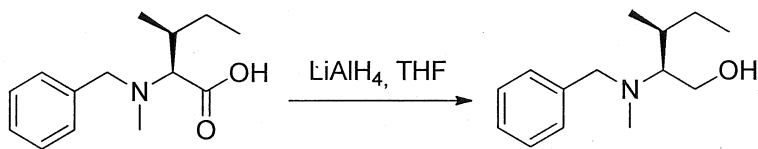


Thêm axit (2S,3S)-2-amino-3-methylpentanoic (98,4g, 750mmol, 1,00 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường và theo các phần vào 2N dung dịch natri hydroxit (375mL). Thêm một cách nhanh chóng benzaldehyt (79,7g, 751,02mmol, 1,00 đương lượng) vào và khuấy trộn dung dịch thu được 30 phút. Thêm natri bohydrua (10,9g, 288,17mmol, 0,38 đương lượng) vào với các phần nhỏ, trong khi giữ nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5 đến 15°C. Tiếp tục khuấy trộn trong 4 giờ ở nhiệt độ môi trường. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 200mL nước, sau đó rửa hai lần bằng 200mL EtOAc. Điều chỉnh độ pH của dung dịch nước đến 7 bằng 2N dung dịch axit clohydric. Gôm chất kết tủa tạo ra bằng cách lọc và thu được 149,2g (90%) hợp chất **1L** dưới dạng chất rắn màu trắng.

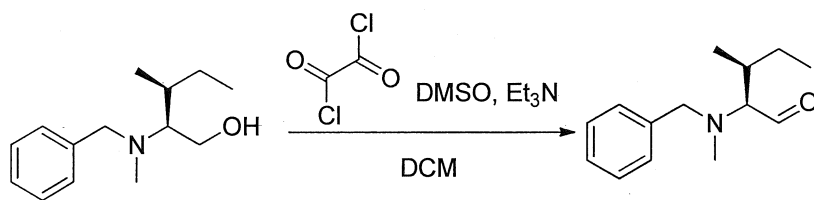
Hợp chất 1M: Axit (2S,3S)-2-[benzyl(metyl)amino]-3-methylpentanoic



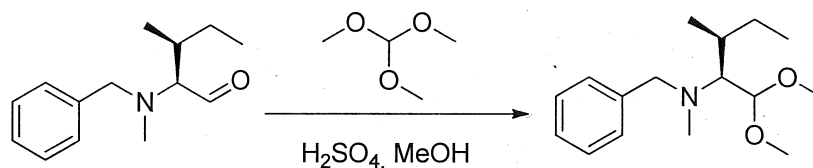
Hoà tan hợp chất **1L** (25g, 112,97mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong axit formic (31,2g) với sự có mặt của formaldehyt (dung dịch 36,5%, 22,3g). Khuấy trộn dung dịch này 3 giờ ở 90°C sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Nghiền phần còn lại trong 250mL axeton, sau đó cô đặc. Lặp lại quá trình nghiền/làm bay hơi này hai lần với 500mL axeton để thu được 21,6g (81%) hợp chất **1M** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 1N: (2S,3S)-2-[benzyl(metyl)amino]-3-metylpentan-1-ol

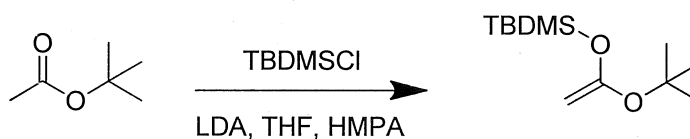
Tạo huyền phù LiAlH_4 (0,36g) trong 10mL THF trong khí trơ ở 0°C . Thêm hợp chất **1M** (1,5g, 6,37mmol, 1,00 đương lượng) vào với lượng nhỏ trong khi giữ nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 10°C . Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 2 giờ ở 65°C , sau đó làm lạnh lại lần nữa đến 0°C trước khi được trung hoà bằng cách bổ sung liên tiếp 360 μL nước, 1mL 15% natri hydroxit và 360 μL nước vào. Loại bỏ muối nhôm mà được kết tủa bằng cách lọc. Làm khô phần lọc trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:50) để thu được 820mg (58%) hợp chất **1N** dưới dạng dầu màu vàng nhạt.

Hợp chất 1O: (2S,3S)-2-[benzyl(metyl)amino]-3-metylpentanal

Hoàn tan oxalyl clorua (0,4mL) trong DCM (15mL) trong khí trơ. Làm lạnh dung dịch đến -70°C và thêm nhỏ giọt dung dịch chứa dimetylsulfoxit (DMSO (0,5mL) trong DCM (10mL) vào trong 15 phút. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 30 phút mà sau đó thêm nhỏ giọt dung dịch chứa hợp chất **1N** (820mg, 3,70mmol, 1,00 đương lượng) trong DCM (10mL) vào trong 15 phút. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng trong 30 phút nữa ở nhiệt độ thấp, sau đó thêm từ từ triethylamin (2,5mL) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 1 giờ ở -50°C , sau đó loại bỏ bể làm lạnh và phản ứng được trung hoà bằng 25mL nước trong khi cho phép nhiệt độ trở về bình thường. Rửa dung dịch một lần bằng 30mL NaCl–dung dịch nước bão hoà, sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:200) để thu được 0,42g (52%) hợp chất **1O** dưới dạng dầu màu vàng.

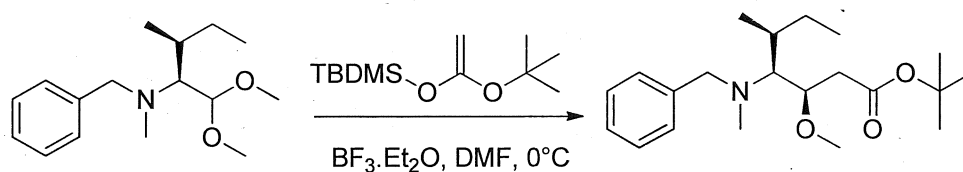
Hợp chất 1P: (2S,3S)-*N*-benzyl-1,1-dimethoxy-*N*,3-dimethylpentan-2-amin

Hoà tan hợp chất **1O** (4,7g, 21,43mmol, 1,00 đương lượng) trong 20mL metanol ở 0°C. Thêm nhỏ giọt axit sulfuric được cô đặc (4,3mL) vào và tiếp tục khuấy trộn trong 30 phút ở 0°C. Thêm trimethyl orthoformat (21,4mL) vào, bể làm lạnh được loại bỏ và cho phép môi trường phản ứng khuấy trộn trong 3 giờ ở nhiệt độ môi trường. Pha loãng môi trường phản ứng bằng 200mL EtOAc, rửa liên tiếp bằng 100mL 10% Na₂CO₃ và 200mL NaCl bão hoà, sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 3,4g (60%) hợp chất **1P** dưới dạng dầu màu vàng nhạt.

Hợp chất 1Q: [[1-(*tert*-butoxy)ethenyl]oxy](*tert*-butyl)dimethylsilan

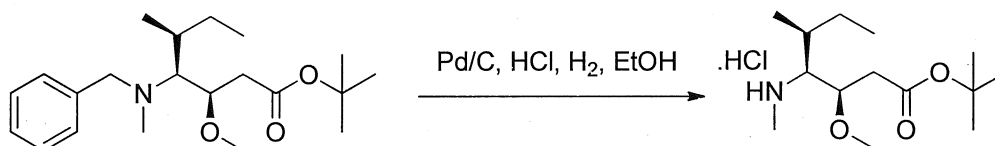
Hoà tan diisopropylamin (20g, 186,71mmol, 1,08 đương lượng) trong 170mL THF trong khí trơ và làm lạnh đến -78°C. Thêm nhỏ giọt *n*BuLi (2,4M, 78,8mL) vào và dung dịch được khuấy trộn 30 phút ở nhiệt độ thấp (để thu được LDA-lithi diisopropylamit) trước khi thêm *tert*-butyl axetat (20g, 172,18mmol, 1,00 đương lượng). Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 20 phút ở -78°C trước khi thêm hexamethylphosphoramit (HMPA, 25,8mL) và dung dịch *tert*butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl, 28g, 185,80mmol, 1,08 đương lượng) trong 35mL THF vào. Tiếp tục khuấy trộn trong 20 phút nữa ở nhiệt độ thấp và sau đó loại bỏ bể làm lạnh. Cô đặc dung dịch này dưới áp suất giảm. Hoà tan lại phần còn lại trong 100mL nước và chiết 3 lần bằng 100mL PE. Gom các pha hữu cơ, rửa một lần bằng 500mL dung dịch nước NaCl bão hoà, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại bằng cách chưng cất để thu được 16,6g (83%) hợp chất **1Q** dưới dạng dầu không màu.

Hợp chất 1R: *tert*-butyl (3R,4S,5S)-4-[benzyl(metyl)amino]-3-metoxi-5-metyl heptanoat



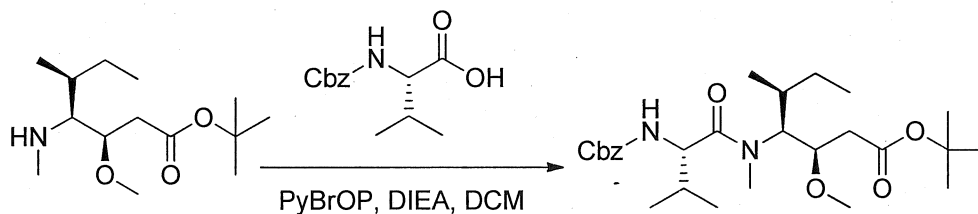
Hoà tan hợp chất **1P** (2,0g, 7,54mmol, 1,00 đương lượng) và hợp chất **1Q** (2,6g, 11,28mmol, 1,50 đương lượng) trong 33mL DCM trong khí trơ. Làm lạnh dung dịch đến 0°C. Thêm nhỏ giọt DMF (1,2g) vào cùng với dung dịch chứa $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2,1g) trong 7,5mL DCM. Tiếp tục khuấy trộn trong 24 giờ ở 0°C. Rửa môi trường phản ứng một lần bằng 30mL natri cacbonat (10%) và hai lần bằng 50mL dung dịch nước NaCl bão hoà, sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:100) để thu được 1,82g (91%) hợp chất **1R** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 1S: (3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metyl-4-(metylamino)heptanoat hydroclorua



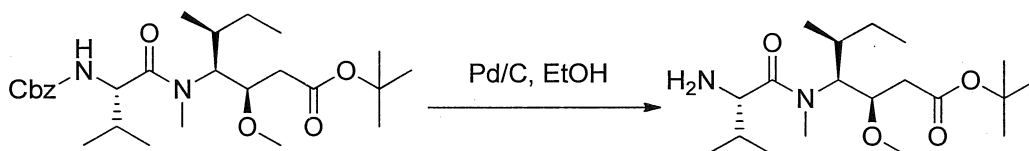
Hoà tan hợp chất **1R** (2,4g, 6,87mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong 35mL etanol với sự có mặt của Pd/C (0,12g) và axit clohydric được cô đặc (0,63mL). Thay thế khí nitơ bằng khí hydro và cho phép môi trường phản ứng khuấy trộn 18 giờ ở nhiệt độ môi trường. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm. Nghiền phần còn lại trong 50mL hexan và dịch nổi được loại bỏ mà, sau khi làm khô dưới áp suất giảm, thu được 1,66g (82%) hợp chất **1S** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 1T: *tert*-butyl (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-*N*,3-dimethylbutanamido]-3-methoxy-5-methylheptanoat



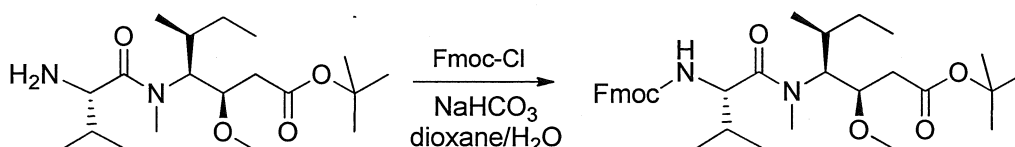
Hoà tan axit (2S)-2-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-3-methylbutanoic (15g, 0,40mmol, 1,00 đương lượng) trong 300mL DCM với sự có mặt của DIEA (38,3mL) và bromotripyrolidinophosphoni hexaflophosphat (PyBrOP, 32,3g). Khuấy trộn dung dịch 30 phút ở nhiệt độ môi trường trước khi thêm hợp chất 1S (15,99g, 0,42mmol, 1,07 đương lượng). Khuấy trộn môi trường phản ứng 2 giờ và sau đó cô đặc. Làm sạch phần còn lại trong pha ngược (C18) với hỗn hợp gồm axetonitril (ACN) và nước (30:70 đến 100:0 trong 40 phút) để thu được 17g (58%) hợp chất 1T dưới dạng dầu không màu.

Hợp chất 1U: *tert*-butyl (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-amino-*N*,3-dimethylbutanamido]-3-methoxy-5-methylheptanoat



Hoà tan hợp chất 1T (76mg, 0,15mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong 10mL etanol với sự có mặt của Pd/C (0,05g). Thay thế khí nitơ bằng khí hydro và phản ứng được khuấy trộn 2 giờ ở nhiệt độ môi trường. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 64mg hợp chất 1U dưới dạng dầu không màu.

Hợp chất 1V: (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino]-*N*,3-dimethylbutanamido]-3-methoxy-5-methylheptanoat



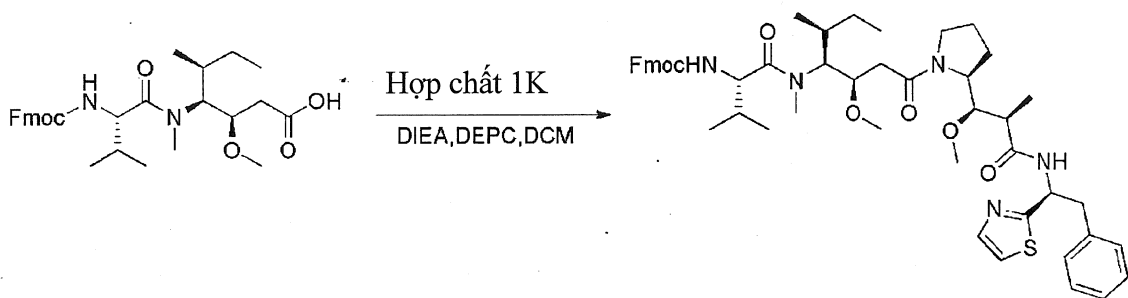
Hoà tan hợp chất **1U** (18,19g, 50,74mmol, 1,00 đương lượng) trong 400mL hỗn hợp 1,4-dioxan/nước (1:1) với sự có mặt của natri bicacbonat (12,78g, 152mmol, 3,00 đương lượng) và 9H-fluoren-9-ylmetyl cloformat (Fmoc-Cl, 19,69g, 76mmol, 1,50 đương lượng), sau đó khuấy trộn 2 giờ ở nhiệt độ môi trường. Sau đó, pha loãng môi trường phản ứng bằng 500mL nước và chiết 3 lần bằng 200mL EtOAc. Gôm các pha hữu cơ, rửa một lần bằng 200mL NaCl-dung dịch nước bão hoà; làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 40g hợp chất **1V** được làm sạch một phần dưới dạng dầu màu vàng nhạt.

Hợp chất 1W: Axit (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[(9H-fluoren-9-ylmetoxy) carbonyl] amino]-N,3-dimetylbutanamido]-3-metoxi-5-metylheptanoic



Hoà tan hợp chất **1V** (40g, 68,88mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trung hoà trong 600mL DCM. Thêm TFA (300mL) vào. Khuấy trộn dung dịch 2 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm metanol và DCM (1:10) để thu được 23,6g (65%) hợp chất **1W** dưới dạng dầu không màu.

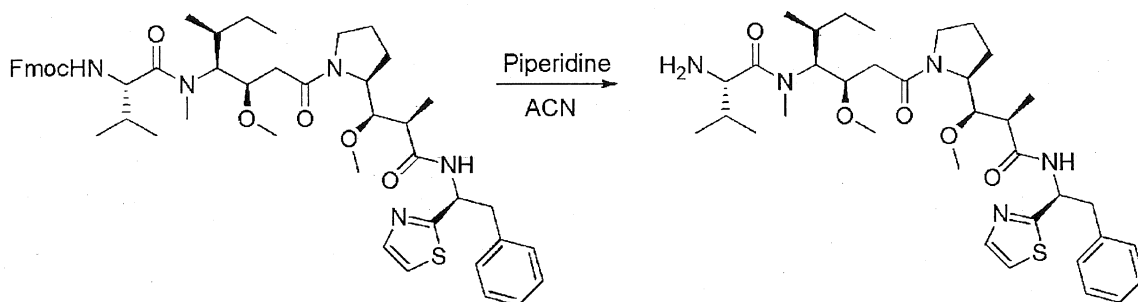
Hợp chất 1X: 9H-fluoren-9-ylmetyl N-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metyl-2-[(1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)etyl]carbamoyl]etyl]pyrrolidin-1-yl]-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl](metyl) carbamoyl]-2-metylpropyl]carbamate



Hoà tan hợp chất **1W** (2,53g, 4,82mmol, 1,08 đương lượng) trong 20mL DCM với sự có mặt của hợp chất **1K** (2,18g, 4,47mmol, 1,00 đương lượng), DEPC (875mg,

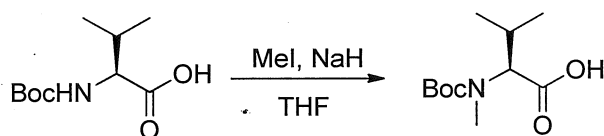
5,37mmol, 1,20 đương lượng) và DIEA (1,25g, 9,67mmol, 2,16 đương lượng). Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó rửa liên tiếp bằng 50mL KHSO₄ bão hoà và 100mL nước, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm metanol và DCM (1:200 đến 1:40) để thu được 2,8g (71%) hợp chất **1X** dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hợp chất 1Y: (2S)-2-amino-N-[(3R,5S)-3-methoxy-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-2-[[[(1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]carbonyl]ethyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl]-N,3-dimethylbutanamit



Hoà tan hợp chất **1X** (2,8g, 3,18mmol, 1,00 đương lượng) trong axetonitril (ACN, 12mL) với sự có mặt của piperidin (3mL) và cho phép khuấy trộn 18 giờ ở nhiệt độ môi trường. Trung hoà phản ứng này bằng 50mL nước, sau đó chiết hai lần bằng 100mL DCM. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm metanol và DCM (1:100 đến 1:40) để thu được 1,2g (57%) hợp chất **1Y** dưới dạng chất rắn màu vàng.

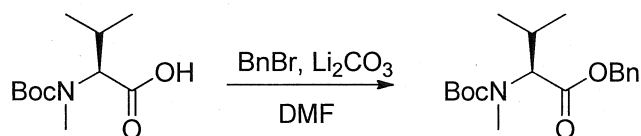
Hợp chất 1ZA: axit (2S)-2-[[*(tert*-butoxy)carbonyl](metyl)amino]-3-metylbutanoic



Hoà tan axit (2S)-2-[[*(tert*-butoxy)carbonyl]amino]-3-metylbutanoic (63g, 289,97mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong THF (1000mL) với sự có mặt nêu trong mục iodometan (181mL). Làm lạnh dung dịch đến 0°C trước khi thêm natri hydrua (116g, 4,83mol, 16,67 đương lượng) với các phần nhỏ. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng trong 1,5 giờ ở 0°C, sau đó loại bỏ bể làm lạnh và tiếp tục khuấy trộn trong 18 giờ. Trung hoà phản ứng này bằng 200mL nước và sau đó cô đặc dưới áp suất

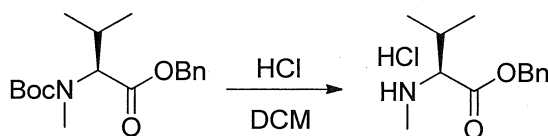
giảm. Pha loãng pha trong nước còn lại bằng 4 lít nước, rửa một lần bằng 200mL EtOAc và độ pH của nó được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 3 đến 4 bằng 1N dung dịch axit clohydric. Chiết hỗn hợp thu được 3 lần bằng 1,2L EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 60g (89%) hợp chất **1ZA** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 1ZB: benzyl (2S)-2-[[(*tert*-butoxy)carbonyl](metyl)amino]-3-metylbutanoat



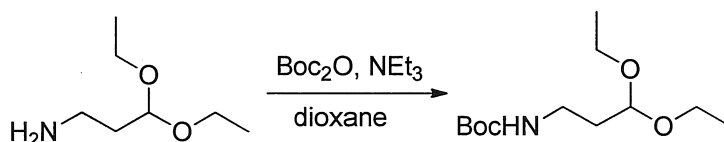
Hoà tan hợp chất **1ZA** (47g, 203,21mmol, 1,00 đương lượng) trong DMF (600mL) với sự có mặt của Li_2CO_3 (15,8g, 213,83mmol, 1,05 đương lượng). Làm lạnh dung dịch đến 0°C sau đó thêm nhỏ giọt benzyl bromua (BnBr 57,9g, 338,53mmol, 1,67 đương lượng) vào. Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm trước khi được trung hoà bằng 400mL nước và lọc. Chiết dung dịch thu được hai lần bằng 500mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:100 đến 1:20) để thu được 22,5g (34%) hợp chất **1ZB** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 1ZC: benzyl (2S)-3-metyl-2-(metylamino)butanoat hydroclorua



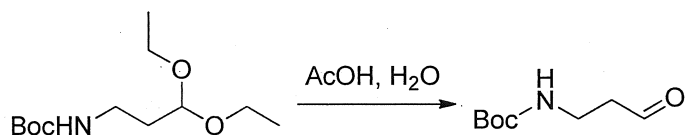
Hoà tan hợp chất **1ZB** (22,5g, 70,00mmol, 1,00 đương lượng) trong 150mL DCM. Tạo bọt axit clohydric dạng khí. Khuấy trộn phản ứng 1 giờ ở nhiệt độ môi trường và sau đó cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 17g (94%) hợp chất **1ZC** dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hợp chất 1ZD: *tert*-butyl *N*-(3,3-diethoxypropyl)carbamát



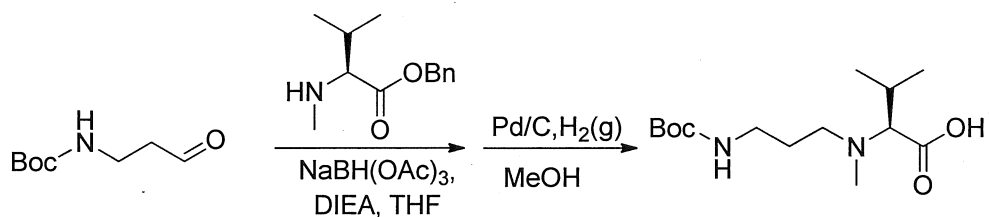
Hoà tan 3,3-diethoxypropan-1-amin (6g, 40,76mmol, 1,00 đương lượng) trong 1,4-dioxan (30mL) với sự có mặt của TEA (4,45g, 43,98mmol, 1,08 đương lượng), sau đó làm lạnh đến 0°C. Thêm nhỏ giọt (Boc)₂O (9,6g, 43,99mmol, 1,08 đương lượng) được pha loãng trong 20mL 1,4-dioxan vào. Khuấy trộn dung dịch 2 giờ ở 0°C sau đó qua đêm ở nhiệt độ môi trường trước khi được trung hoà bằng 10mL nước. Điều chỉnh độ pH đến 5 bằng HCl (1%). Chiết dung dịch 3 lần bằng 50mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 8,21g (81%) hợp chất **1ZD** dưới dạng dầu màu vàng nhạt.

Hợp chất 1ZE: *tert*-butyl *N*-(3-oxopropyl) carbamat



Hoà tan hợp chất **1ZD** (8,20g, 33,15mmol, 1,00 đương lượng) trong 18,75mL axit axetic và cho phép khuấy trộn qua đêm ở nhiệt độ môi trường. Sau đó, chiết môi trường phản ứng 3 lần bằng 30mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa 3 lần bằng 30mL dung dịch NaCl bão hoà, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 5g (87%) hợp chất **1ZE** dưới dạng dầu màu đỏ thẫm.

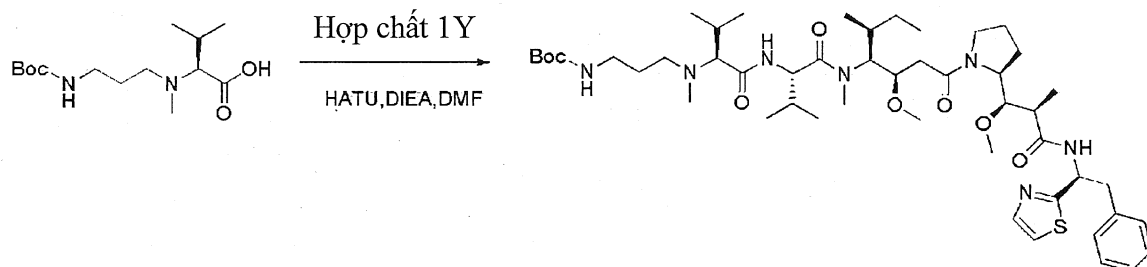
Hợp chất 1ZF: Axit (2*S*)-2-[(3-[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino)propyl](metyl amino)-3-metylbutanoic



Hoà tan hợp chất **1ZE** (2,4g, 13,86mmol, 1,00 đương lượng) trong 50mL THF với sự có mặt của hợp chất **1ZC** (3,56g, 13,81mmol, 1,00 đương lượng) và DIEA (9,16mL, 4,00 đương lượng). Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 30 phút ở nhiệt độ môi trường trước khi bổ sung natri triacetoxibohydrua (5,87g, 27,70mmol, 2,00 đương lượng). Tiếp tục khuấy trộn qua đêm, sau đó trung hoà phản ứng này bằng 100mL nước và chiết 3 lần bằng 50mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch một phần phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm

EtOAc và PE (1:4). Hoà tan lại sản phẩm thô thu được trong 20mL metanol với sự có mặt của Pd/C (1,2g) và được hydro hoá trong 20 phút ở nhiệt độ và áp suất bình thường. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 200mg (5%) hợp chất **1ZF** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 1ZG: *tert*-butyl *N*-(3-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-1-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-2-[[[(1*S*)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)ethyl]carbamoyl]thyl]pyrrolidin-1-yl]-5-methyl-1-oxoheptan-4yl](methyl)carbamoyl]-2-methylpropyl]carbamoyl]-2-methylpropyl](methyl)amino]propyl)carbamate



Hoà tan hợp chất **1Y** (50mg, 0,08mmol, 1,00 đương lượng) trong 2mL DMF với sự có mặt của hợp chất **1ZF** (26,2mg, 0,09mmol, 1,20 đương lượng), DIEA (37,7mL) và O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroni hexaflophosphat (HATU, 43,3mg, 0,11mmol, 1,50 đương lượng). Cho phép phản ứng khuấy trộn qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó pha loãng bằng 10mL nước và chiết 3 lần bằng 5mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 100mg hợp chất **1ZG** dưới dạng dầu không màu được làm sạch một phần.

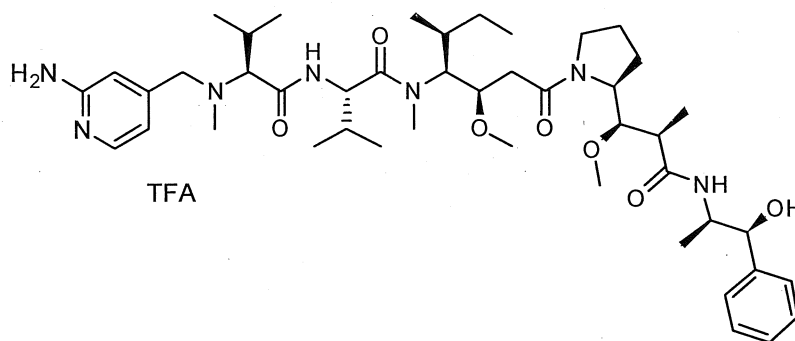
Hoà tan hợp chất **1ZG** (90mg, 0,10mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trung hoà trong 2mL DCM và làm lạnh dung dịch bằng bể nước đá. Thêm TFA (1mL) vào và phản ứng được khuấy trộn trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5µm, 19 x 150mm; pha giải hấp: nước/ ACN được đậm với 0,05% TFA; Gradient 18% đến 31% ACN trong 7 phút sau đó 31% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **1** với hiệu suất 25% (23mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (cột Atlantis T3, 3 μ m, 4,6 x 100mm; 35°C; 1mL / phút, 30% đến 60% dung dịch ACN(20mM amoni axetat trong 6 phút); ESI (C₄₄H₇₃N₇O₆S, khối lượng dư 827,53) m/z : 829 (MH⁺), 5,84 phút (93,7%, 254nm).

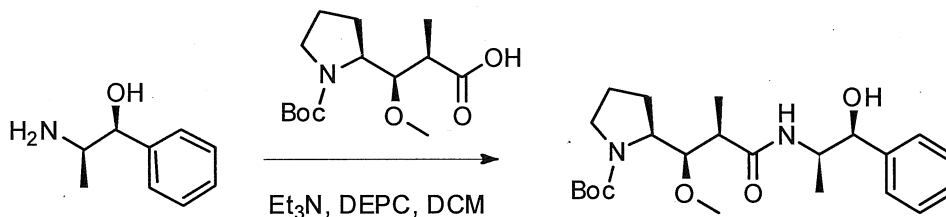
¹H NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,85 - 7,80 (m, 1H); 7,69 - 7,66 (m, 1H), 7,40 - 7,10 (m, 5H), 5,80 - 5,63 (m, 1H), 4,80 - 4,65 (m, 2H), 4,22 - 4,00 (m, 1H), 3,89 - 0,74 (m, 58H).

Hợp chất tham khảo 2

(S)-2-((S)-2-(((2-aminopyridin-4-yl)metyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxi-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-metoxi-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-N,3-dimetylbutanamit, axit trifloaxetic



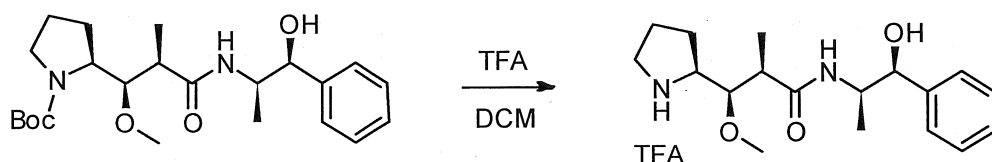
Hợp chất 2A: *tert*-butyl (S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxi-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-carboxylat



Hoà tan hợp chất **1D** (2,5g, 8,70mmol, 1,00 đương lượng) và (1S,2R)-2-amino-1-phenylpropan-1-ol (1,315g, 8,70mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong DMF (35mL). Làm lạnh dung dịch đến 0°C sau đó thêm nhỏ giọt DEPC (1,39mL) và TEA (1,82mL) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 2 giờ ở 0°C sau đó 4 giờ ở nhiệt độ môi trường. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 200mL nước và chiết ba lần bằng 50mL EtOAc. Gôm các pha hữu cơ, rửa một lần bằng 50mL KHSO₄

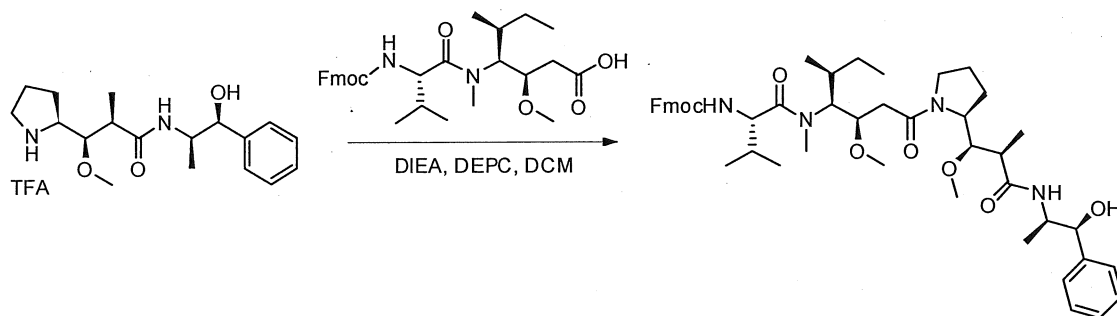
(1mol/L), một lần bằng 50mL NaHCO₃ (bão hoà), một lần bằng 50mL NaCl (bão hoà), sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 3,6g (98%) hợp chất **2A** dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hợp chất 2B: (2R,3R)-N-((1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)-3-methoxy-2-methyl-3-((S)-pyrrolidin-2-yl)propanamit2,2,2-trifloaxetat



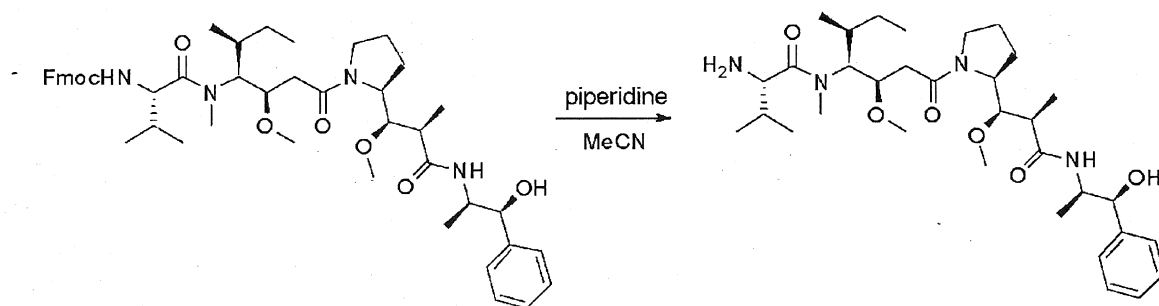
Hoà tan hợp chất **2A** (2,7g, 6,42mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong DCM (40mL) sau đó làm lạnh đến 0°C. Thêm TFA (25mL) vào và dung dịch được khuấy trộn trong 2 giờ ở 0°C. Cô đặc hỗn hợp phản ứng dưới áp suất giảm để thu được 4,4g hợp chất **2B** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 2C: (9H-fluoren-9-yl)metyl ((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-(((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)(metyl)amino)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)carbamát



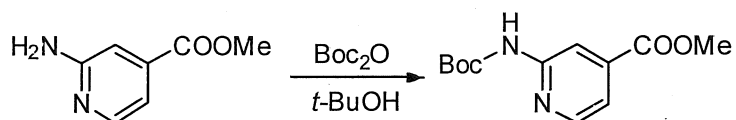
Hoà tan các hợp chất **2B** (4,4g, 10,13mmol, 1,00 đương lượng) và **1W** (5,31g, 10,12mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong DCM (45mL). Làm lạnh dung dịch đến 0°C sau đó thêm nhỏ giọt DEPC (1,62mL) và DIEA (8,4mL) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng trong 2 giờ ở 0°C sau đó ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 100mL nước và chiết ba lần bằng 50mL DCM. Gom các pha hữu cơ, rửa một lần bằng 50mL KHSO₄ (1mol/L), một lần bằng 50mL NaHCO₃ (bão hoà), một lần bằng 50mL NaCl (bão hoà), sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất để thu được 3,3g (39%) hợp chất **2C** dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hợp chất 2D: (S)-2-amino-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-N,3-dimethylbutanamit



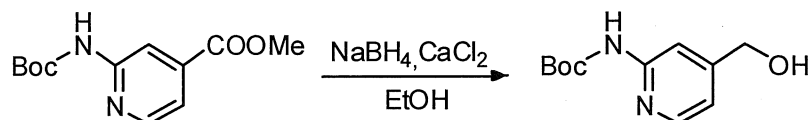
Hoà tan hợp chất **2C** (300mg, 0,36mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong ACN (2mL) và piperidin (0,5mL). Cho phép dung dịch khuấy trộn ở nhiệt độ môi trường qua đêm trong đó làm bay hơi đến khô dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm DCM và MeOH (1:100) để thu được 150mg (68%) hợp chất **2D** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 2E: methyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)isonicotinat



Hoà tan methyl 2-aminopyridin-4-carboxylat (2g, 13,14mmol, 1,00 đương lượng) trong *tert*-butanol (20mL) mà sau đó thêm di-*tert*-butyl dicacbonat (4,02g, 18,42mmol, 1,40 đương lượng) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng ở 60°C qua đêm sau đó làm ngừng phản ứng thông qua việc thêm 1M dung dịch nước NaHCO₃ (50mL). Thu gom chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng 50mL EtOH sau đó làm khô trong chân không để thu được 2,5g (75%) hợp chất **2E** dưới dạng chất rắn màu trắng.

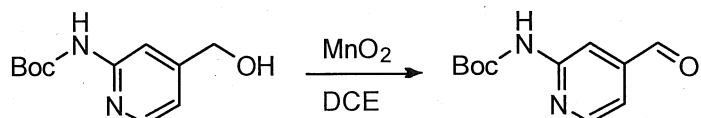
Hợp chất 2F: *tert*-butyl (4-(hydroxymetyl)pyridin-2-yl)carbamit



Hoà tan hợp chất **2E** (2,5g, 9,91mmol, 1,00 đương lượng) và CaCl₂ (1,65g) trong EtOH (30mL). Làm lạnh dung dịch đến 0°C sau đó thêm từ từ NaBH₄ (1,13g,

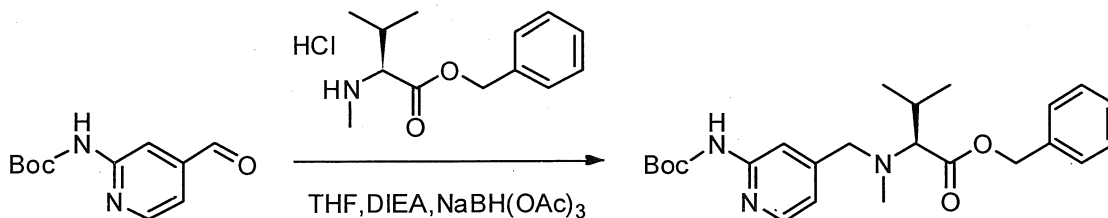
29,87mmol, 3,01 đương lượng) vào. Cho phép dung dịch khuấy trộn qua đêm ở nhiệt độ môi trường sau đó làm ngừng phản ứng bằng việc thêm nước (50mL). Chiết hỗn hợp ba lần bằng 20mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa hai lần bằng 20mL NaCl (bão hoà) sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 2,0g (90%) hợp chất **2F** dưới dạng chất rắn không màu.

Hợp chất 2G: *tert*-butyl (4-formylpyridin-2-yl)carbamate



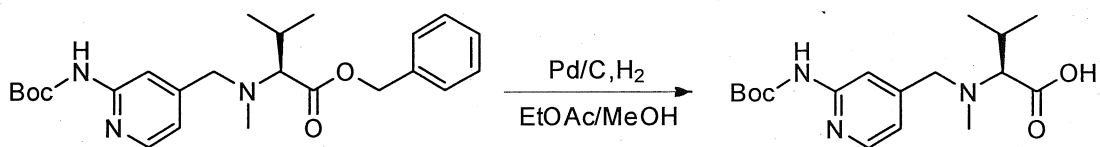
Hoà tan hợp chất **2F** (2,5g, 11,15mmol, 1,00 đương lượng) trong DCE (25mL) sau đó thêm 19,4g (223,14mmol, 20,02 đương lượng) MnO_2 vào. Cho phép hỗn hợp khuấy trộn qua đêm ở 70°C sau đó loại bỏ chất rắn bằng cách lọc. Làm bay hơi phần lọc đến khô để thu được 1,4g (57%) hợp chất **2G** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 2H: benzyl (S)-2-(((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pyridin-4-yl)methyl) (metyl)amino)-3-metylbutanoat



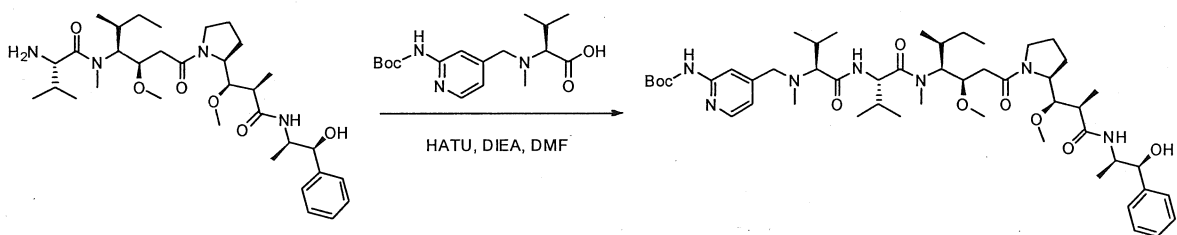
Hoà tan hợp chất **2G** (2,3g, 10,35mmol, 1,00 đương lượng) trong 25mL THF với sự có mặt của hợp chất **1ZC** (2,93g, 11,37mmol, 1,10 đương lượng), DIEA (5,39g, 41,71mmol, 4,03 đương lượng) và $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (4,39g, 20,71mmol, 2,00 đương lượng). Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng trong 6 giờ ở nhiệt độ môi trường sau đó trung hoà bằng 60mL NaHCO_3 (bão hoà) và chiết 3 lần bằng 20mL AcOEt. Gom các pha hữu cơ, rửa hai lần bằng 20mL NaCl (bão hoà), làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:15) để thu được 2,7g (61%) hợp chất **2H** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 2I: Axit (S)-2-(((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pyridin-4-yl)methyl) (methyl)amino)-3-methylbutanoic



Hoà tan hợp chất **2H** (500mg, 1,17mmol, 1,00 đương lượng) trong 10mL AcOEt và 2mL metanol với sự có mặt của Pd/C (250mg) và được hydro hoá trong 3 giờ ở nhiệt độ môi trường và áp suất không khí. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 254mg (64%) hợp chất **2I** dưới dạng chất rắn không màu

Hợp chất 2J: *tert*-butyl (4-(((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-*sec*-butyl)-10-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)-3,6-diisopropyl-2,8-dimethyl-4,7-dioxo-11-oxa-2,5,8-triazadodecyl)pyridin-2-yl) carbamat



Hợp chất **2J** được tạo ra theo cách tương tự với hợp chất **1ZG** từ amin **2D** (85,2mg, 0,14mmol, 1,50 đương lượng), axit **2I** (31,7mg, 0,09mmol, 1,00 đương lượng), HATU (42,9mg, 0,11mmol, 1,20 đương lượng) và DIEA (36,7mg, 0,28mmol, 3,02 đương lượng) trong DMF (3mL). Sau khi làm bay hơi đến khô, thu được 100mg sản phẩm thô dưới dạng chất rắn màu trắng.

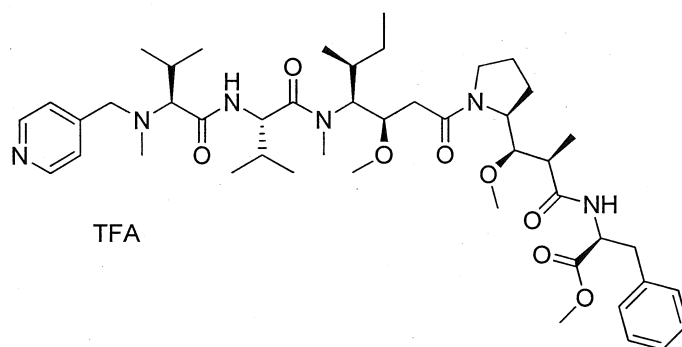
Hoà tan hợp chất **2J** (100mg, 0,11mmol, 1,00 đương lượng) trong 2mL DCM và 1mL TFA. Khuấy trộn phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại (80mg) bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; pha giải hấp: nước/ACN được đệm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **2** với hiệu suất 6% (6,3mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (cột Ascentis Express C18, 2,7 μ m, 4,6 x 100mm; 40°C; 1,8mL/phút, từ 10% đến 95% dung dịch ACN (0,05% TFA) trong 6 phút); ESI (C₄₅H₇₃N₇O₇, khối lượng dư 823,56) m/z : 824,5 (MH⁺) và 412,9 (M.2H⁺/2, 100%), 3,21 phút (99,2%, 210nm)

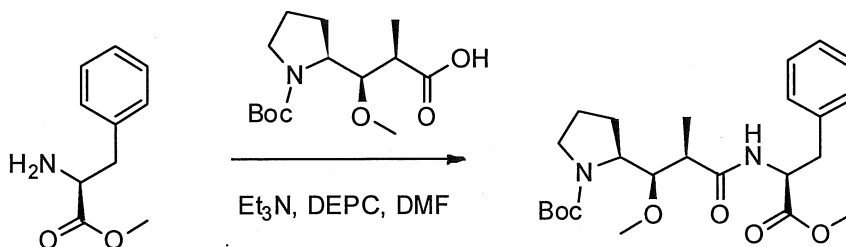
¹H NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,81 - 7,79 (m, 1H); 7,39 - 7,29 (m, 5H); 6,61 - 6,59 (m, 2H); 4,84 - 4,52 (m, 1H); 4,32 - 4,02 (m, 1H); 3,90 - 2,98 (m, 10H); 2,90 - 2,78 (m, 1H); 2,55 - 0,81 (m, 39H).

Hợp chất tham khảo 3

metyl ((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetyl-2-((S)-3-metyl-2-(metyl(pyridin-4-ylmetyl)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat, axit trifloaxetic



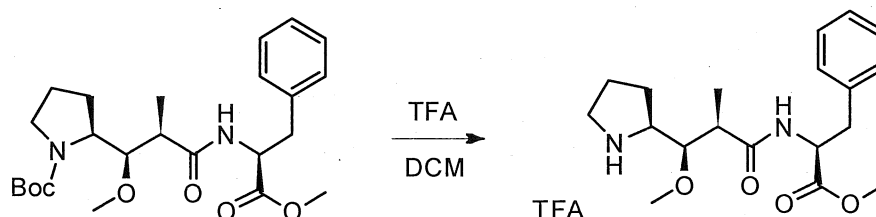
Hợp chất 3A: *tert*-butyl (S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-3-(((S)-1-metoxi-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-carboxylat



Hoà tan hợp chất **1D** (3g, 10,44mmol, 1,00 đương lượng) và metyl (S)-2-amino-3-phenylpropanoat (2,25g, 12,55mmol, 1,20 đương lượng) trong khí trơ trong DMF (40mL). Làm lạnh dung dịch đến 0°C sau đó thêm nhỏ giọt DEPC (1,67mL, 1,05 đương lượng) và TEA (3,64mL, 2,50 đương lượng) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 2 giờ ở 0°C sau đó ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản

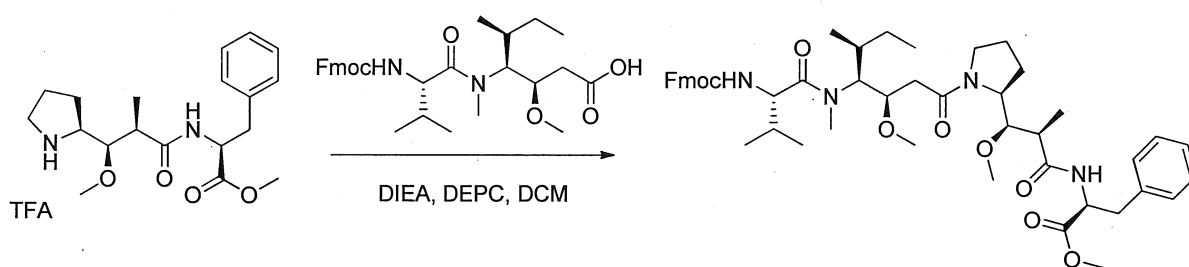
ứng bằng 100mL nước và chiết ba lần bằng 50mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa một lần bằng 100mL KHSO₄ (1mol/L), một lần bằng 100mL NaHCO₃ (bão hoà), một lần bằng 100mL NaCl (bão hoà), sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất để thu được 4g (85%) hợp chất **3A** dưới dạng dầu không màu.

Hợp chất 3B: 2,2,2-trifloaxetat của metyl (S)-2-((2R,3R)-3-metoxi-2-metyl-3-((S)-pyrrolidin-2-yl)propanamido)-3-phenylpropanoat



Hoà tan hợp chất **3A** (5g, 11,15mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong DCM (40mL). Thêm TFA (25mL) vào và khuấy trộn dung dịch trong 2 giờ. Cô đặc hỗn hợp phản ứng dưới áp suất giảm để thu được 8g hợp chất **3B** dưới dạng dầu màu vàng.

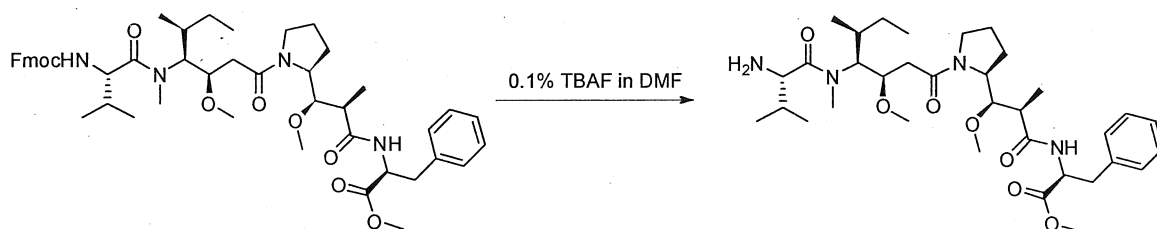
Hợp chất 3C: metyl (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)metoxy)carbonyl)amino)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat



Hoà tan hợp chất **3B** (8,03g, 17,36mmol, 1,00 đương lượng) và **1W** (9,1g, 17,34mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong DCM (80mL). Làm lạnh dung dịch đến 0°C sau đó thêm nhỏ giọt DEPC (2,8mL) và DIEA (12mL) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng trong 2 giờ ở 0°C sau đó ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 200mL nước và chiết ba lần bằng 50mL DCM. Gom các pha hữu cơ, rửa một lần bằng 50mL KHSO₄ (1mol/L), một lần bằng 50mL NaHCO₃ (bão hoà),

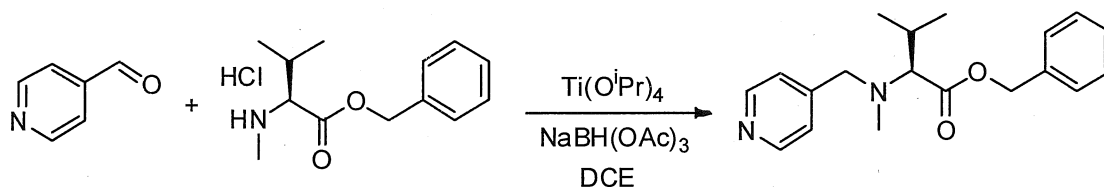
một lần bằng 50mL NaCl (bão hoà), sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 5g (34%) hợp chất **3C** dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hợp chất 3D: methyl (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-amino-N,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoat

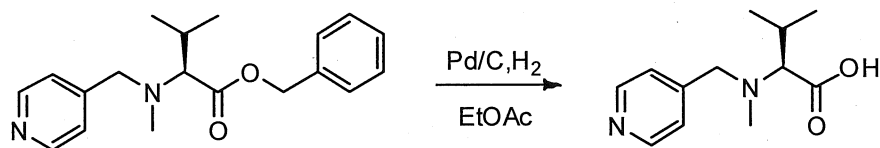


Hoà tan hợp chất **3C** (5,5g, 6,43mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong dung dịch chứa tetrabutylamoni florua (TBAF, 2,61g, 9,98mmol, 1,55 đương lượng) trong DMF (100mL). Khuấy trộn dung dịch ở nhiệt độ môi trường trong 2 giờ sau đó pha loãng với 100mL nước và chiết ba lần bằng 50mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ sau đó làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 3,3g (81%) hợp chất **3D** dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hợp chất 3E: benzyl (S)-3-methyl-2-(methyl(pyridin-4-ylmethyl)amino)butanoat



Hoà tan pyridin-4-carbaldehyt (1g, 9,34mmol, 1,00 đương lượng) trong 10mL 1,2-dicloetan (DCE) với sự có mặt của hợp chất **1ZC** (2,9g, 11,25mmol, 1,21 đương lượng) và titan isopropoxit (IV) (4,19mL, 1,40 đương lượng). Khuấy trộn hỗn hợp ở nhiệt độ môi trường trong 30 phút sau đó thêm 2,77g NaBH(OAc)₃ (13,07mmol, 1,40 đương lượng) vào. Cho phép môi trường phản ứng khuấy trộn qua đêm sau đó trung hoà bằng 100mL nước và chiết hỗn hợp 3 lần bằng 50mL AcOEt. Gom các pha hữu cơ và làm bay hơi đến khô. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:20) để thu được 1,3g (45%) hợp chất **3E** dưới dạng dầu không màu.

Hợp chất 3F: Axit (S)-3-metyl-2-(metyl(pyridin-4-ylmetyl)amino)butanoic

Hoà tan hợp chất **3E** (800mg, 2,56mmol, 1,00 đương lượng) trong 30mL AcOEt với sự có mặt của Pd/C (300mg) và được hydro hoá trong 3 giờ ở nhiệt độ môi trường và áp suất không khí. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm DCM và MeOH (100:1 đến 5:1) để thu được 100mg (18%) hợp chất **3F** dưới dạng chất rắn màu trắng.

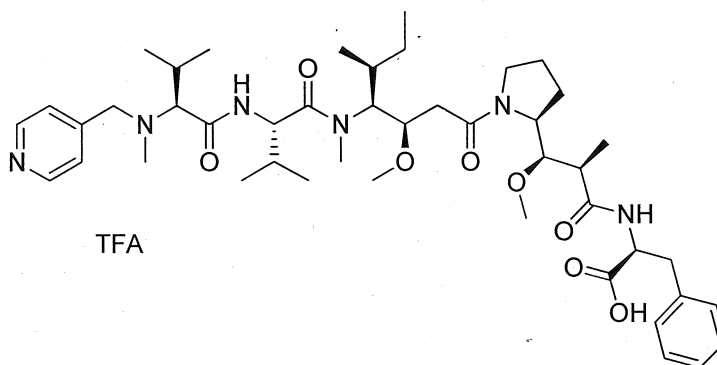
Hoà tan hợp chất **3D** (50mg, 0,08mmol, 1,00 đương lượng) và **3F** (26,34mg, 0,12mmol, 1,50 đương lượng) trong 3mL DCM. Làm lạnh dung dịch đến 0°C sau đó thêm 0,018mL DEPC và 0,0392mL DIEA vào. Khuấy trộn phản ứng ở 0°C trong 2 giờ sau đó ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Cô đặc môi trường phản ứng dưới áp suất giảm và làm sạch phần còn lại (70mg) bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5µm, 19 x 150mm; pha giải hấp:nước/ACN được đệm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; bộ dò tia tử ngoại Waters 2545 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **3** với hiệu suất 27% (20mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (cột Ascentis Express C18, 2,7µm, 4,6 x 100mm; 40°C; 1,5mL/phút, 10% đến 95% dung dịch ACN (0,05% TFA) trong 8 phút); ESI (C₄₆H₇₂N₆O₈, khối lượng dư 836,5) *m/z*: 837,5 (MH⁺) và 419,4 (M.2H⁺/2 (100%)), 7,04 phút (90,0%, 210nm)

¹H NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 8,76 - 8,74 (m, 2H); 8,53 - 8,48 (m, 0,4H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 8,29 - 8,15 (m, 0,8H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 8,01 (s, 2H), 7,31 - 7,22 (m, 5H), 4,88 - 4,68 (m, 3H); 4,31 - 4,07 (m, 2H); 3,94 - 2,90 (m, 18H); 2,55 - 0,86 (m, 38H).

Hợp chất tham khảo 4

Axit (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimethyl-2-((S)-3-methyl-2-(methyl(pyridin-4-ylmethyl)amino)butanamido)butanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoic, axit trifloaxetic



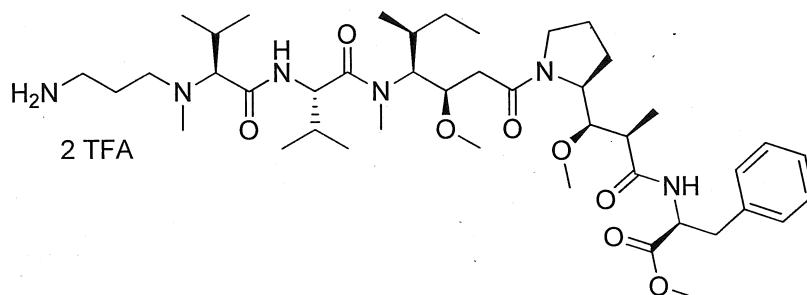
Hoà tan hợp chất 3 (100mg, 0,11mmol, 1,00 đương lượng) trong hỗn hợp gồm nước (5mL), ACN (5mL) và piperidin (2,5mL). Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; pha giải hấp: nước/ACN được đậm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2545 ở 254nm và 220nm), để thu được 20mg (20%) hợp chất 4 dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (cột Ascentis Express C18, 2,7 μ m, 4,6 x 100mm; 40°C; 1,5mL/phút, 10% đến 95% dung dịch ACN (0,05% TFA) trong 8 phút); ESI (C₄₅H₇₀N₆O₈, khối lượng dư 822,5) *m/z*: 823,5 (MH⁺) và 412,4 (M.2H⁺/2, 100%), 6,84 phút (89,1%, 210nm).

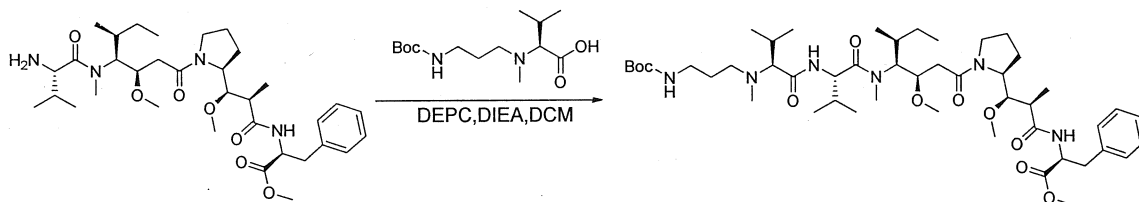
¹H NMR (400MHz, CD₃OD, *ppm*): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 8,79 - 8,78 (m, 2H); 8,09 (m, 2H); 7,30 - 7,21 (m, 5H); 4,80 - 4,80 (m, 1H), 4,36 - 0,87 (m, 58H).

Hợp chất tham khảo 6

metyl (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-aminopropyl) (metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat, axít bis trifloaxetic



Hợp chất 6A: metyl (2S)-2-[(2R)-2-[(R)-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(3-[[*tert*-butoxy)carbonyl]amino]propyl)(metyl)amino]-3-metylbutanamido]-N,3-dimetylbutanamido]-3-metoxi-5-metylheptanoyl]pyrrolidin-2-yl](metoxi)metyl]propanamido]-3-phenylpropanoat



Hoà tan hợp chất **3D** (157,5mg, 0,25mmol, 1,00 đương lượng) ở 0°C trong khí trơ trong 3mL DCM với sự có mặt của axit carboxylic **1ZF** (78,7mg, 0,27mmol, 1,10 đương lượng), DEPC (46μl) và DIEA (124μl). Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 2 giờ ở nhiệt độ thấp và sau đó loại bỏ bể làm lạnh và tiếp tục khuấy trộn trong 4 giờ. Sau đó, cô đặc hỗn hợp dưới áp suất giảm để thu được 200mg hợp chất **6A** dưới dạng dầu thô màu vàng. Dầu này được sử dụng như trong bước tiếp theo.

Hoà tan hợp chất **6A** (200mg, 0,22mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ ở 0°C trong 2mL DCM. Thêm nhỏ giọt TFA (1mL) vào và loại bỏ bể làm lạnh. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng 1 giờ ở nhiệt độ môi trường sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5μm, 19 x 150mm; Pha giải hấp:nước / ACN được đậm với 0,05%

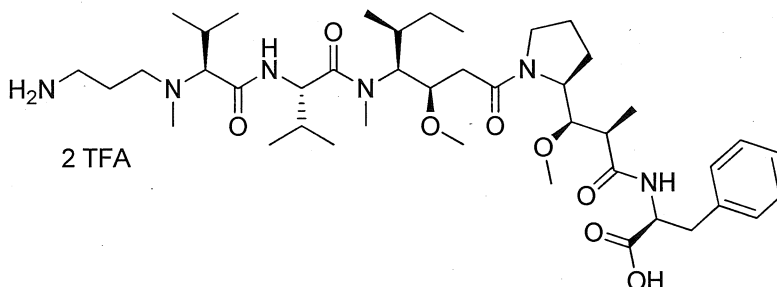
TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm), để thu được 60mg (26%, hiệu suất ở 2 bước) hợp chất **6** dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (Zorbax Eclipse Plus C8, 3,5 μ m, 4,6 x 150mm; 1mL/phút, 40°C, 30 đến 80% dung dịch metanol (0,1% H₃PO₄) trong 18 phút); ESI (C₄₃H₇₄N₆O₈, khối lượng dư 802,56) *m/z*: 804 (MH⁺); 11,50 phút (91,5%, 210nm).

¹H NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 8,52 (d, 0,3H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 8,25 (d, 0,5H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 7,30–7,22 (m, 5H); 4,9–4,6 (m, 3H); 4,2–4,0 (m, 1H); 4,0–0,86 (m, 61H).

Hợp chất tham khảo 7

Axit (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-aminopropyl) (metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl) pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoic, axit bis trifloaxetic



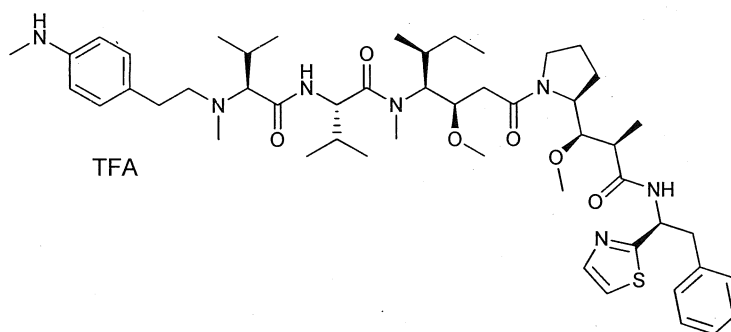
Hoà tan hợp chất **6** (70mg, 0,08mmol, 1,00 đương lượng) trong hỗn hợp gồm nước (5mL), ACN (2,5mL) và piperidin (5mL). Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ ACN được đệm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm), để thu được 14,6mg (21%) hợp chất **7** dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (Ascentis Express C18, 2,7 μ m, 4,6 x 100mm; 1,5mL/phút, 40°C, 0 đến 80% dung dịch metanol (0,05% TFA) trong 8 phút); ESI (C₄₂H₇₂N₆O₈, khối lượng dư 788,54) m/z : 790 (MH⁺), 5,71 phút (96,83%, 210nm).

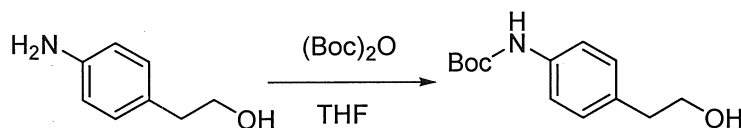
¹H NMR (300MHz, CD₃OD, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 8,42 (d, 0,3H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 8,15 (d, 0,2H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 7,31–7,21 (m, 5H); 4,9–4,6 (m, 3H); 4,25–4,0 (m, 1H); 4,0–0,86 (m, 59H).

Hợp chất 11

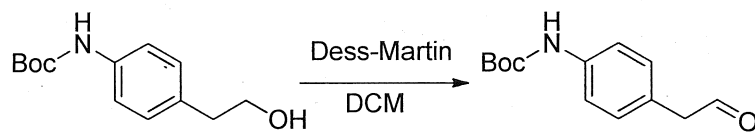
(S)-N-((3R,4S,5S)-3-methoxy-1-((S)-2-((1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((S)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)ethyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-N,3-dimethyl-2-((S)-3-methyl-2-(methyl(4-(methylamino)phenetyl)amino) butanamido)butanamit, axit trifloaxetic



Hợp chất 11A: *tert*-butyl N-[4-(2-hydroxyethyl)phenyl]carbamate

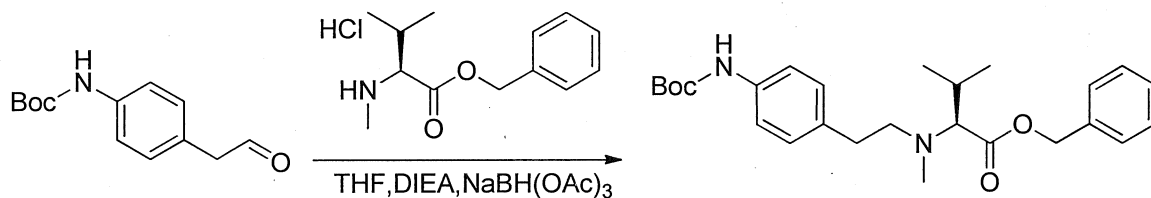


Thêm di-*tert*-butyl dicacbonat (16,7g, 77mmol, 1,05 đương lượng) vào dung dịch chứa 2-(4-aminophenyl)etanol (10g, 72,9mmol, 1 đương lượng) trong THF (200mL) và khuấy phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường. Pha loãng hỗn hợp bằng EtOAc (200 mL), rửa bằng nước (200mL), sau đó HCl 1M (100mL), sau đó dung dịch nước bão hòa NaHCO₃ (100mL) sau đó nước muối (100mL). Làm khô pha hữu cơ qua MgSO₄ sau đó làm bay hơi đến khô dưới áp suất giảm. Nghiền sản phẩm thô hai lần bằng heptan (150mL) và làm khô trong chân không để thu được hợp chất 11A là chất rắn màu trắng (14,7g, 84%).

Hợp chất 11B: *tert*-butyl *N*-[4-(2-oxoethyl)phenyl]carbamate

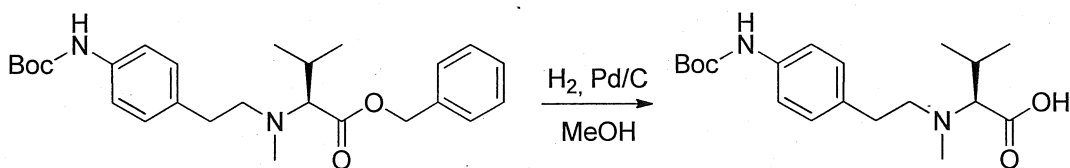
Hoà tan hợp chất **11A** (2,5g, 10,5mmol, 1,00 đương lượng) trong 25mL DCM sau đó làm lạnh đến -78°C . Thêm nhỏ giọt dung dịch Dess–Martin Periodinan (DMP, 6,71g, 15,8mmol, 1,5 đương lượng) trong DCM (10mL). Loại bỏ bể làm lạnh và tiếp tục khuấy trộn trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường. Trung hoà phản ứng này bằng 60mL hỗn hợp gồm dung dịch nước natri bicacbonat bão hoà và dung dịch nước $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ bão hoà theo tỷ lệ 50/50. Chiết dung dịch thu được 3 lần bằng 30mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa hai lần bằng dung dịch nước NaCl bão hoà, làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên silicagel (EtOAc/PE 1/15) để thu được 1,0g (40%) hợp chất **11B** dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hợp chất 11C: benzyl (2*S*)-2-[[2-(4-[[*tert*-butoxy)carbonyl]amino]phenyl)ethyl](metyl)amino]-3-metylbutanoat.



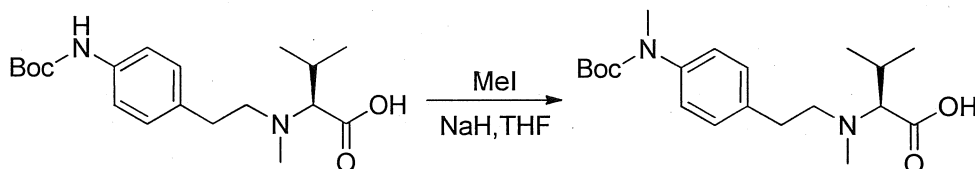
Hoà tan hợp chất **11B** (3,5g, 13,6mmol, 1,1 đương lượng) trong THF (30mL) với sự có mặt của DIEA (6,4g, 49,7mmol, 4,0 đương lượng), aldehyt **11B** (2,9g, 12,3mmol, 1,0 đương lượng) và natri triaxetoxymorohydrua (5,23g, 49,7mmol, 2,0 đương lượng). Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó trung hoà bằng 60mL dung dịch natri bicacbonat bão hoà. Chiết dung dịch thu được 3 lần bằng 30mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, rửa hai lần bằng dung dịch nước NaCl bão hoà, làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên silica gel (EtOAc/PE 1:20) để thu được 3,7g (68%) hợp chất **11C** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 11D: Axit (2S)-2-[[2-(4-[[*tert*-butoxy)carbonyl]amino]phenyl)ethyl] (metyl)amino]-3-metylbutanoic



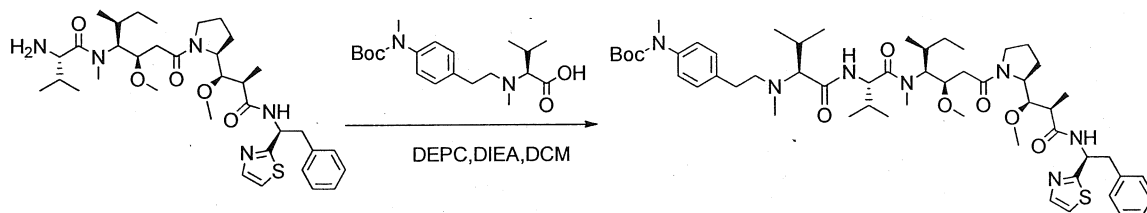
Hoà tan hợp chất **11C** (2g, 4,5mmol, 1 đương lượng) trong 10mL metanol với sự có mặt của Pd/C (2g) và được hydro hoá trong 2 giờ ở nhiệt độ và áp suất bình thường. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 1,2g (75%) hợp chất **11D** dưới dạng dầu màu vàng.

Hợp chất 11E: Axit (2S)-2-[[2-(4-[[*tert*-butoxy)carbonyl](metyl)amino]phenyl)ethyl](metyl) amino]-3-metylbutanoic



Hoà tan hợp chất **11D** (1,2g, 3,4mmol, 1,00 đương lượng) trong khí trơ trong THF (20mL). Làm lạnh môi trường phản ứng bằng bể nước đá sau đó thêm theo các phần NaH (60% trong dầu, 549mg, 13,7mmol, 4,0 đương lượng) vào, tiếp theo iodometan (4,9g, 34mmol, 10 đương lượng). Cho phép phản ứng khuấy trộn qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó trung hoà bằng nước và rửa bằng 100mL EtOAc. Điều chỉnh độ pH của dung dịch nước đến 6 đến 7 bằng 1N HCl. Chiết dung dịch nước này 3 lần bằng 100mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc để thu được 800mg (64%) hợp chất **11E** dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hợp chất 11F: *tert*-butyl *N*-[4-(2-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metyl-2-[[[(1S)-2-phenyl-1-(1,3-thiazol-2-yl)etyl]carbamoyl]etyl]pyrrolidin-1-yl]-5-metyl-1-oxoheptan-4yl](metyl)carbamoyl]-2-metylpropyl]carbamoyl]-2-metylpropyl](metyl)amino]etyl]phenyl]-*N*-metylcarbamate



Hợp chất **11F** được tạo ra theo cách tương tự với hợp chất **6A** từ amin **1Y** (150mg, 0,22mmol, 1,2 đương lượng) và axit **11E** (70mg, 0,19mmol, 1,0 đương lượng). Sau khi làm sạch trên silicagel (EtOAc/PE 1:1) thu được 100mg (52%) sản phẩm mong muốn dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

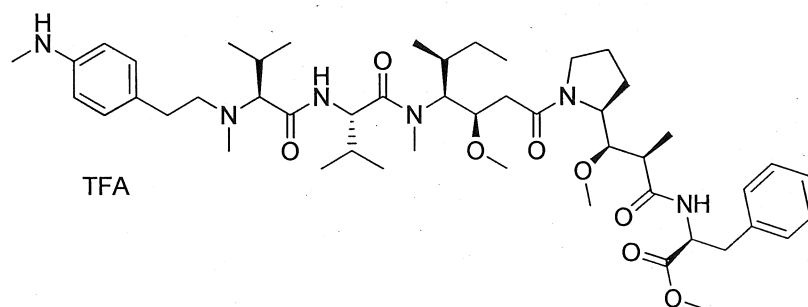
Hợp chất **11** được tạo ra theo cách tương tự như đối với hợp chất **1** từ hợp chất trung gian **11F** (100mg, 0,1mmol). Làm sạch phần còn lại HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ACN được đậm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **11** với hiệu suất 39% (39,7mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (Eclipse Plus C8, 3,5 μ m, 4,6 x 150mm; 1mL/phút, 40°C, 50 đến 95% dung dịch metanol (0,05% TFA) trong 18 phút); ESI ($C_{50}H_{77}N_7O_6S$, khối lượng dư 903,57) m/z : 904,5 (MH^+), 7,53 phút (93,68%, 254nm).

1H NMR (300MHz, CD_3OD , ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 8,84 (d, 0,5H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 8,7–8,5 (m, 0,9H, NHCO trao đổi không hoàn chỉnh); 7,76–7,73 (m, 1H); 7,55 - 7,4 (m, 1H); 7,28–7,22 (m, 7H); 7,08–7,05 (m, 2H); 5,51–5,72 (m, 1H); 4,9–4,80 (m, 2H); 4,3–0,7 (m, 60H).

Hợp chất 12

metyl (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetyl-2-((S)-3-metyl-2-(metyl(4-(metyl(amino)phenetyl)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat, axit trifloaxetic



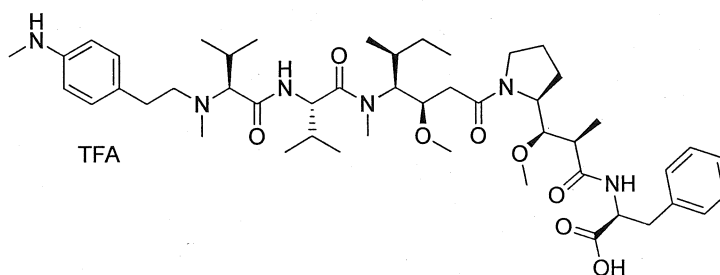
Theo cách tương tự như đối với các pha cuối cùng trong quá trình tổng hợp hợp chất **1**, hợp chất **12** được tạo ra ở hai bước từ amin **3D** (118mg, 0,19mmol) và axit **11E** (82mg, 0,22mmol). Làm sạch phần còn lại cuối cùng bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ACN được đệm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **12** với hiệu suất 7% (13,7mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (Eclipse Plus C8, 3,5 μ m, 4,6 x 150mm; 1mL/phút, 40°C, 40 đến 95% dung dịch metanol (0,05% TFA) trong 18 phút); ESI (C₄₉H₇₈N₆O₈, khối lượng dư 878,59) *m/z*: 879,7 (MH⁺), 10,07 phút (90,6%, 254nm).

¹H:NMR (300MHz, CD₃OD, *ppm*): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,40 (se, 2H); 7,38–7,22 (m, 7H); 4,95–4,7 (m, 3H); 4,2–4,0 (m, 1H); 3,9–0,86 (m, 62H).

Hợp chất 13

Axit (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetyl-2-((S)-3-metyl-2-(metyl(4-(metyl(amino)phenetyl)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxymetyl heptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxymetylpropanamido)-3-phenylpropanoic, axit trifloaxetic



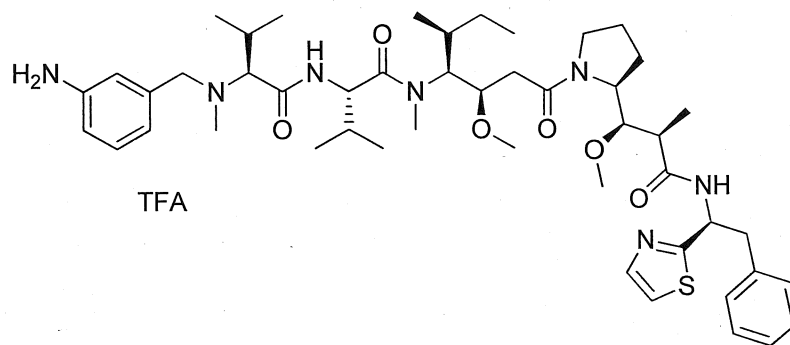
Hợp chất **13** được tạo ra theo cách tương tự như đối với hợp chất **7** từ hợp chất **12** (100mg, 0,10mmol). Làm sạch phần còn lại bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ACN được đậm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **13** với hiệu suất 20% (20 mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (Ascentis Express C18, 2,7 μ m, 4,6 x 100mm; 1,5mL/phút, 40°C, 10 đến 95% dung dịch metanol (0,05% TFA) trong 8 phút); ESI (C₄₈H₇₆N₆O₈, khối lượng dư 864,57) *m/z*: 865,6 (MH⁺), 6,05 phút (90,9%, 210nm).

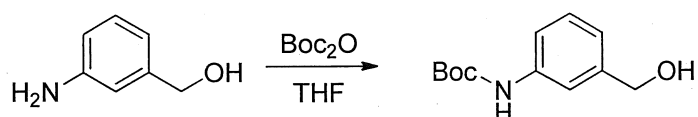
¹H NMR: (300MHz, CD₃OD, *ppm*): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,32–7,19 (m, 9H); 4,9–4,65 (m, 3H); 4,2–4,0 (m, 1H); 3,9–0,86 (m, 59H).

Ví dụ 14

(S)-2-((S)-2-((3-aminobenzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N-((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metyl-3-oxo-3-(((S)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-N,3-dimetylbutanamit, axit trifloaxetic

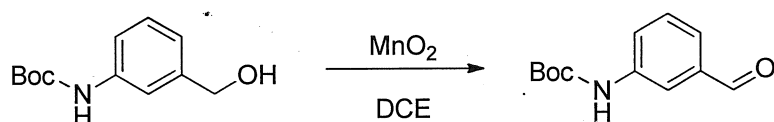


Hợp chất 14A: *tert*-butyl (3-(hydroxymetyl)phenyl) carbamat



Hoà tan (3-aminophenyl)metanol (3g, 24,36mmol, 1,00 đương lượng) trong THF (60mL) mà sau đó thêm di-*tert*-butyl dicacbonat (6,38g, 29,23mmol, 1,20 đương lượng) vào. Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường và sau đó pha loãng phản ứng bằng cách thêm 200mL nước. Chiết sản phẩm 3 lần bằng 100mL AcOEt và sau đó gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô (13,85g hợp chất **14A**) dưới dạng dầu màu vàng.

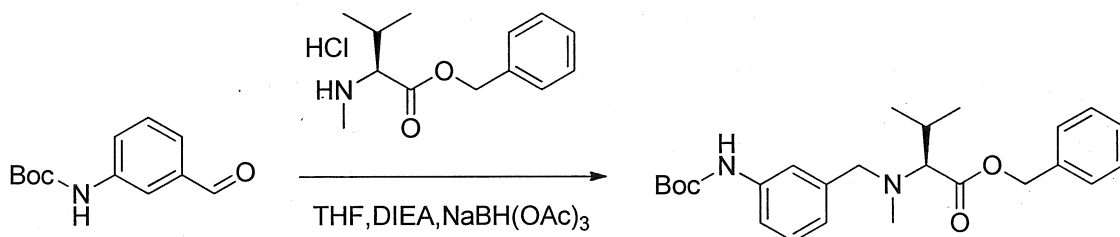
Hợp chất 14B: *tert*-butyl (3-formylphenyl)carbamát



Hoà tan hợp chất **14A** (13,8g, 61,81mmol, 1,00 đương lượng) trong DCE (400mL) và sau đó thêm MnO₂ (54g, 621,14mmol, 10,05 đương lượng). Cho phép khuấy trộn hỗn hợp ở nhiệt độ môi trường trong 3 ngày mà sau đó loại bỏ chất rắn bằng cách lọc. Làm bay hơi phần lọc đến khô và làm sạch phần còn lại trên cột silic

oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:30) để thu được 3g (22%) hợp chất **14B** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 14C: benzyl (S)-2-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)benzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanoat



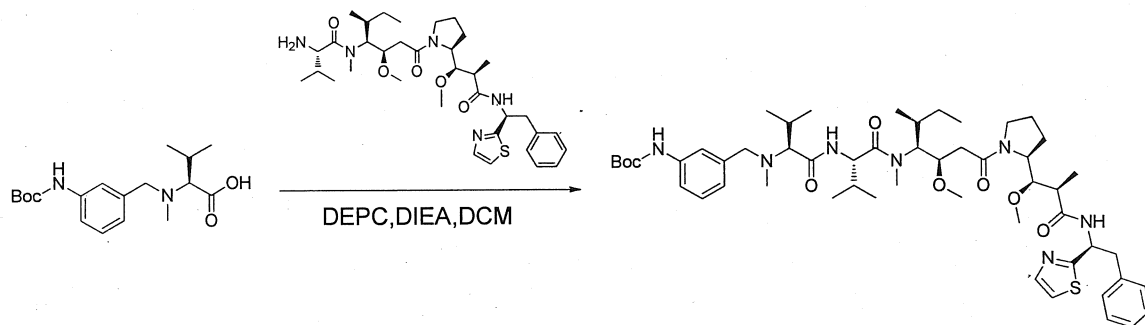
Hoà tan hợp chất **14B** (1g, 4,52mmol, 1,00 đương lượng) trong 20mL THF với sự có mặt của hợp chất **1ZC** (1,16g, 4,50mmol, 1,00 đương lượng), DIEA (3mL) và NaBH(OAc)₃ (1,92g, 9,06mmol, 2,01 đương lượng). Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường và sau đó trung hoà bằng 100mL nước và chiết 3 lần bằng 50mL AcOEt. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô đặc. Làm sạch phần còn lại trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:50) để thu được 1,9g (99%) hợp chất **14C** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 14D: Axit (S)-2-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)benzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanoic



Hoà tan hợp chất **14C** (1g, 2,34mmol, 1,00 đương lượng) trong 30mL AcOEt và 4mL metanol với sự có mặt của Pd/C (400mg) và được hydro hoá trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường và áp suất không khí. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 680mg (86%) hợp chất **14D** dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 14E: *tert*-butyl (3-((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-*sec*-butyl)-3,6-diisopropyl-10-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((S)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)ethyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)-2,8-dimethyl-4,7-dioxo-11-oxa-2,5,8-triazadodecyl)phenyl) carbamat



Tổng hợp hợp chất **14E** theo cách tương tự như đối với hợp chất **3** từ amin **1Y** (100mg, 0,15mmol, 1,00 đương lượng), axit **14D** (102,27mg, 0,30mmol, 2,00 đương lượng), DEPC (0,053mL) và DIEA (0,046mL) trong DCM (3mL). Làm sạch sản phẩm thô (80mg) trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:1) để thu được 100mg (67%) hợp chất **14E** dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt.

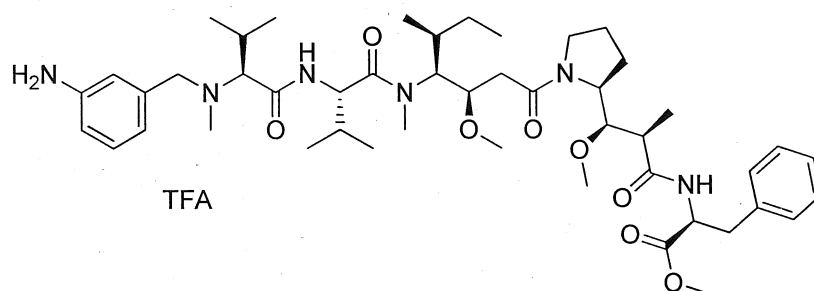
Tổng hợp hợp chất **14** theo cách tương tự như đối với hợp chất **2** từ hợp chất trung gian **14E** (100mg, 0,10mmol, 1,00 đương lượng). Làm sạch sản phẩm thô (80mg) bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ ACN được đệm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; bộ dò tia tử ngoại Waters 2545 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **14** với hiệu suất 10% (10mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (cột Eclipse plus C8, 3,5 μ m, 4,6 x 150mm; 40°C; 1,0mL/phút, 40% đến 95% dung dịch MeOH (0,05% TFA) trong 18 phút); ESI (C₄₈H₇₃N₇O₆S, khối lượng dư 875,5) *m/z*: 876,5 (MH⁺) và 438,9 (M.2H⁺/2, 100%), 11,35 phút (95,6%, 210nm).

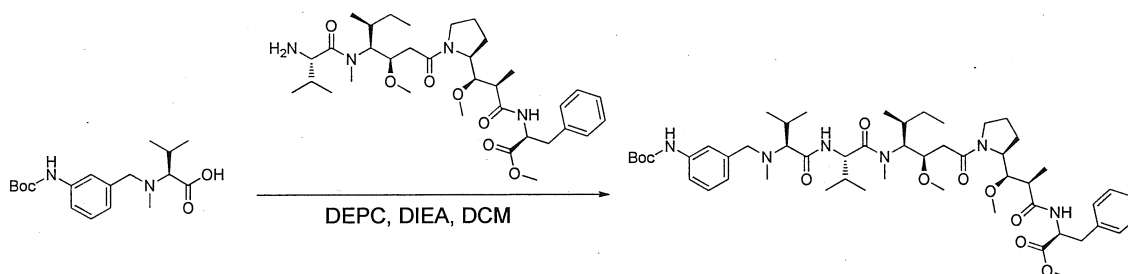
¹H NMR (400MHz, CD₃OD, *ppm*): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 8,92 - 8,86 (m, 0,4H, NH trao đổi không hoàn chỉnh); 8,70 - 8,54 (m, 0,6H, NH trao đổi không hoàn chỉnh); 7,88 - 7,78 (m, 1H); 7,60 - 7,50 (m, 1H); 7,45 - 6,97 (m, 9H); 5,80 - 5,65 (m, 1H); 4,85 - 4,70 (m, 1H); 4,40 - 0,80 (m, 56H).

Hợp chất 15

metyl (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-aminobenzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat, axit trifloaxetic



Hợp chất 15A: metyl (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat



Hợp chất **15A** được tổng hợp theo cách tương tự như đối với hợp chất **3** từ amin **3D** (200mg, 0,32mmol, 1,00 đương lượng), axit **14D** (212,6mg, 0,63mmol, 2,00 đương lượng), DEPC (0,1103mL) và DIEA (0,157mL, 3,00 đương lượng) trong DCM (5mL). Làm sạch sản phẩm thô trên cột silic oxit với hỗn hợp gồm EtOAc và PE (1:1) để thu được 200mg (67%) hợp chất **15A** dưới dạng chất rắn màu vàng.

Hợp chất 15: Hợp chất **15** được tổng hợp theo cách tương tự như đối với hợp chất **2** từ hợp chất trung gian **15A** (200mg, 0,21mmol, 1,00 đương lượng). Làm sạch sản phẩm thô HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ ACN được đậm với 0,05% TFA;

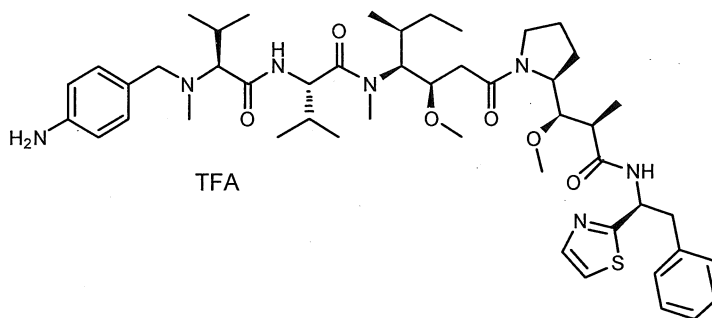
Gradien 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; bộ dò tia tử ngoại Waters 2545 ở 254nm và 220nm). Thu được hợp chất **15** với hiệu suất 19% (38,6mg) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (Cột Ascentis Express C18, 2,7 μ m, 4,6 x 100mm; 40°C; 1,5mL/phút, 10% đến 95% dung dịch MeOH (0,05% TFA) trong 8 phút); ESI (C₄₇H₇₄N₆O₈, khối lượng dư 850,5) m/z : 851,5 (MH⁺) và 426,4 (M.2H⁺/2, 100%), 6,61 phút (91,1%, 210nm).

¹H NMR (400MHz, CD₃OD, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,53 - 7,42 (m, 1H); 7,35 - 7,18 (m, 8H); 4,88 - 4,79 (m, 2H); 4,42 - 4,00 (m, 3H); 3,93 - 2,71 (m, 22H); 2,61 - 0,81 (m, 33H).

Hợp chất 20

(S)-2-((S)-2-((4-aminobenzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N-((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metyl-3-oxo-3-(((S)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-N,3-dimetylbutanamit, axit trifloaxetic



Hợp chất **20** được tạo ra theo cách tương tự như đối với hợp chất **1**, từ amin **1ZC** và aldehyt tương ứng.

4-nitrobenzaldehyt có liên quan đến quá trình tổng hợp hợp chất **20** có bán sẵn trên thị trường.

Quá trình tổng hợp hợp chất **20** được hoàn thành bằng cách khử nhóm nitro. Quá trình này được thực hiện như sau: hoà tan (2S)-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]carbamoyl]-1-metoxi-2-metyletyl]pyrrolidin-1-yl]-3-metoxi-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl]-N,3-dimetyl-2-

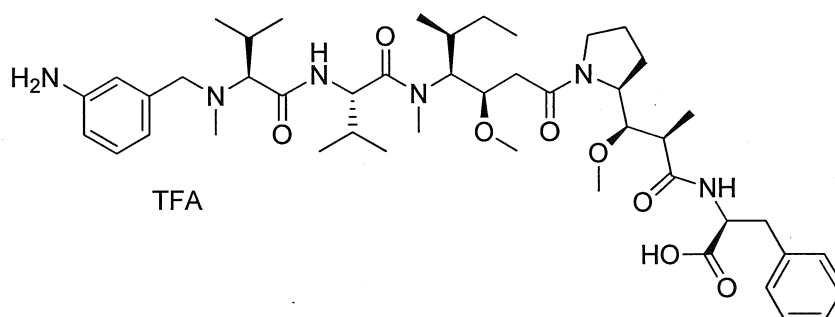
[(2S)-3-methyl-2-[metyl[(4-nitrophenyl)metyl]amino]butanamido]butanamit (40mg, 0,05mmol, 1,0 đương lượng) trong 15mL etanol. Thêm thiếc clorua được dihydrat hoá (II) (317mg, 1,4mmol, 30 đương lượng) vào và dung dịch được cho phép khuấy trộn trong 3 ngày ở nhiệt độ môi trường. Trung hoà phản ứng này bằng 50mL nước, sau đó chiết ba lần bằng 50mL EtOAc. Gom các pha hữu cơ, làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được hợp chất **20** ở trạng thái thô (độ tinh khiết: 93,2%; lượng: 21,6mg).

Làm sạch hợp chất này bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ ACN được đậm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2489 ở 254nm và 220nm), để thu được muối TFA tương ứng dưới dạng chất rắn màu trắng.

^1H NMR: (400MHz, CD_3OD , ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,85–7,80 (m, 1H); 7,6–7,5 (m, 1H); 7,4–7,15 (m, 5H); 7,1–7,05 (m, 2H); 6,73–6,70 (m, 2H); 5,8–5,55 (m, 1H); 5,0–4,7 (m, 2H); 4,25–4,05 (m, 1H); 4,0–0,8 (m, 54H), LC/MS/UV ESI: ($\text{C}_{48}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$, khối lượng dư 875,53) m/z 876 (MH^+), 439 [75%, ($\text{M}, 2\text{H}^+$)/2]; UV: RT = 4,83 phút (96,8%, 254 nm). ^1H NMR (400MHz, CD_3OD , ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,85–7,80 (m, 1H); 7,6–7,5 (m, 1H); 7,4–7,1 (m, 7H); 6,76–6,72 (m, 2H); 5,8–5,55 (m, 1H); 4,9–4,65 (m, 2H); 4,25–4,05 (m, 1H); 4,0–0,8 (m, 54H).

Hợp chất 29

Axit (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-aminobenzyl) (metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoic, axit trifloaxetic



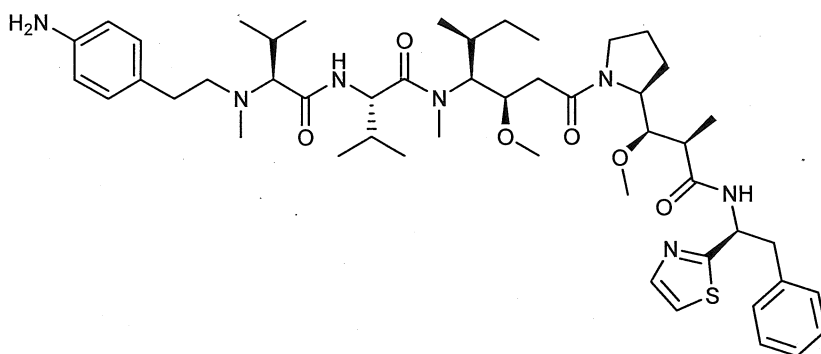
Hoà tan hợp chất **15** (100mg, 0,10mmol, 1,00 đương lượng) trong hỗn hợp gồm nước (5mL), ACN (5mL) và piperidin (2,5mL). Cho phép khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường và sau đó cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại bằng HPLC điều chế (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; Pha giải hấp: nước/ ACN được đệm với 0,05% TFA; Gradient 20% đến 40% ACN trong 10 phút sau đó 40% đến 100% ACN trong 2 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2545 ở 254nm và 220nm), để thu được 20mg (20%) hợp chất **29** dưới dạng chất rắn màu trắng.

LC/MS/UV (Cột Eclipse Plus C8, 3,5 μ m, 4,6 x 150mm; 40°C; 1,0mL/phút, 40% đến 95% dung dịch MeOH (0,05% TFA) trong 18 phút); ESI (C₄₆H₇₂N₆O₈, khối lượng dư 836,54) m/z : 837,5 (MH⁺) và 419,4 (M.2H⁺/2, 100%), 10,61 phút (92,5%, 210nm).

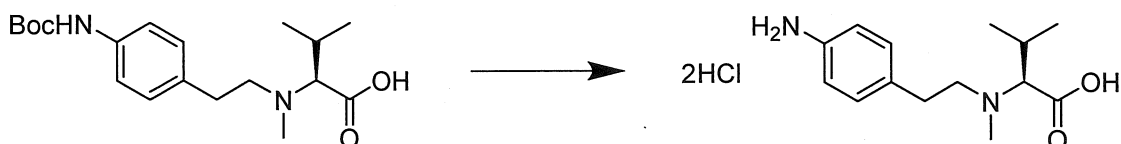
¹H NMR: (400MHz, CD₃OD, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay) 7,38 - 7,15 (m, 6H); 7,00 - 6,99 (m, 3H); 4,85 - 4,68 (m, 2H); 4,37 - 3,38 (m, 11H); 3,31 - 2,70 (m, 8H); 2,60 - 0,82 (m, 35H).

Hợp chất 61

(S)-2-((S)-2-((4-aminophenyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N-((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metyl-3-oxo-3-(((S)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-N,3-dimetylbutanamit



Hợp chất 61A: N-(4-aminophenyl)-N-metyl-L-valin dihydroclorua



Hoà tan hợp chất **11D** (962mg, 2,75mmol) trong 10ml dung dịch có bán sẵn trên thị trường chứa HCl trong propan-2-ol (5 - 6M) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phân tích TLC biểu thị sự tiêu thụ hoàn toàn vật liệu ban đầu. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và chất rắn màu vàng thu được được nghiền với Et₂O (2 x 10ml). Làm khô sản phẩm trong chân không để thu được hợp chất **61A** là chất rắn màu vàng (322mg, 47%).

Hợp chất 61: Hoà tan axit carboxylic **61A** (73mg, 0,23mmol, 1 đương lượng) và amin **1Y** (150mg, 0,23mmol, 1 đương lượng) trong DMF khô (2ml). Thêm DIEA (158µl, 0,90mmol, 4 đương lượng) và DECP (cũng được gọi là DEPC) (51µl, 0,34mmol, 1,5 đương lượng) vào và phản ứng được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Phân tích bằng LC-MS thể hiện sự tiêu thụ hoàn toàn vật liệu ban đầu. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và làm sạch phần còn lại bằng sắc ký nhanh trên silicagel (DCM/MeOH) để thu được hợp chất **61** là chất rắn màu vàng nhạt (83mg, 40%).

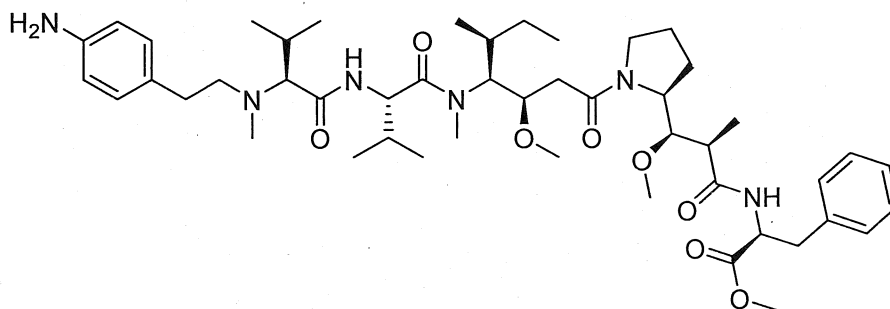
¹H NMR: (500MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay), 8,86 (d, 0,5H, NHCO); 8,65 (d, 0,5H, NHCO), 8,11-8,05 (m, 1H, NHCO), 7,80 (d, 0,5H, thiazol), 7,78 (d, 0,5H, thiazol), 7,65 (d, 0,5H, thiazol), 7,63 (d, 0,5H, thiazol), 7,32 – 7,12 (m, 5H), 6,83 (d, *J*=8,3 Hz, 2H), 6,45 (d, *J*=8,3 Hz, 2H), 5,56 – 5,49 (m, 0,5 H), 5,42 – 5,35 (m, 0,5H), 4,78 (s, 2H, NH₂), 4,74 – 4,46 (m, 2H), 4,01 – 0,66 (m, 57H).

HPLC (Xbridge Shield C18, 3,5µm, 4,6 x 50mm; 3,5ml/phút, 40°C, 0 đến 95% dung dịch MeCN (0,1% TFA) trong 2,25 phút sau đó 95% MeCN trong 0,5 phút, Tr = 1,31 phút (96,5%, 220nm).

m/z (Q-TOF ESI⁺) 890,5558 (2%, MH⁺, C₄₉H₇₆N₇O₆S đòi hỏi 890,5572), 445,7834 (100%, (MH₂)²⁺, C₄₉H₇₇N₇O₆S đòi hỏi 445,7823).

Hợp chất 62

Metyl ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-aminophenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-L-phenylalaninat



Hợp chất **62** được tạo ra theo cách tương tự như đối với hợp chất **61**, bằng cách sử dụng axit carboxylic **61A** (69mg, 0,21 mmol, 1 đương lượng), amin **3D** (135mg, 0,21mmol, 1 đương lượng), DIEA (75μl, 0,43mmol, 2 đương lượng) và DECP (49μl, 0,32mmol, 1,5 đương lượng). Làm sạch sản phẩm thô bằng sắc ký nhanh trên silicagel (DCM/MeOH) để thu được hợp chất **62** là chất rắn màu vàng nhạt (82mg, 45%).

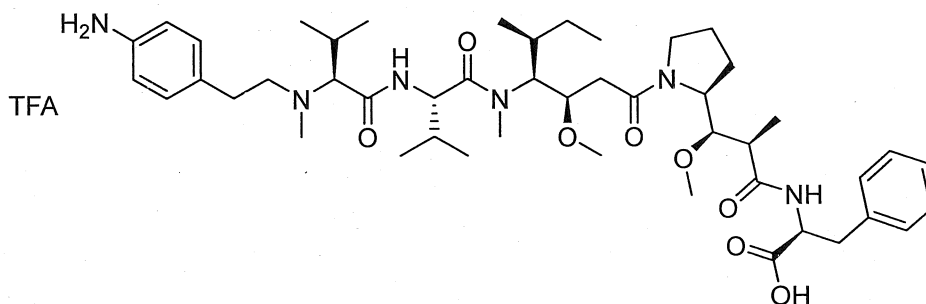
^1H NMR: (500MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay), 8,50 (d, $J=8,3$, 0,5H, NHCO); 8,27 (d, $J=8,0$, 0,5H, NHCO), 8,15-8,04 (m, 1H, NHCO), 7,27 – 7,13 (m, 5H), 6,86 – 6,79 (m, 2H), 6,48 – 6,42 (m, 2H), 4,78 (s, 2H, NH₂), 4,74 – 4,44 (m, 3H), 4,01 – 3,72 (m, 1,5H), 3,66 (s, 1,5H, CO₂Me), 3,63 (s, 1,5H, CO₂Me), 3,57 - 0,65 (m, 55,5H).

HPLC (Xbridge Shield C18, 3,5μm, 4,6 x 50mm; 3,5ml/phút, 40°C, 0 đến 95% dung dịch MeCN (0,1% TFA) trong 2,25 phút sau đó 95% MeCN trong 0,5 phút, Tr = 1,29 phút (95,3%, 220nm).

m/z (Q-TOF ESI⁺) 865,5800 (2%, MH⁺, C₄₈H₇₇N₆O₈ đòi hỏi 865,5797), 433,2937 (100%, (MH₂)²⁺, C₄₈H₇₈N₆O₈ đòi hỏi 433,2935).

Hợp chất 63

**((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-aminophenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-L-phenylalanin
2,2,2-trifloaxetat**



Hoà tan hợp chất **62** (23mg, 0,03mmol) trong hỗn hợp gồm nước (1ml) và axetonitril (1ml). Thêm piperidin (0,75ml) vào và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Phân tích TLC biểu thị sự tiêu thụ hoàn toàn vật liệu ban đầu. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm, và phần còn lại được làm sạch bằng HPLC điều chế (SunFire Prep cột C18 OBD, 5 μ m, 19 x 150mm; pha động: nước/MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 20% đến 40% MeCN trong 10 phút, sau đó 40% đến 100% MeCN trong 2 phút; bộ dò tia tử ngoại Waters 2545 ở 254nm đến 220nm). Thu được hợp chất **63** là chất rắn màu trắng (14mg, 66%).

^1H NMR: (500MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ (Sự có mặt của chất đồng phân quay), 12,7 (s(br), 1H, CO₂H), 9,58 (m(br), 1H); 9,04 – 8,89 (m, 1H), 8,41 (d, 0,6H, NHCO), 8,15 (d, 0,4H, NHCO), 7,27 – 7,13 (m, 5H), 7,13 – 6,99 (m(br), 2H), 6,90 – 6,64 (s(br), 2H), 4,77 – 3,40 (m, 10H), 3,34 – 2,75 (m, 20H), 2,34 – 1,94 (m, 4H), 1,90 – 0,7 (m, 25H).

HPLC (Xbridge Shield C18, 3,5 μ m, 4,6 x 50mm; 3,5ml/phút, 40°C, 0 đến 95% dung dịch MeCN (0,1% TFA) trong 2,25 phút sau đó 95% MeCN trong 0,5 phút, Tr = 1,24 phút (100%, 220nm).

m/z (Q-TOF ESI⁺) 851,5641 (6%, MH⁺, C₄₇H₇₅N₆O₈ đòi hỏi 851,5641), 426,2854 (100%, (MH₂)²⁺, C₄₇H₇₆N₆O₈ đòi hỏi 426,2857).

Ví dụ 15: Hoạt tính chống tăng sinh tế bào của dược chất**Phương pháp:**

Nuôi cấy tế bào. Các tế bào A549 (Ung thư phổi tế bào không nhỏ - ATCC CCL-185) và MDA-MB-231 (ung thư biểu mô tuyến vú – ATCC HTB-26) lần lượt được nuôi cấy trong Minimum Essential Medium Eagle (MEM) với 5% huyết thanh bào thai bê (FCS) và Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) với 10% FCS. Tế bào MCF7 (ung thư biểu mô ống dẫn sữa – ATCC HTB-22) và SN-12C (ung thư biểu mô thận – ATCC) được duy trì trong môi trường RPMI1640 (mà không có đỏ phenol đối với tế bào MCF7) chứa 10% FCS. Tất cả môi trường được tạo huyền phù với fungizon (1,25µg/mL) và penixilin-streptomycin (100U / 100µg/mL). Tế bào được nuôi cấy trong các điều kiện tiêu chuẩn trong thiết bị ủ ở 37°C, 5% CO₂ và độ ẩm không khí 95%.

Hoạt tính chống tăng sinh tế bào đối với 4 dòng tế bào khối u. Các dược chất được chọn được nghiên cứu đối với hoạt tính chống tăng sinh tế bào của chúng bằng cách sử dụng thử nghiệm tăng sinh tế bào ATPlite (Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France) đối với nhóm toàn diện gồm 4 dòng tế bào. Tế bào được tạo hạt trong đĩa có 96 lỗ (10³ tế bào/lỗ đối với A549, 2,10³ đối với MCF7, MDA-MB-231 và SN12C) ở ngày 0 ở nồng độ để đảm bảo các tế bào vẫn còn trong pha sinh trưởng tế bào logarit trong toàn bộ thời gian xử lý dược chất 72 giờ. Sau thời gian ủ 24 giờ, tất cả tế bào được xử lý bằng dãy pha loãng các hợp chất được thử nghiệm (11µL 10X dung dịch trong 1% DMSO – 6 lỗ/điều kiện). Để tránh sự dính bám của các hợp chất lên trên đầu nút, các đầu nút được thay đổi giữa hai lần pha loãng liên tiếp. Sau đó, tế bào được đặt vào thiết bị ủ 37°C, 5% CO₂. Vào ngày 4, khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng cách dùng liều ATP được giải phóng bởi tế bào có thể sống được. Số lượng tế bào có thể sống được được phân tích so với số lượng tế bào được xử lý dung môi. Các trị số EC₅₀ được xác định bằng phân tích fit đường cong (mô hình hồi quy không tuyến tính với đáp ứng liều sigma, hệ số đòi dốc biến đổi), được thực hiện với thuật toán được cung cấp bởi phần mềm GraphPad (GraphPad Software Inc., CA, USA).

Kết quả:**Các dược chất khác nhau:**

Các dược chất khác nhau được thử nghiệm để xác định hoạt tính chống tăng sinh tế bào của chúng đối với dòng tế bào MDA-MB-231 theo phương pháp được mô tả trên đây. Các hoạt tính được đo biểu thị các trị số $EC_{50} < 0,1 \mu M$.

Vài ví dụ sau được chọn trong số các dược chất được nêu trên đây minh họa các đặc tính chống tăng sinh tế bào hoàn toàn rõ rệt của chúng:

Ví dụ 12: $EC_{50} = 5,80 \times 10^{-10} M$; Ví dụ 13: $EC_{50} = 7,95 \times 10^{-8} M$; Ví dụ 15: $EC_{50} = 1,70 \times 10^{-10} M$; Ví dụ 27: $EC_{50} = 1,20 \times 10^{-10} M$.

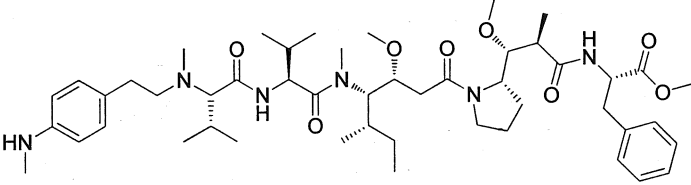
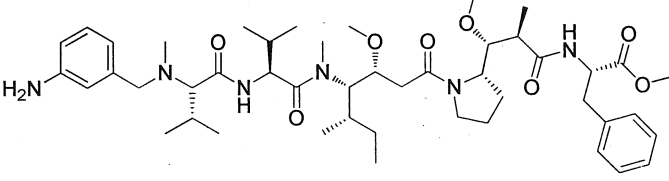
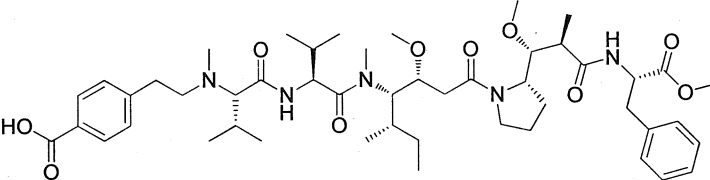
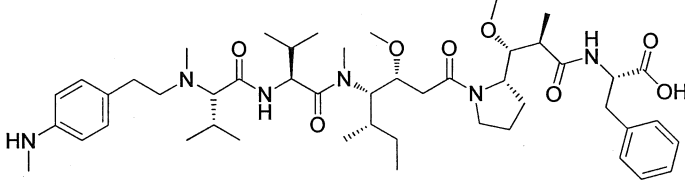
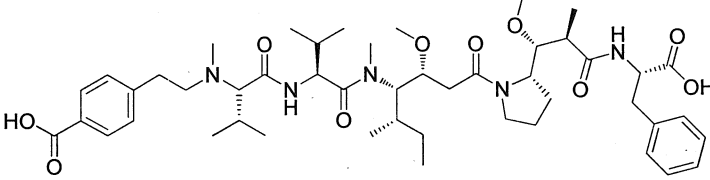
Các dòng tế bào khác nhau:

Hợp chất 15 được thử nghiệm đối với các dòng tế bào khác nhau (A549, MDA-MB-231, MCF-7, SN12C) theo phương pháp được mô tả trên đây. Các hoạt tính được đo biểu thị các trị số $EC_{50} < 0,1 \mu M$ đối với tất cả các dòng tế bào được thử nghiệm.

$EC_{50} (M)$	A549	MDA-MB-231	MCF-7	SN12C
Hợp chất 15	$1,45 \times 10^{-10}$	$1,70 \times 10^{-10}$	$7,15 \times 10^{-10}$	$2,18 \times 10^{-10}$

Ví dụ so sánh:

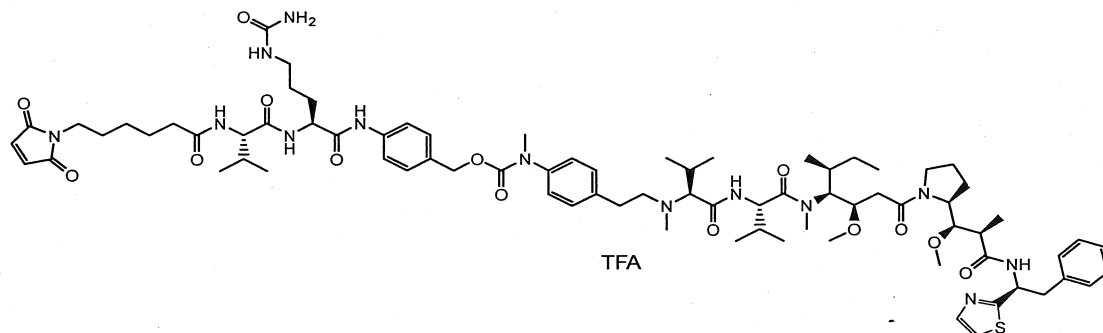
Sự thay thế đối với vòng phenyl (amino so với carboxyl) được nghiên cứu trong các ví dụ so sánh dưới đây thể hiện hoạt tính chống tăng sinh tế bào được cải thiện của các dược chất theo sáng chế bao gồm sự thay thế amino.

Số	Cấu trúc	EC ₅₀ (M)	
		A549	MDA-MB-231
12		1,48x10 ⁻¹⁰	5,80x10 ⁻¹⁰
15		1,45x10 ⁻¹⁰	1,70x10 ⁻¹⁰
Ví dụ so sánh 1		3,76x10 ⁻⁹	2,29x10 ⁻⁹
13		2,71x10 ⁻⁸	7,95x10 ⁻⁸
Ví dụ so sánh 2		4,03x10 ⁻⁷	9,75x10 ⁻⁷

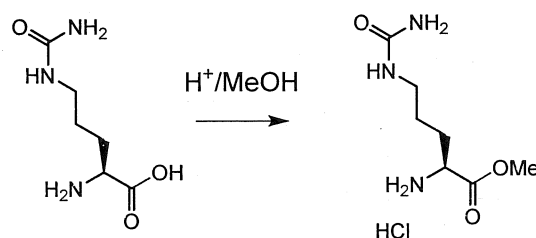
Ví dụ 16: Tổng hợp gốc dược chất-phần tử liên kết

Hợp chất E-11

4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl (4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-*sec*-butyl)-7,10-diisopropyl-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)ethyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl)-5,11-dimethyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-yl)phenyl)(methyl)carbamate 2,2,2-trifloaxetat

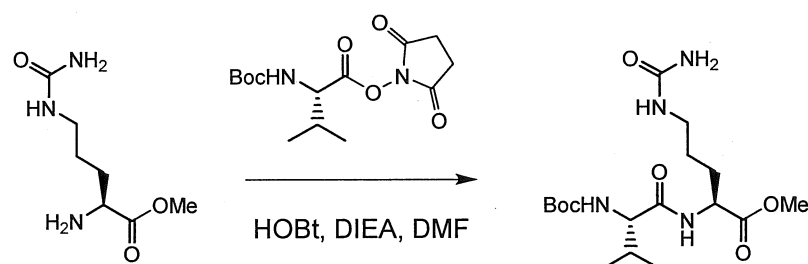


Hợp chất E-11-1: metyl (*S*)-2-amino-5-ureidopentanoat hydroclorua



Thêm nhỏ giọt axetyl clorua (10mL) vào MeOH (120mL) ở 0°C kèm khuấy. Sau 20 phút, thêm L-Citrulline (10g, 57mmol, 1,00 đương lượng) vào và hỗn hợp được gia nhiệt ở hồi lưu qua đêm. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm để thu được 15g (116%) hợp chất **E-11-1** là chất rắn màu trắng. Sản phẩm được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần phải làm khô thêm.

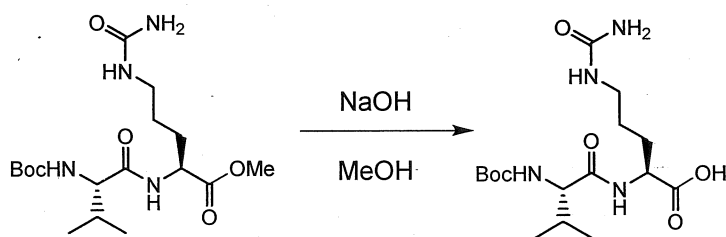
Hợp chất E-11-2: metyl (*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanoat



Hoà tan hợp chất **E-11-1** (13g, 57,6mmol, 1,1 đương lượng) trong DMF (140mL) ở 0°C trong khí trơ. Thêm DIEA (30mL, 173mmol, 3,0 đương lượng), hydroxybenzotriazol (HOBt – 10,59g, 69,1mmol, 1,2 đương lượng) và Boc-L-valin hydroxysuxinimit este (Boc-Val-OSu – 18,1g, 57,6mmol, 1,0 đương lượng) vào. Khuấy trộn hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ môi trường, sau đó làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm. Hoà tan phần còn lại trong nước (100mL) và chiết hai lần

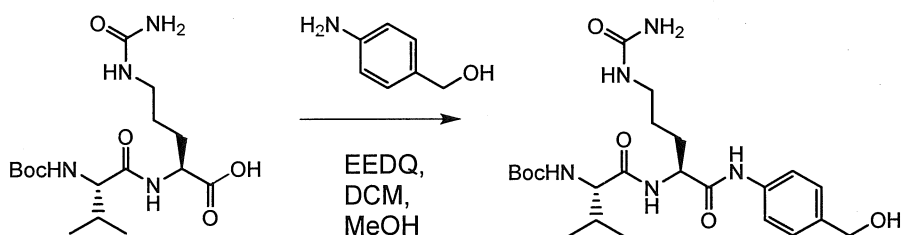
bằng DCM (150mL). Gom các pha hữu cơ, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại trên silicagel (DCM/MeOH) để thu được 18,8g (84%) hợp chất **E-11-2** là chất rắn màu trắng.

Hợp chất E-11-3: Axit (*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanoic



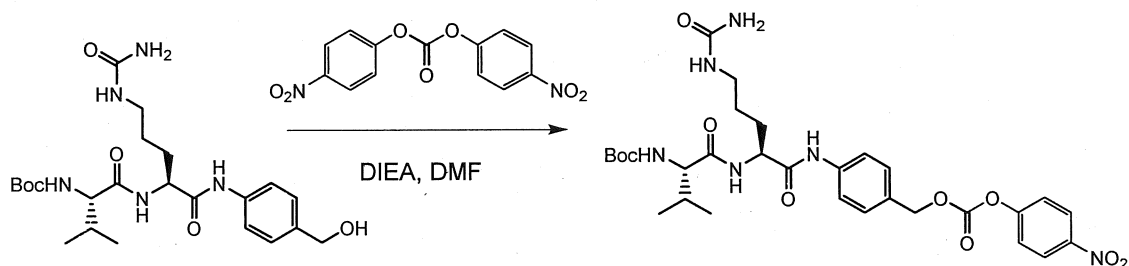
Hoà tan hợp chất **E-11-2** (18,8g, 48,4mmol, 1 đương lượng) trong MeOH (200mL) ở 0°C . Thêm dung dịch chứa NaOH 1M (72mL, 72mmol, 1,5 đương lượng) vào và hỗn hợp được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ MeOH dưới áp suất giảm và dung dịch nước còn lại được axit hoá bằng HCl 1M. Làm bay hơi pha trong nước đến khô và phần còn lại được làm sạch trên silicagel (DCM/MeOH) để thu được 18g (99%) hợp chất **E-11-3** là chất rắn màu trắng.

Hợp chất E-11-4: *tert*-butyl ((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-(hydroxymetyl)phenyl) amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate



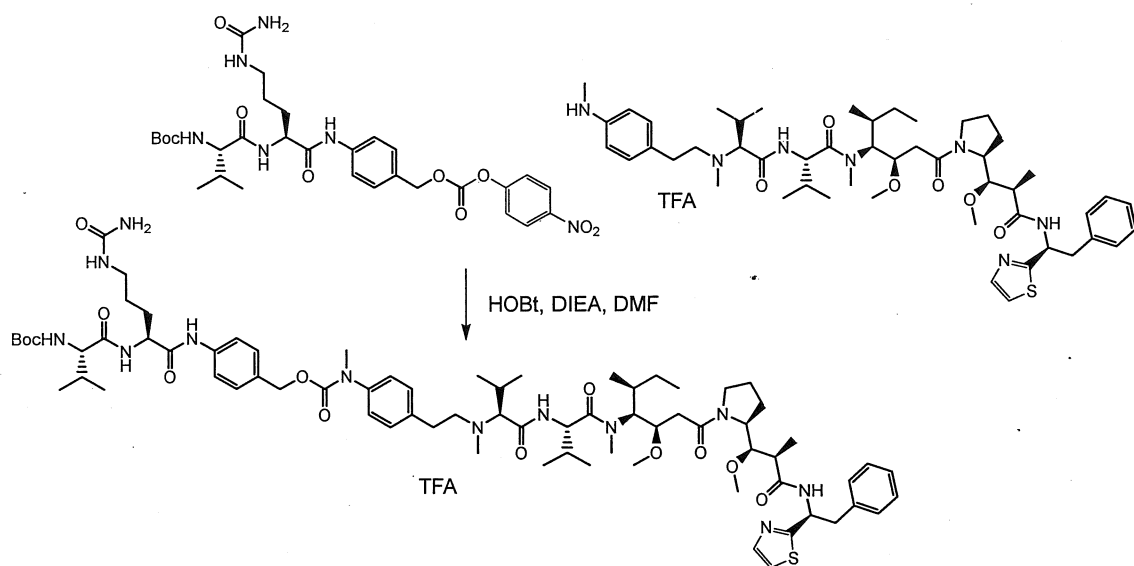
Hoà tan hợp chất **E-11-3** (5g, 13,4mmol, 1 đương lượng) trong hỗn hợp gồm DCM khô (65ml) và MeOH khô (35ml). Thêm (4-aminophenyl)metanol (1,81g, 14,7mmol, 1,1 đương lượng) và *N*-Etoxycarbonyl-2-etoxyl-1,2-dihydroquinolin (EEDQ – 6,60g, 26,7mmol, 2 đương lượng) vào và hỗn hợp được khuấy trong bóng tối qua đêm. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm, và phần còn lại được làm sạch trên silicagel (DCM/MeOH) để thu được 5,2g (73%) hợp chất **E-11-4** là chất rắn màu trắng nhạt.

Hợp chất E-11-5: *tert*-butyl ((*S*)-3-metyl-1-(((*S*)-1-((4-(((4-nitrophenoxy)carbonyl)oxy)metyl)phenyl)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino)-1-oxobutan-2-yl)carbamate



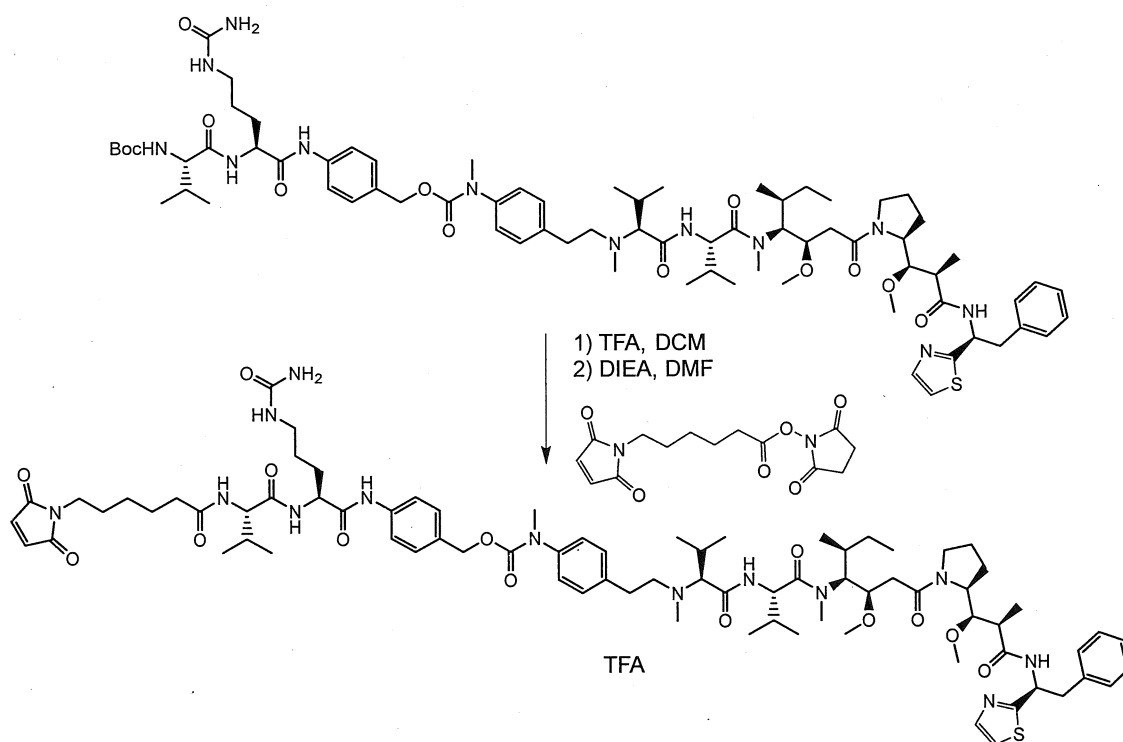
Hoà tan hợp chất **E-11-4** (1,1g, 2,29mmol, 1 đương lượng) trong DMF khô (5ml) ở nhiệt độ môi trường trong khí trơ. Thêm bis(4-nitrophenyl) cacbonat (1,40g, 4,59mmol, 2 đương lượng) vào, tiếp theo DIEA (600μl, 3,44mmol, 1,5 đương lượng), và dung dịch màu vàng thu được được khuấy qua đêm. Làm bay hơi DMF dưới áp suất giảm và phần còn lại được làm sạch trên silicagel (DCM/MeOH) để thu được 1,27g (84%) hợp chất **E-11-5** là chất rắn màu trắng nhạt.

Hợp chất E-11-6: 4-(((*S*)-2-(((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl 4-(((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-(((*S*)-*sec*-butyl)-7,10-diisopropyl-3-(2-(((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoetyl)-5,11-dimetyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-yl)phenyl)(metyl)carbamate 2,2,2-trifloaxetat



Hoà tan cacbonat **E-11-5** (114mg, 0,177mmol, 1,2 đương lượng) và anilin **11F** (150mg, 0,147mmol, 1 đương lượng) trong DMF khô (4mL). Thêm HOBt (38mg, 0,295mmol, 2 đương lượng) và DIEA (54 μ L, 0,295mmol, 2 đương lượng) vào và hỗn hợp được khuấy trong một tuần ở nhiệt độ trong phòng. Làm bay hơi DMF dưới áp suất giảm và phần còn lại được làm sạch bằng sắc ký nhanh trên silica, giải hấp bằng DCM. Làm sạch lại sản phẩm bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradien 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **E-11-6** là chất rắn màu trắng (89mg, 39%).

Hợp chất E-11:



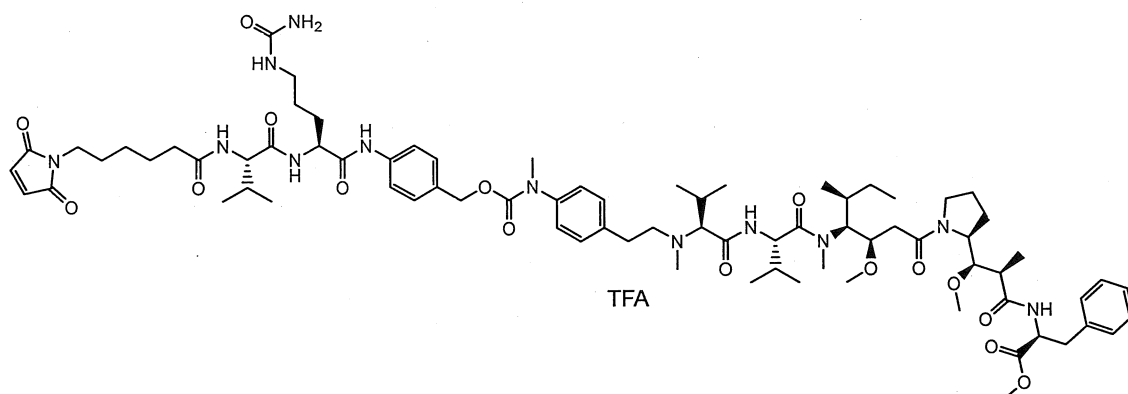
Hoà tan hợp chất **E-11-6** (21mg, 0,014mmol, 1,0 đương lượng) trong DCM (0,25mL) và thêm TFA (40 μ L) vào. Khuấy dung dịch trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó, phân tích LC-MS biểu thị sự tiêu thụ hoàn toàn vật liệu ban đầu. Làm mát nhanh hỗn hợp này (bể nitơ dạng lỏng) trong khi thêm đồng thời DMF (0,5mL) sau đó DIEA (100 μ L) để trung hoà TFA. Sau đó, loại bỏ bể làm mát và thêm 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoat (4mg, 0,012mmol, 1 đương lượng) vào. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 48 giờ

và sản phẩm được làm sạch bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gôm các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **E-11** là chất rắn màu trắng (11mg, 54%).

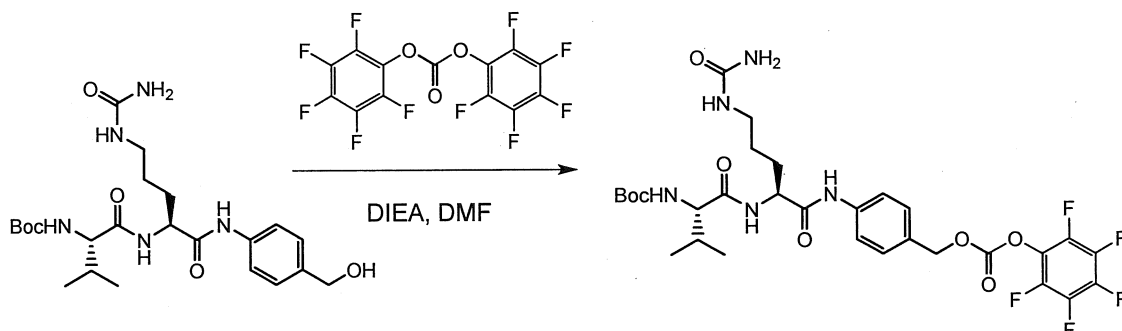
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1524,8282 (2%, MNa^+ , $C_{79}H_{115}N_{13}NaO_{14}S$ đòi hỏi 1524,8299), 751,9283 (100%, $(MH_2)^{2+}$, $C_{79}H_{117}N_{13}O_{14}S$ đòi hỏi 751,9276).

Hợp chất E-12

metyl ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl(metyl)amino)phenetyl(metyl) amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-L-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat

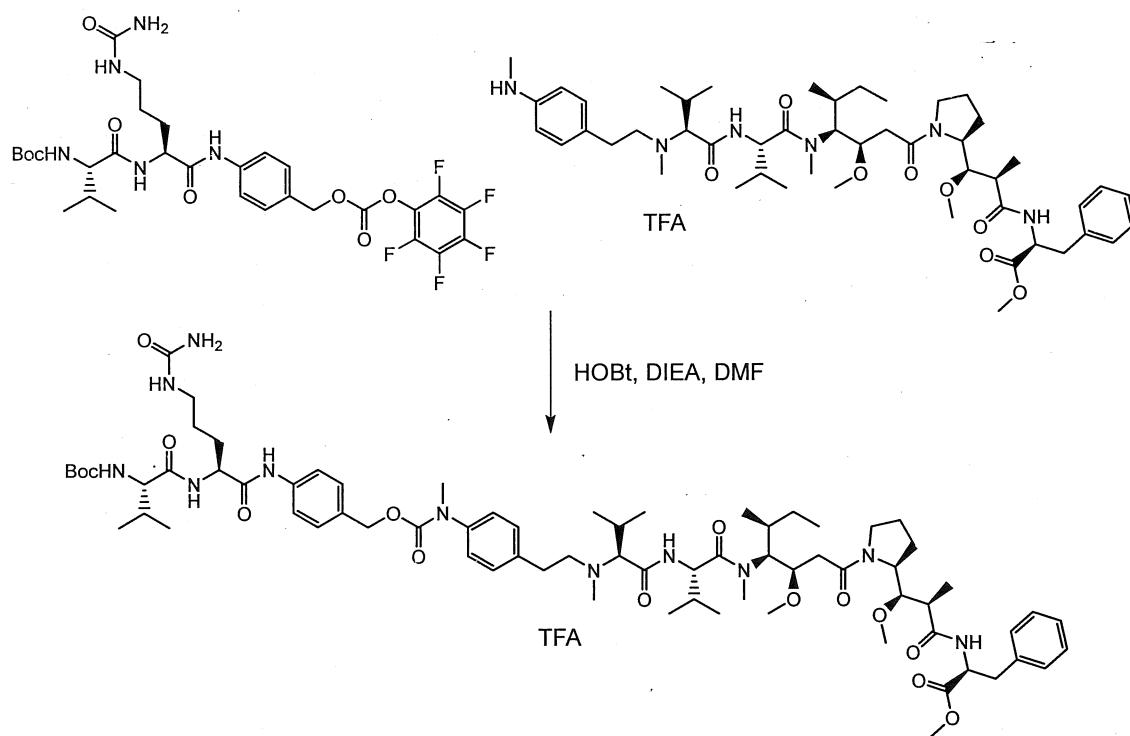


Hợp chất E-12-1: *tert*-butyl ((S)-3-metyl-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-1-((4-(((perflorophenoxy)carbonyl)oxy)metyl)phenyl)amino)-5-ureidopentan-2-yl)amino)butan-2-yl)carbamate



Hoà tan hợp chắtas **E-11-4** (670mg, 1,26mmol, 1 đương lượng) trong DMF khô (6ml) ở 0°C trong khí trơ. Thêm bis(perflophenyl) cacbonat (991mg, 2,51mmol, 2 đương lượng) vào, tiếp theo DIEA (329µl, 1,89mmol, 1,5 đương lượng) và dung dịch không màu thu được được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Làm bay hơi DMF dưới áp suất giảm, và phần còn lại được làm sạch trên silica gel (DCM/MeOH) để thu được 836mg (96%) hợp chất **E-12-1** là chất rắn màu trắng nhạt.

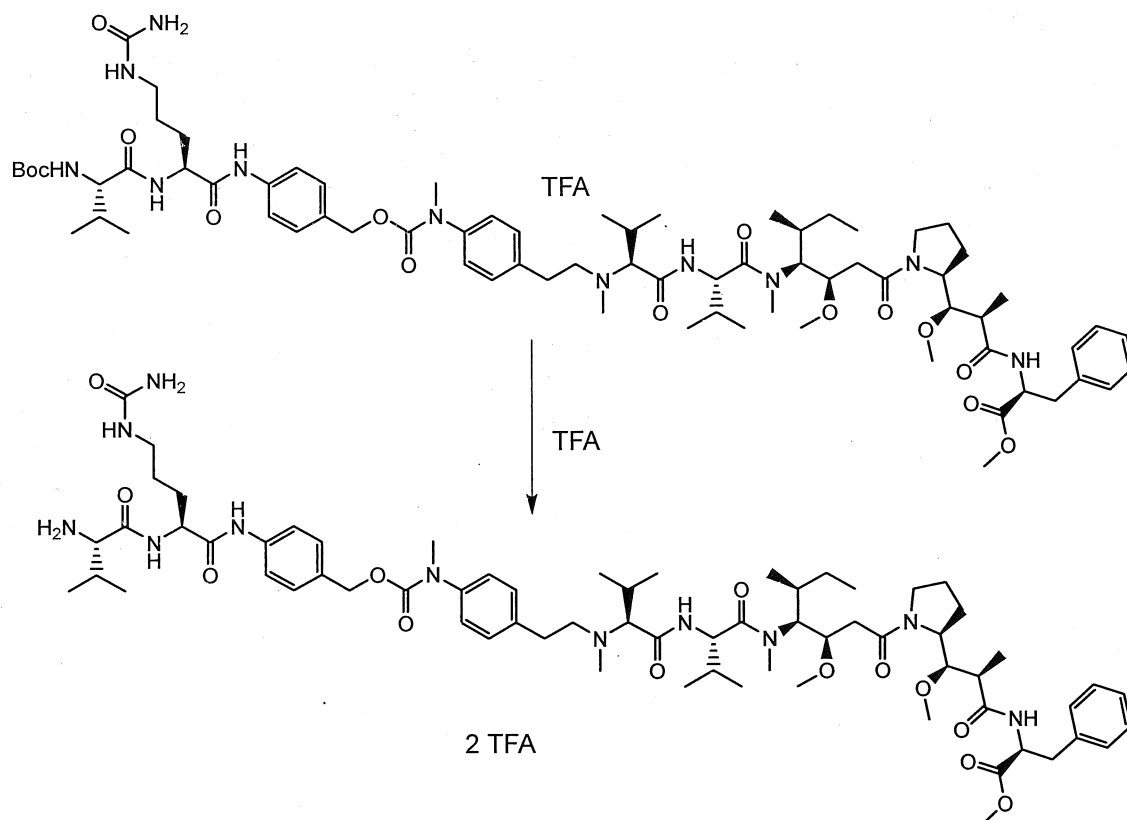
Hợp chất E-12-2: methyl ((2*R*,3*R*)-3-(((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-(((*S*)-2-(((*S*)-2-((4-(((4-(((*S*)-2-(((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)(metyl)amino)phenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat



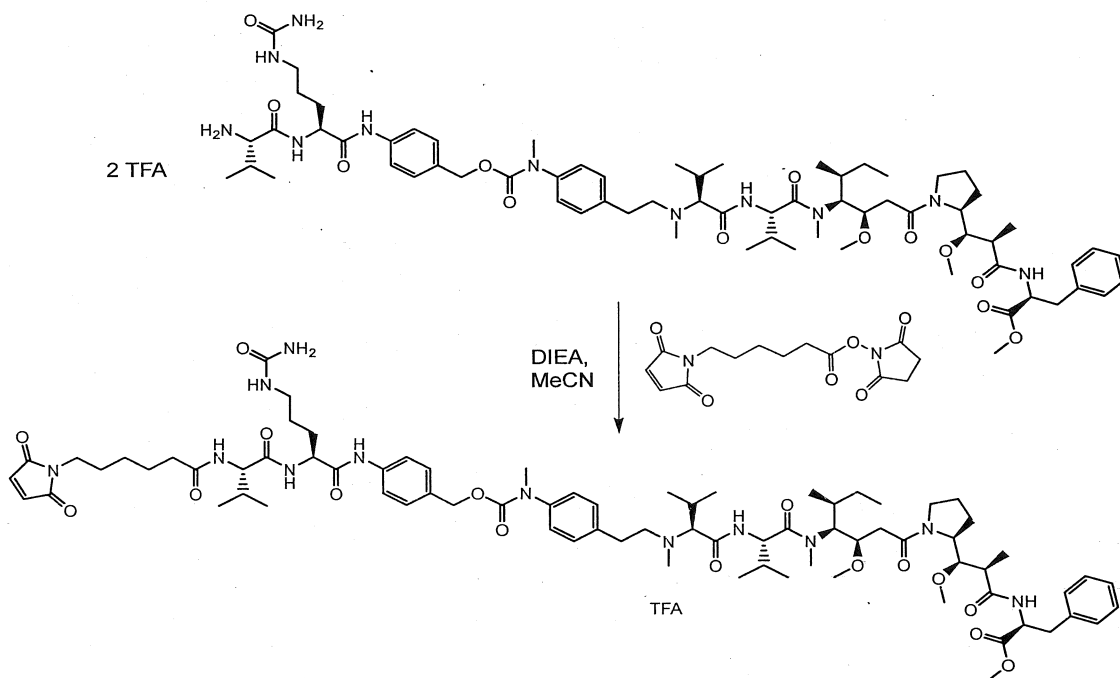
Hoà tan anilin **12** (165mg, 0,189mmol, 1,0 đương lượng) trong DMF (5mL) ở 0°C trong khí trơ. Thêm cacbonat **E-12-1** (194mg, 0,282mmol, 1,5 đương lượng), HOBt (51mg, 0,375mmol, 2 đương lượng) và DIEA (66µL, 0,375mmol, 2 đương lượng) vào và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 8 giờ. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và phần còn lại được làm sạch bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5µm, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đệm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò

tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **E12-7** là chất rắn màu trắng (247mg, 77%).

Hợp chất E-12-3: methyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)(methylamino)phenetyl)(methylamino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat bis(2,2,2-trifloaxetat)



Hoà tan hợp chất **E-12-2** (5,6mg, 4,04μmol, 1,0 đương lượng) trong TFA (100μL). Sau 5 phút, thêm 2ml nước vào và làm khô lạnh hỗn hợp qua đêm để thu được hợp chất **E-12-3** là chất rắn màu trắng nhạt (5,6mg, 98%).

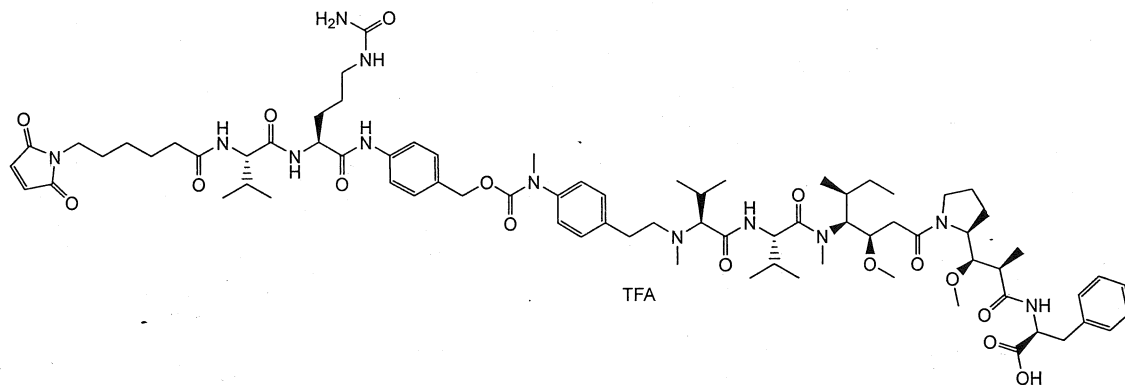
Hợp chất E-12:

Hoà tan hợp chất E-12-3 (5,6mg, 4 μ mol, 1,0 đương lượng) trong axetonitril (0,5mL), và thêm DIEA (5 μ L, 7 đương lượng) vào, tiếp theo 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoat (2,5mg, 8 μ mol, 2 đương lượng). Khuấy hỗn hợp này trong 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi kiểm soát phản ứng bằng LC-MS, thêm 200 μ L nước vào và dung dịch thu được được làm sạch bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất E-12 là chất rắn màu trắng (4,6mg, 70%).

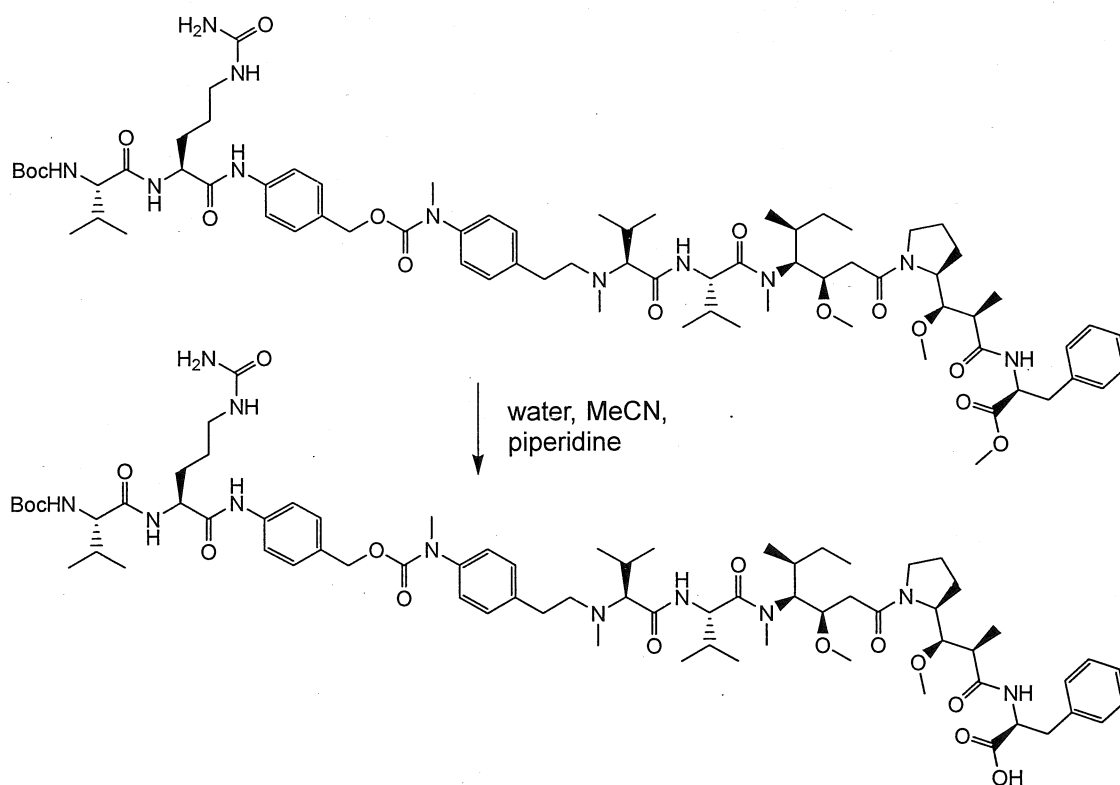
m/z (Q-TOF MS ESI⁺) 739,4389 (100%, (MH₂)²⁺, C₇₈H₁₁₈N₁₂O₁₆ đòi hỏi 739,4389).

Hợp chất E-13

((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)(metyl)amino)phenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalanin 2,2,2-trifloaxetat



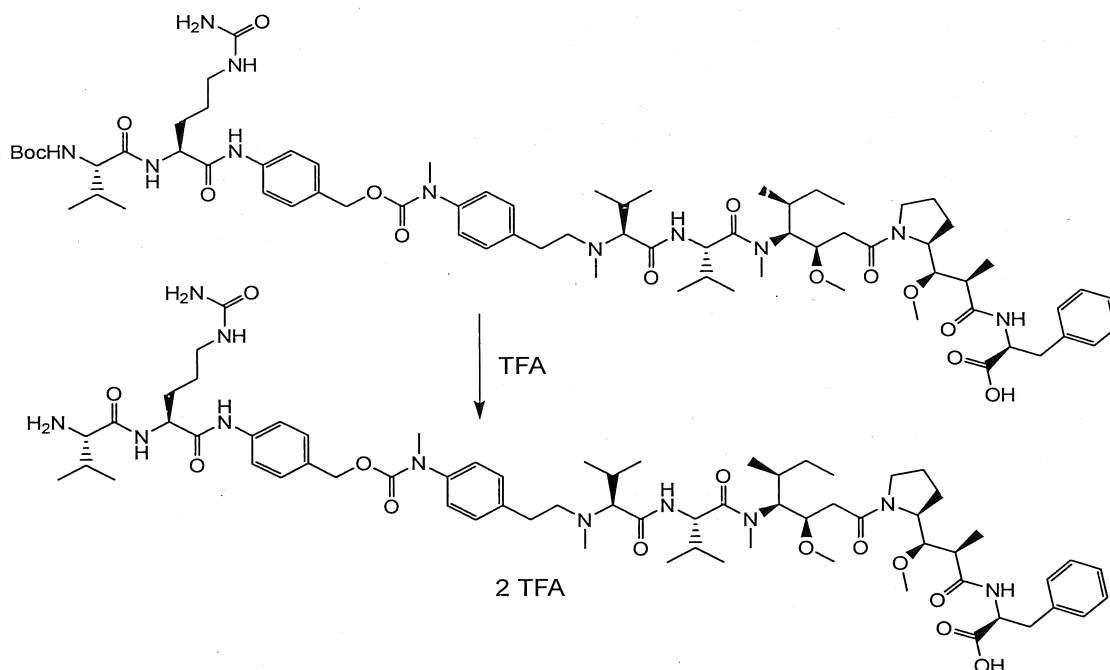
Hợp chất E-13-1: ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)(methyl)amino)phenetyl)(methyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalanin



Hoà tan hợp chất E-12-2 (185mg, 0,123mmol, 1,0 đương lượng) trong hỗn hợp gồm nước (5mL) và axetonitril (5mL) ở nhiệt độ trong phòng. Thêm piperidin (3,67mL, 300 đương lượng) vào và hỗn hợp được khuấy trong 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Làm bay hơi dung môi đến khô dưới áp suất giảm, và phần còn lại được nghiền

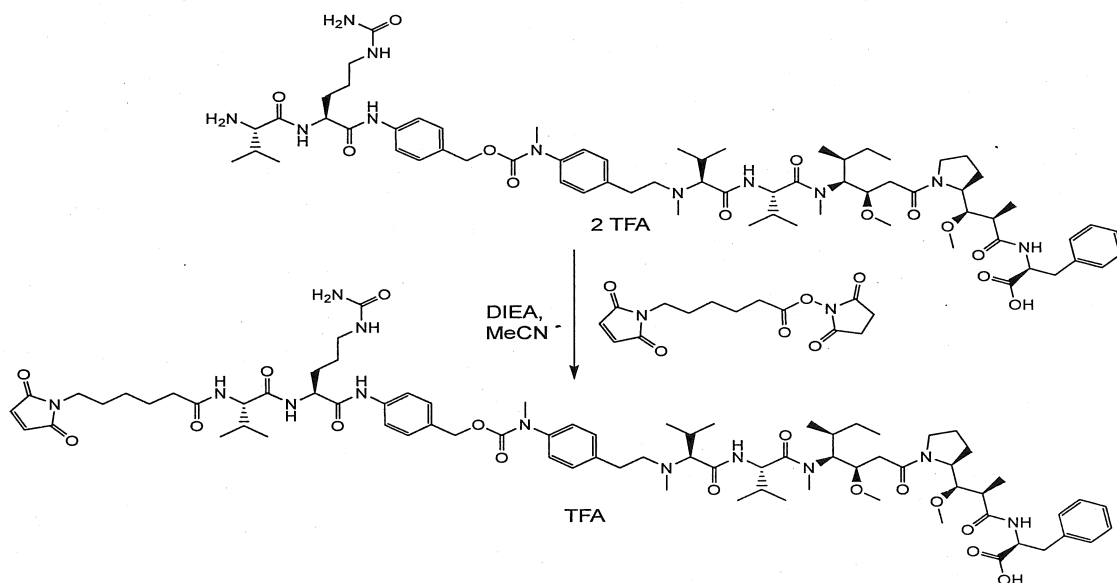
bằng Et₂O (60mL). Rửa nhẹ chất rắn bằng Et₂O (20ml) hai lần và làm khô trong chân không để thu được hợp chất **E-13-1** là chất rắn màu trắng nhạt (175mg, 95%).

Hợp chất E-13-2: ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)(metyl)amino)phenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalanin bis (2,2,2-trifloaxetat)



Hoà tan hợp chất **E-13-1** (175mg, 0,128mmol, 1,0 đương lượng) trong TFA (200μL). Sau 5 phút, thêm nước (1mL) và axetonitril (1mL) vào và dung dịch được làm khô lạnh qua đêm để thu được hợp chất **E-13-2** là chất rắn màu trắng nhạt (180mg, 87%).

Hợp chất E-13: ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)(metyl)amino)phenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl) pyrrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalanin, 2,2,2-trifloaxetat



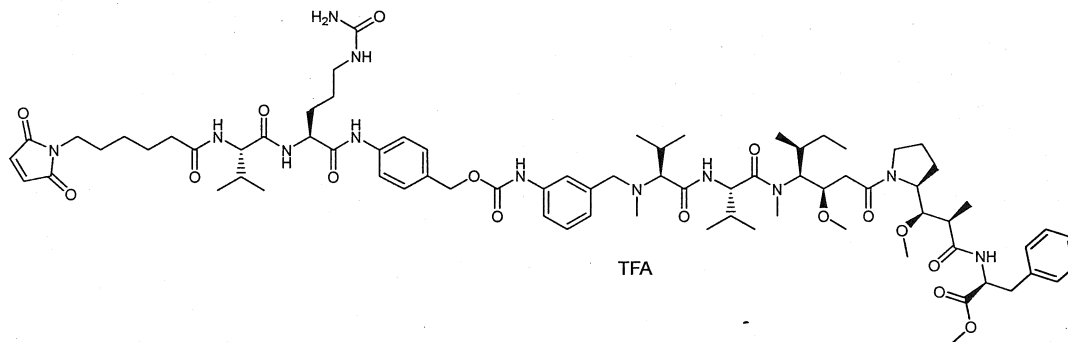
Hoà tan hợp chất **E-13-2** (80mg, 0,058mmol, 1,0 đương lượng) trong hỗn hợp gồm axetonitril (1,5mL) và DMF (0,4mL). Thêm DIEA (50 μ L, 0,289mmol, 5 đương lượng) vào, tiếp theo 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoat (36mg, 0,116 mmol, 2 đương lượng). Khuấy hỗn hợp này trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi kiểm soát phản ứng bằng LC-MS, làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và phần còn lại được làm sạch bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **E-13** là chất rắn màu trắng (32mg, 35%).

m/z (Q-TOF MS ESI-) 1461,8336 (100%, (M-H)⁻, C₇₇H₁₁₃N₁₂O₁₆ đòi hỏi 1461,8403).

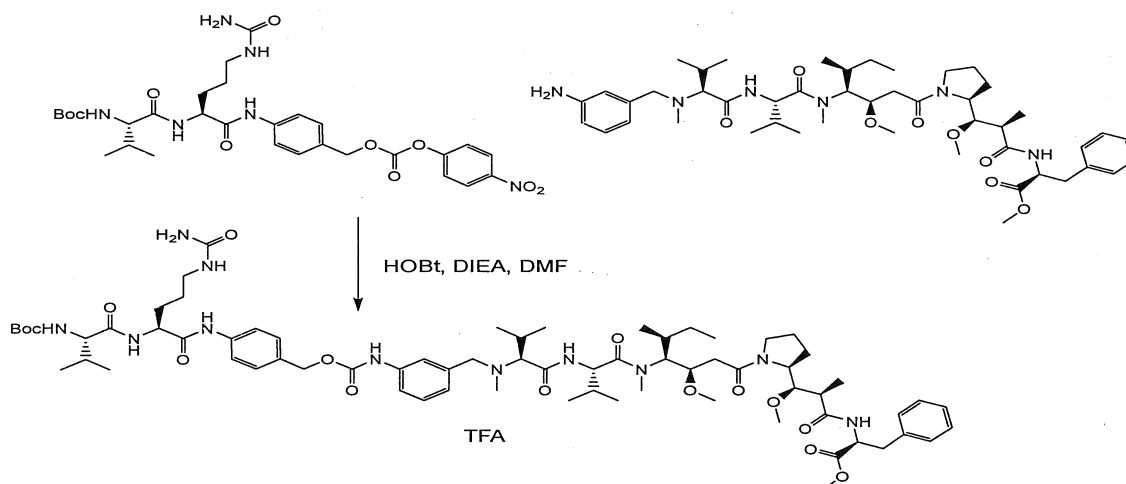
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1463,8565 (2%, MH⁺, C₇₇H₁₁₅N₁₂O₁₆ đòi hỏi 1463,8549), 732,4317 (100%, (MH₂)²⁺, C₇₇H₁₁₆N₁₂O₁₆ đòi hỏi 732,4311).

Hợp chất E-15

metyl ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)amino)benzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-L-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat

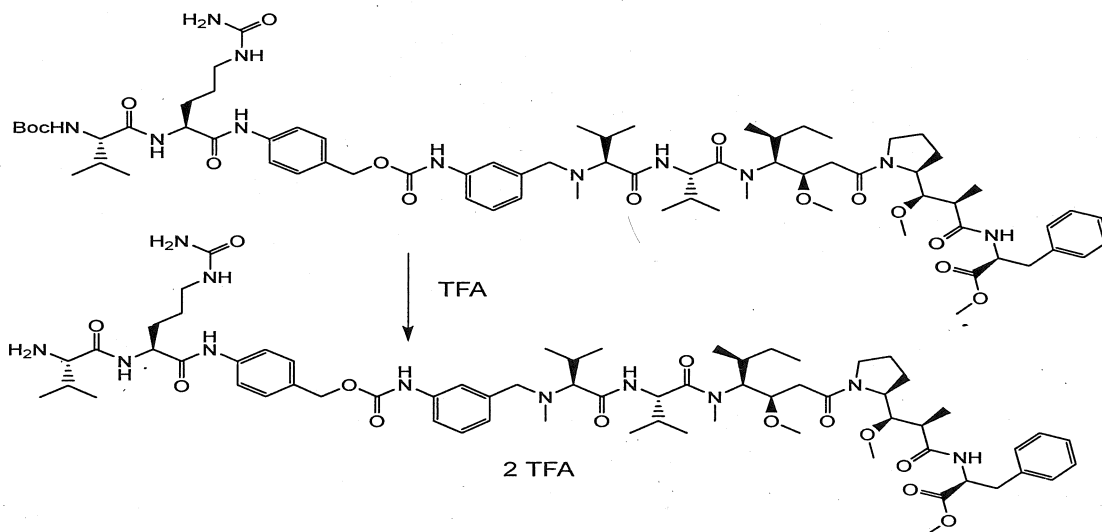


Hợp chất E-15-1: metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((3-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)amino)benzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat



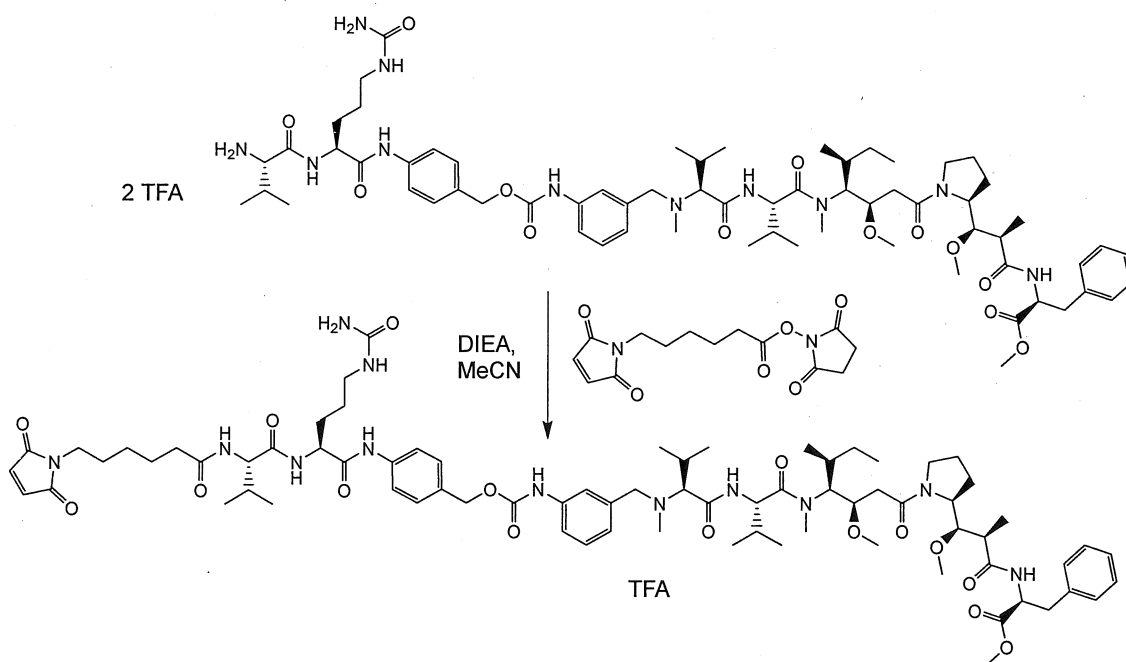
Hợp chất E-15-1 được tạo ra theo cùng phương pháp như đối với hợp chất E-11-6, sử dụng cacbonat E-11-5 (28mg, 0,044mmol, 1 đương lượng), anilin 15 (42mg, 0,044mmol, 1 đương lượng), HOBT (3mg, 0,022mmol, 0,5 đương lượng), và DIEA (15μL, 0,087mmol, 2 đương lượng) trong DMF (2mL). Hợp chất E-15-1 được phân tách là chất rắn màu trắng (8,2mg, 13%).

Hợp chất E-15-2: metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((3-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oxy)carbonyl)amino)benzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat bis(2,2,2-trifloaxetat)



Hoà tan hợp chất **E-15-1** (8,2mg, 5,58 μ mol, 1,0 đương lượng) trong TFA (200 μ L). Sau 5 phút, thêm nước (1mL) vào và dung dịch được làm khô lạnh qua đêm để thu được hợp chất **E-15-8** là chất rắn màu trắng (7,6mg, 99%).

Hợp chất E-15:

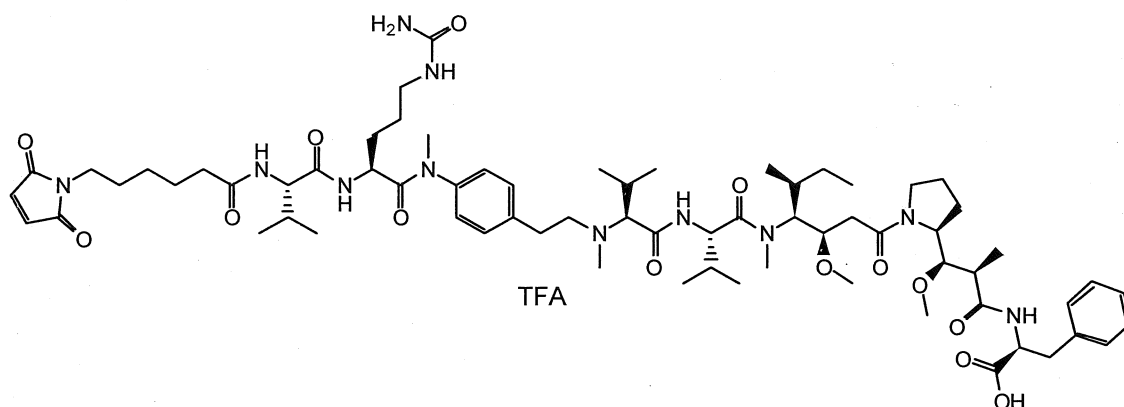


Hợp chất **E-15** được tạo ra theo cùng phương pháp như đối với hợp chất **E-12**, sử dụng amin **E-15-2** (7,6mg, 5,55 μ mol, 1 đương lượng), 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoat (2mg, 6,65 μ mol, 1,2 đương lượng) và DIEA (5 μ L, 0,028mmol, 5 đương lượng) trong axetonitril (0,5mL). Hợp chất **E-15** được phân tách là chất rắn màu trắng (4,2mg, 48%).

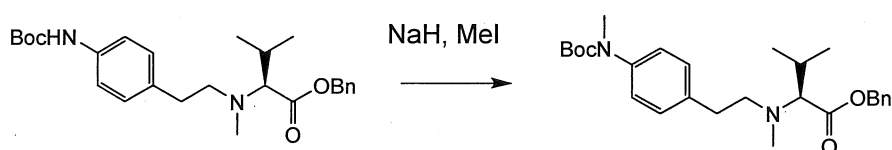
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1471,8169 (2%, MNa^+ , $C_{76}H_{112}N_{12}NaO_{16}$ đòi hỏi 1471,8211), 725,4223 (100%, $(MH_2)^{2+}$, $C_{76}H_{114}N_{12}O_{16}$ đòi hỏi 725,4232), 483,9482 (10%, $(MH_3)^{3+}$, $C_{76}H_{115}N_{12}O_{16}$ đòi hỏi 483,9513).

Hợp chất F-13

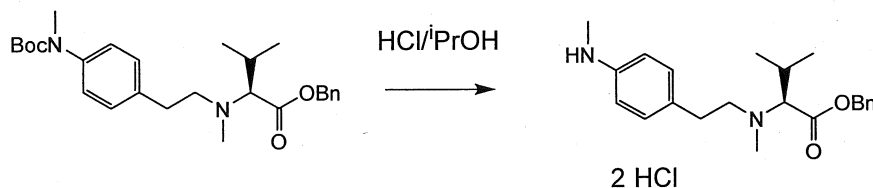
((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-metylbutanamido)-*N*-metyl-5-ureidopentanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalanin 2,2,2-trifloaxetat



Hợp chất F-13-1: benzyl *N*-(4-((tert-butoxycarbonyl)(metyl)amino) phenetyl)-*N*-metyl-*L*-valinat

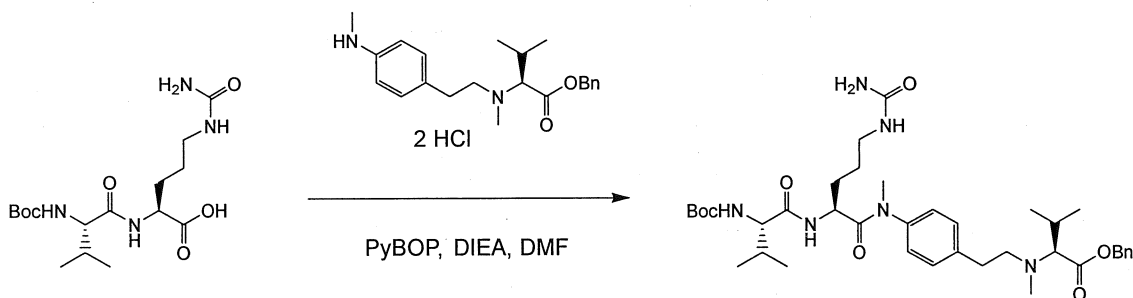


Hoà tan hợp chất **11C** (250mg, 0,567mmol, 1 đương lượng) trong THF (10ml) tiếp theo thêm NaH (60% huyền phù trong dầu khoáng, 68mg, 1,702mmol, 3 đương lượng). Khuấy hỗn hợp này trong 5 phút trước khi thêm iodometan (106μL, 1,702mmol, 3 đương lượng). Khuấy phản ứng trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trước khi làm ngừng bằng nước và chia tách giữa EtOAc (100mL) và nước (50mL). Làm khô pha hữu cơ qua $MgSO_4$ và làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất **F-13-1** là dầu màu vàng (250mg, 97%), mà được sử dụng mà không cần phải làm sạch thêm.

Hợp chất F-13-2: benzyl *N*-metyl-*N*-(4-(methylamino)phenetyl)-*L*-valinat

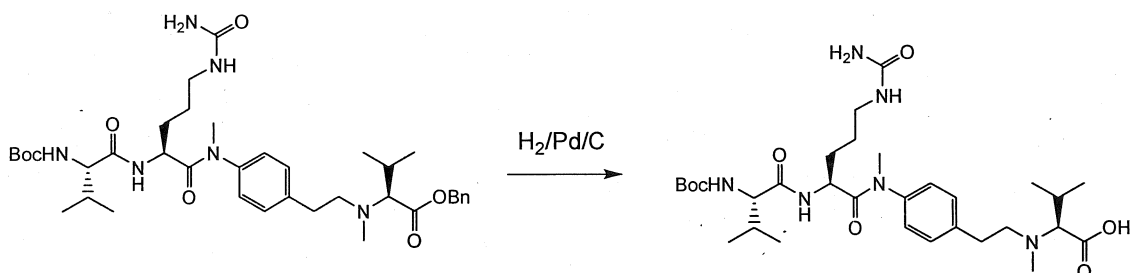
Hoà tan anilin được bảo vệ Boc **F-13-1** (250mg, 0,550mmol, 1 đương lượng) trong MeOH (5mL) tiếp theo thêm 1mL dung dịch chứa HCl trong ⁱPrOH (5 – 6M) có bán trên thị trường. Khuấy dung dịch ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ trước khi làm bay hơi đến khô dưới áp suất giảm. Nghiền dầu màu vàng thu được bằng Et₂O để thu được hợp chất **F-13-2** là chất rắn màu vàng (202mg, 94%).

Hợp chất F-13-3: benzyl *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*-metyl-5-ureidopentanamido)phenetyl)-*N*-metyl-*L*-valinat



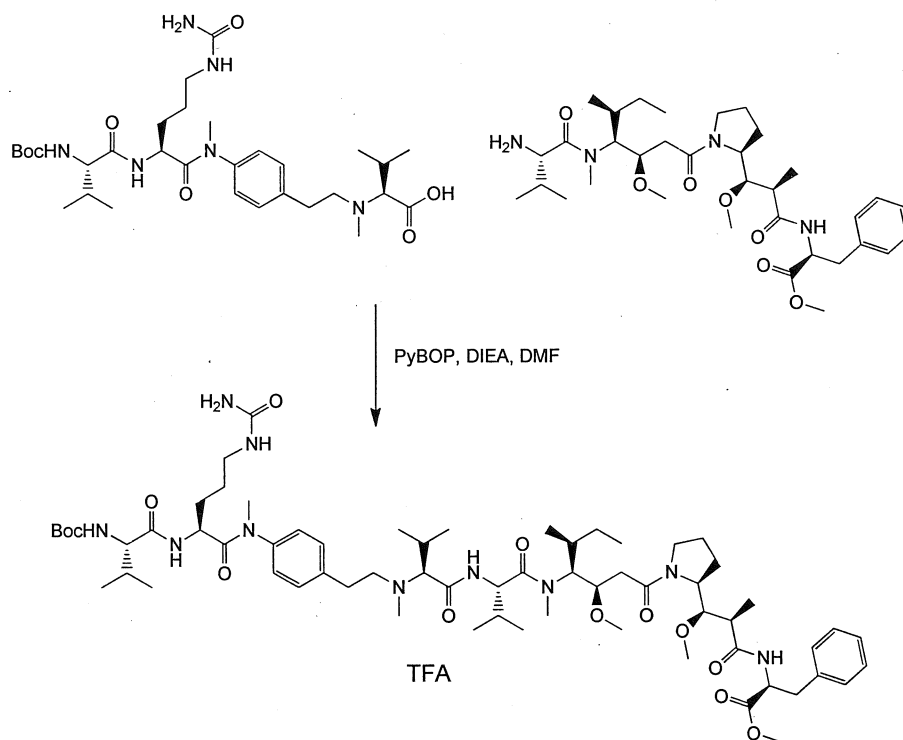
Hoà tan axit **E-11-3** (190mg, 0,508mmol, 1,5 đương lượng) trong DMF khô (1ml), tiếp theo thêm DIEA (118μL, 0,677mmol, 2 đương lượng), benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoni hexaflophosphat (PyBOP - 264mg, 0,508mmol, 1,5 đương lượng) và anilin **F-13-2** (120mg, 0,339mmol, 1 đương lượng) vào. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng qua đêm và dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm. Làm sạch phần còn lại bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5μm, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đệm với 0,1% TFA; Gradien 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **F-13-3** là chất rắn màu trắng (140mg, 45%).

Hợp chất F-13-4: *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*-methyl-5-ureidopentanamido)phenetyl)-*N*-methyl-*L*-valin



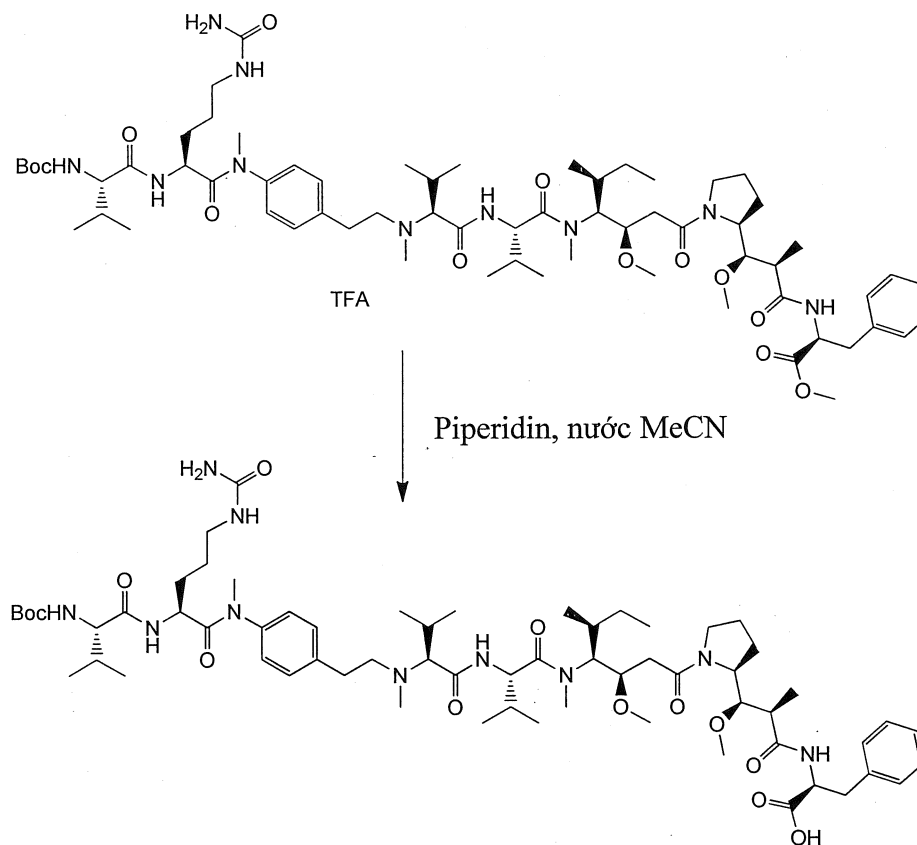
Hoà tan hợp chất **F-13-3** (116mg, 0,163mmol, 1 đương lượng) trong MeOH (5ml) với sự có mặt của Pd/C 10% (30mg) và được hydro hoá trong 2 giờ ở nhiệt độ môi trường và áp suất không khí. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm để thu được 110mg (99%) hợp chất **F-13-4** là chất rắn màu be.

Hợp chất F-13-5: methyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*-methyl-5-ureidopentanamido)phenetyl)(methyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat

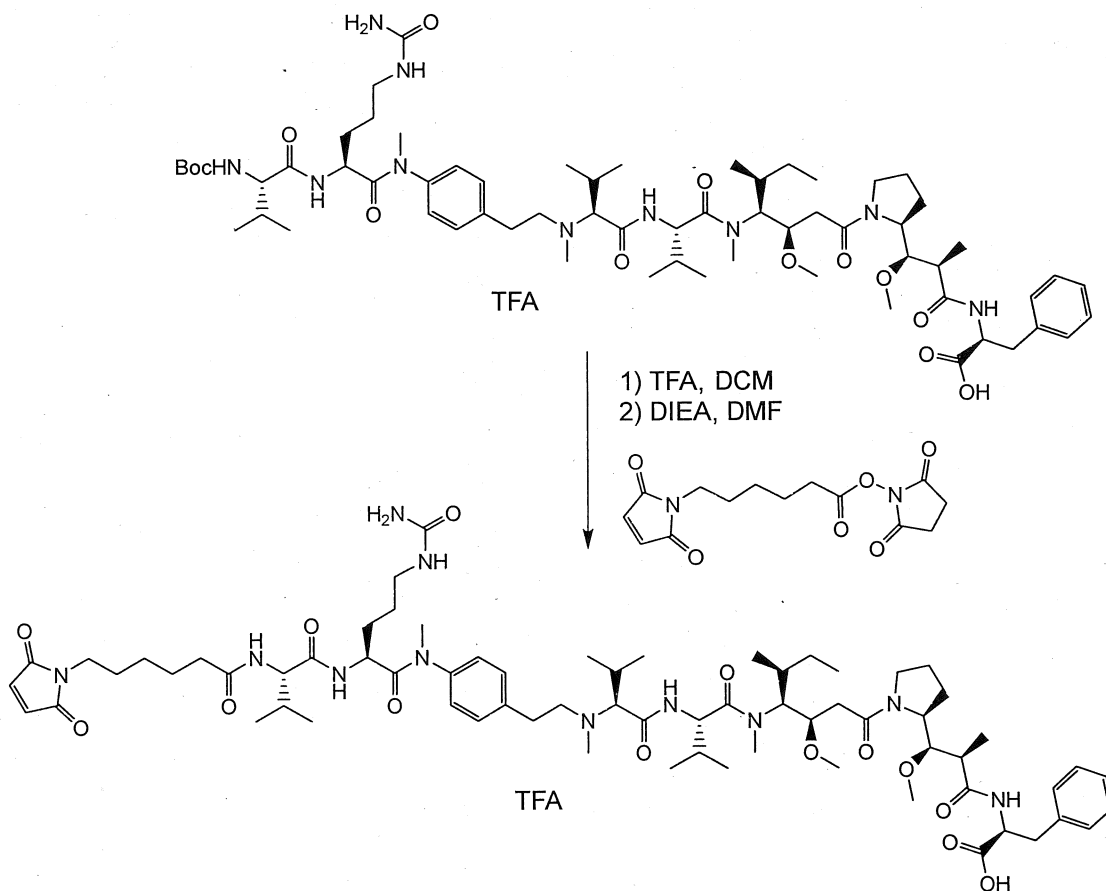


Hoà tan amin **3D** (89mg, 0,140mmol, 1 đương lượng) và axit **F-13-4** (145mg, 0,210mmol, 1,5 đương lượng) trong DMF khô (4mL) và thêm PyBOP (109mg, 0,210mmol, 1,5 đương lượng) và DIEA (73 μ L, 0,420mmol, 3 đương lượng) vào. Khuấy hỗn hợp này trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và dung môi được làm bay hơi. Chia tách phần còn lại giữa EtOAc và nước và làm khô pha hữu cơ qua MgSO₄, lọc và làm bay hơi dưới áp suất giảm. Làm sạch sản phẩm thô HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **F-13-5** là chất rắn màu trắng (140mg, 73%).

Hợp chất F-13-6: ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*-methyl-5-ureidopentanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-metoxo-5-methylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalanin 2,2,2-trifloaxetat



Hoà tan hợp chất **F-13-5** (140mg, 0,104mmol, 1 đương lượng) trong hỗn hợp gồm nước (4mL), axetonitril (4mL) và piperidin (2mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và phần còn lại được làm sạch bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **F-13-6** là chất rắn màu trắng (115mg, 83%).

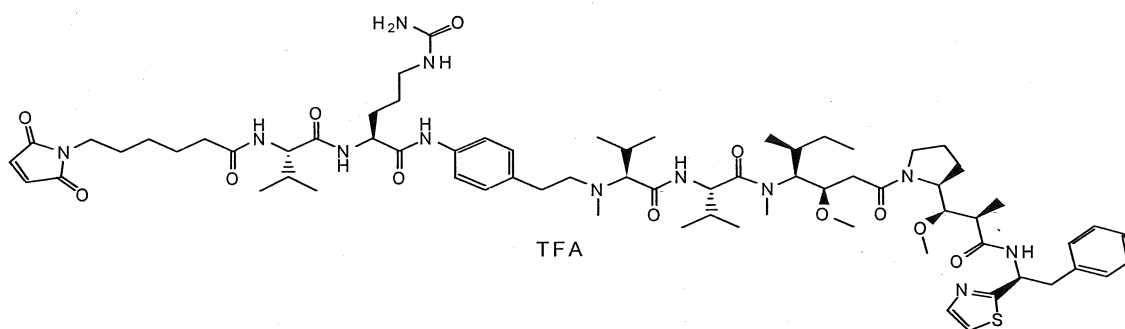
Hợp chất F-13:

Hợp chất **F-13** được tạo ra theo cùng phương pháp như đối với hợp chất **E-11**, sử dụng amin được bảo vệ Boc **F-13-6** (55mg, 0,041mmol, 1,0 đương lượng) trong DCM (0,5mL) và TFA (100μL, 30 đương lượng), tiếp theo pha loãng bằng DMF (1mL), làm ngừng bằng (DIEA (320μL, 45 đương lượng) sau đó phản ứng với 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoat (15mg, 0,049mmol, 1,2 đương lượng). Sau khi làm sạch bằng HPLC điều chế và làm khô lạnh, thu được hợp chất **F-13** là chất rắn màu trắng (14mg, 24%).

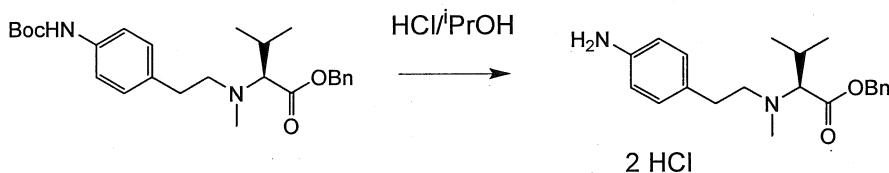
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1314,8067 (2%, MH^+ , $C_{69}H_{108}N_{11}O_{14}$ đòi hỏi 1314,8072), 657,9067 (100%, $(MH_2)^{2+}$, $C_{69}H_{109}N_{11}O_{14}$ đòi hỏi 657,9072).

Hợp chất F-61

N-(((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-*sec*-butyl)-7,10-diisopropyl-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoetyl)-5,11-dimetyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-yl)phenyl)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamit 2,2,2-trifloaxetat

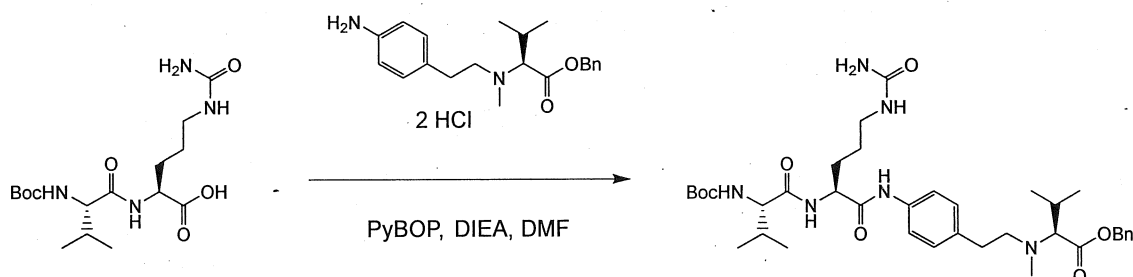


Hợp chất F-61-1: benzyl *N*-(4-aminophenetyl)-*N*-metyl-*L*-valinat dihydroclorua



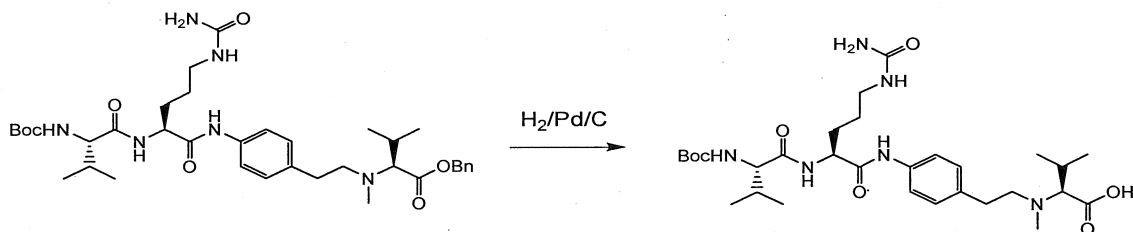
Hoà tan hợp chất **11C** (1,0g, 2,27mmol, 1 đương lượng) trong 8mL dung dịch chứa HCl trong *i*PrOH (5 – 6M) có bán sẵn trên thị trường. Khuấy hỗn hợp này trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trước khi làm bay hơi đến khô dưới áp suất giảm. Nghiền phần còn lại hai lần bằng Et₂O (30mL) và làm khô trong chân không để thu được hợp chất **F-61-1** là chất rắn màu trắng (916mg, 98%).

Hợp chất F-61-2: benzyl *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl)-*N*-metyl-*L*-valinat



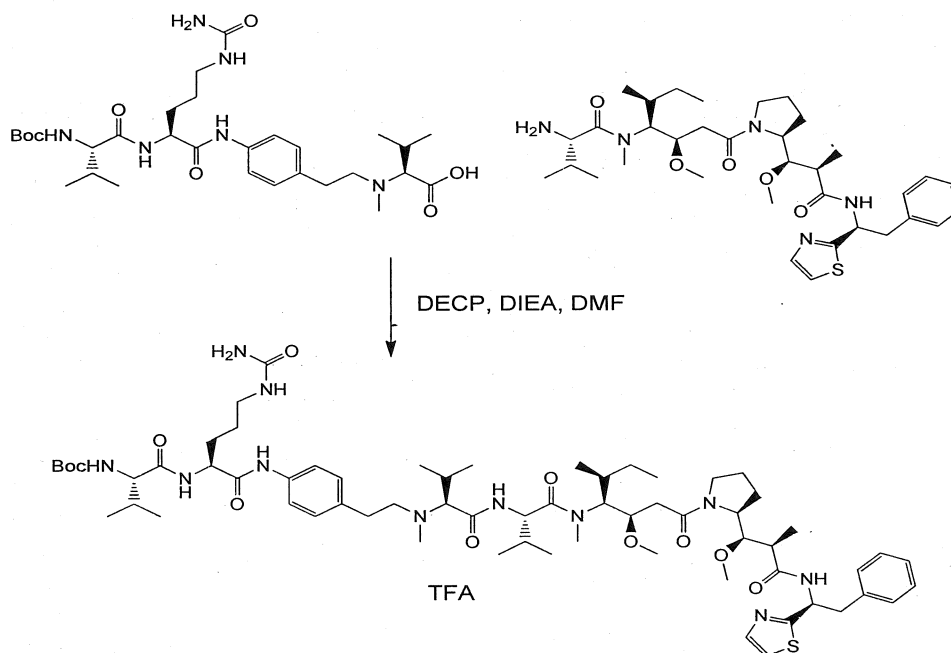
Hoà tan axit **E-11-3** (769mg, 2,05mmol, 1,5 đương lượng) trong DMF khô (2,5ml) tiếp theo thêm DIEA (957μL, 5,48mmol, 4 đương lượng) và PyBOP (1,07g, 2,05mmol, 1,5 đương lượng) vào. Thêm anilin **F-61-1** (566mg, 1,369mmol, 1 đương lượng) vào và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và phần còn lại được làm sạch trên silicagel (DCM/MeOH) để thu được 969mg (102%) hợp chất **F-61-2** là chất rắn màu trắng.

Hợp chất F-61-3: *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl)-*N*-metyl-*L*-valin



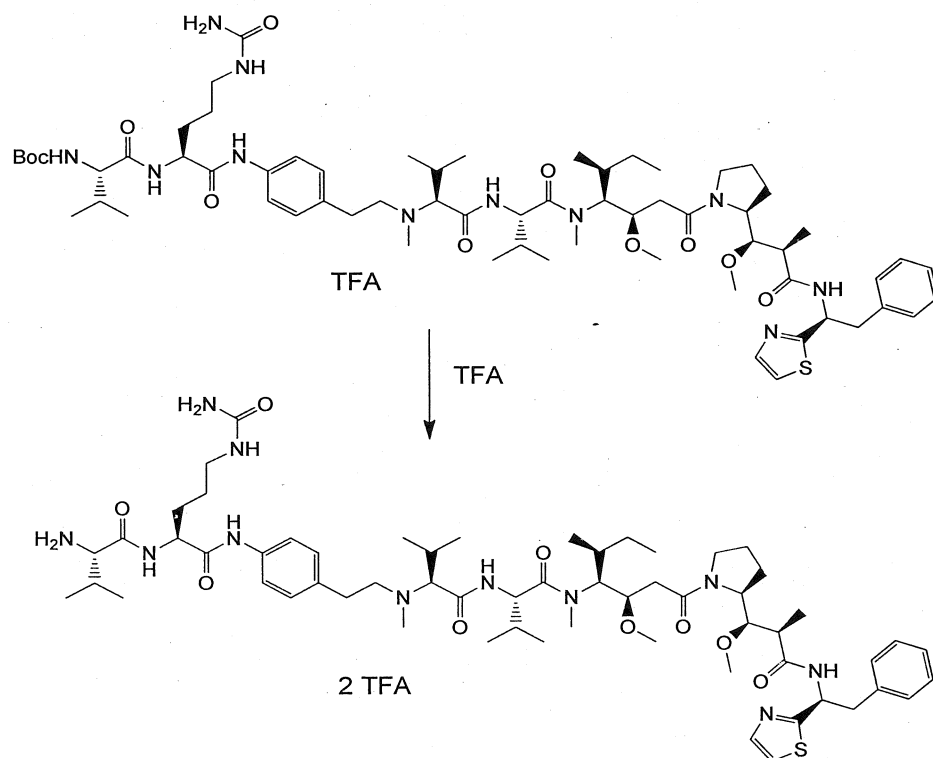
Hoà tan hợp chất **F-61-2** (969mg, 1,28mmol, 1 đương lượng) trong MeOH (20ml) với sự có mặt của Pd/C 10% (270mg) và được hydro hoá trong 3 giờ ở nhiệt độ môi trường và áp suất không khí. Lọc môi trường phản ứng và cô đặc dưới áp suất giảm và phần còn lại được làm sạch trên silicagel (DCM/MeOH/AcOH) để thu được 520mg (67%) hợp chất **F-61-3** là chất rắn màu trắng.

Hợp chất F-61-4: *tert*-butyl ((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-*sec*-butyl)-7,10-diisopropyl-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-2-oxoetyl)-5,11-dimetyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-yl)phenyl)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-yl)amino)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)carbammat 2,2,2-trifloaxetat

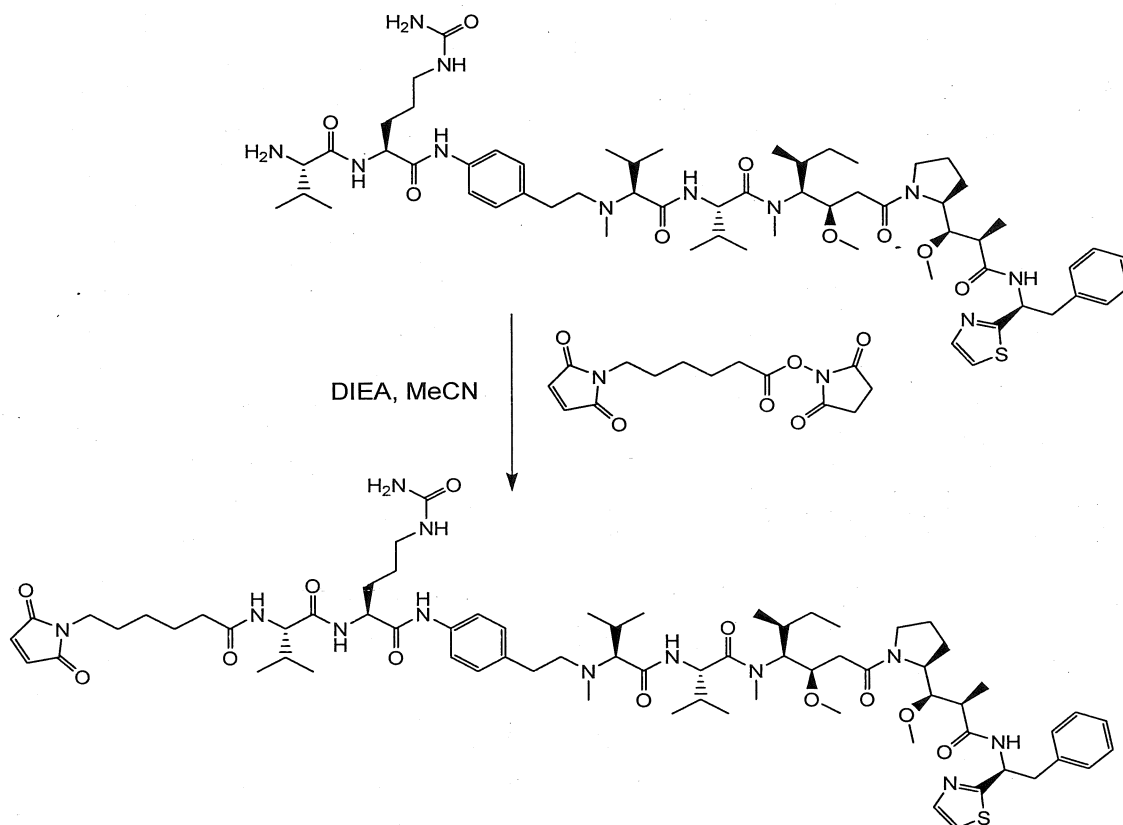


Hoà tan axit **F-61-3** (67,5mg, 0,111mmol, 1,5 đương lượng) trong DMF khô (2mL) và DECP (17μL, 0,111mmol, 1,5 đương lượng) và thêm DIEA (39μL, 0,223mmol, 3 đương lượng) vào. Sau khi khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, thêm amin **1Y** (50mg, 0,074mmol, 1 đương lượng) vào và dung dịch được khuấy qua đêm. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm, và phần còn lại được làm sạch bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5μm, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đệm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **F61-4** là chất rắn màu trắng (28mg, 28%).

Hợp chất F-61-5: (*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metylbutanamido)-*N*-(4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-*sec*-butyl)-7,10-diisopropyl-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoetyl)-5,11-dimetyl-6,9-dioxo-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-yl)phenyl)-5-ureidopentanamit bis(2,2,2-trifloaxetat)



Hoà tan hợp chất **F-61-4** (28mg, 0,021mmol, 1,0 đương lượng) trong TFA (200 μ L). Sau 5 phút, thêm nước (2mL) và axetonitril (0,5mL) vào và dung dịch được làm khô lạnh qua đêm để thu được hợp chất **F-61-5** là dầu không màu (38mg, 134%).

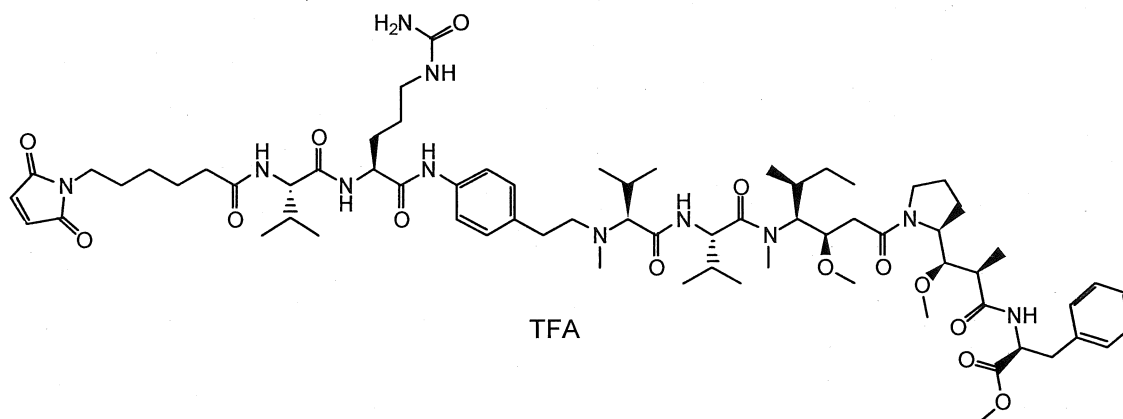
Hợp chất F-61:

Hoà tan hợp chất **F-61-5** (28,3mg, 0,020mmol, 1 đương lượng) trong axetonitril (0,5mL), tiếp theo 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoat (9mg, 0,029 μ mol, 1,4 đương lượng) và DIEA (25 μ L, 0,143mmol, 7 đương lượng). Khuấy hỗn hợp này trong 4,5 giờ, sau thời gian đó, phân tích HPLC biểu thị sự có mặt của vật liệu ban đầu nhưng tiêu thụ hoàn toàn suxinimit. Do đó, thêm tiếp 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoat (3mg, 0,01 μ mol, 0,5 đương lượng) và phản ứng được khuấy trong 1,5 giờ. Phân tích HPLC biểu thị sự tiêu thụ hoàn toàn vật liệu ban đầu. Làm bay hơi dung môi đến khô và phần còn lại được nghiền hai lần bằng hỗn hợp gồm EtOAc/Et₂O (80/20) để thu được hợp chất **F-61** là chất rắn màu trắng nhạt (19,4mg, 70%).

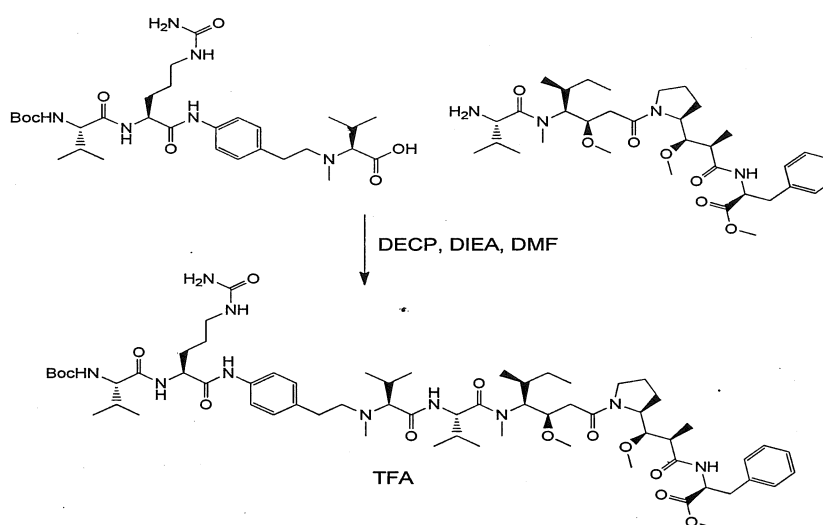
m/z (Q-TOF MS ESI⁺) 1361,7725 (2%, MNa⁺, C₇₀H₁₀₆N₁₂NaO₁₂S đòi hỏi 1361,7666), 670,3961 (100%, (MH₂)²⁺, C₇₀H₁₀₈N₁₂O₁₂S đòi hỏi 670,3960).

Hợp chất F-62:

metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-metoxo-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat



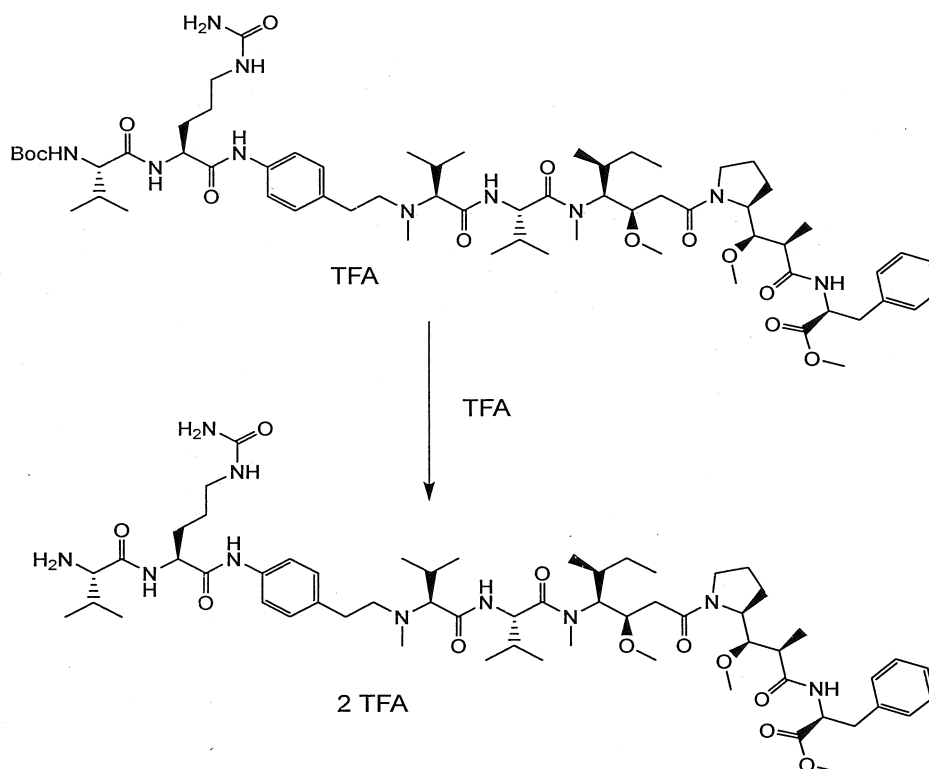
Hợp chất F-62-1: metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-metoxo-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat



Hợp chất **F-62-1** được tạo ra theo cách tương tự với hợp chất **F-61-4** từ amin **3D** (100mg, 0,158mmol, 0,9 đương lượng), axit **F-61-3** (108mg, 0,178mmol, 1 đương

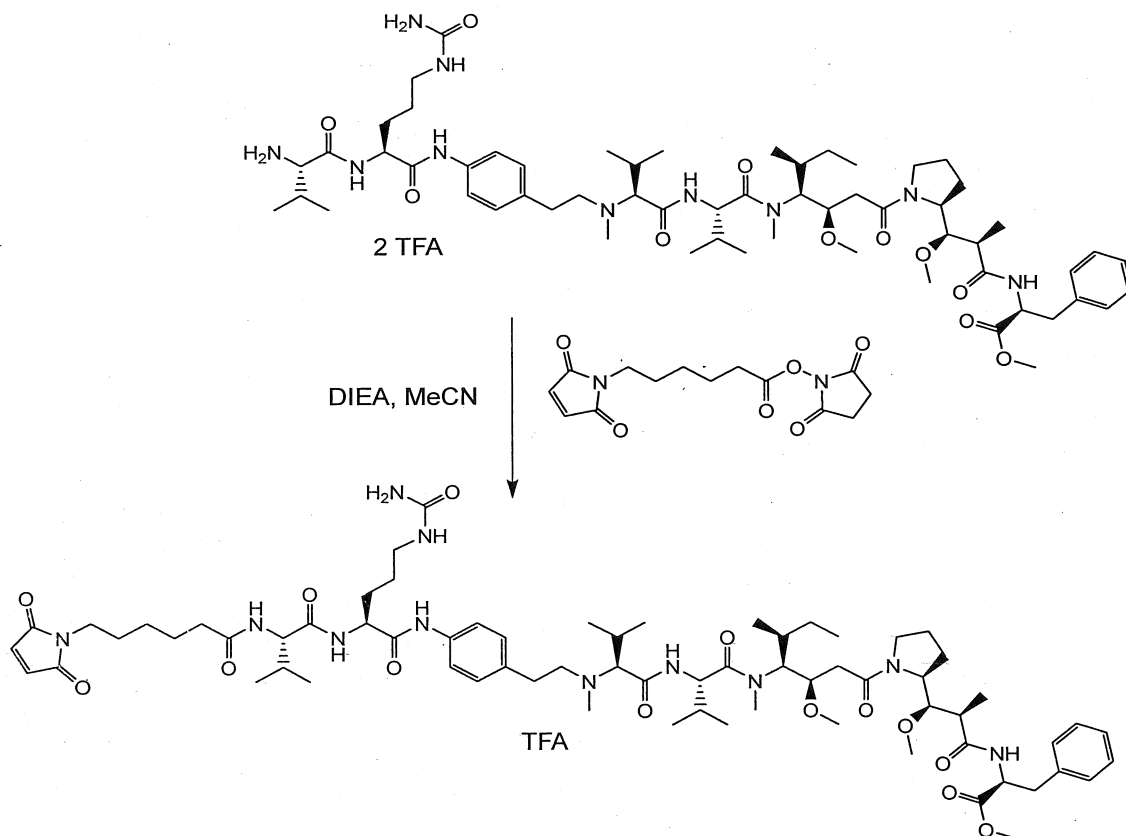
lượng), DECP (41 μ L, 0,267mmol, 1,5 đương lượng) và DIEA (93 μ L, 0,534mmol, 3 đương lượng) trong DMF (2mL). Sau khi làm sạch bằng HPLC điều chế, thu được hợp chất **F-62-1** là chất rắn màu trắng (93mg, 39%).

Hợp chất F-62-2: methyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl)(methyl amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl) pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat bis(2,2,2-trifloaxetat)



Hoà tan hợp chất **F-62-1** (35mg, 0,026mmol, 1,0 đương lượng) trong TFA (200 μ L). Sau 10 phút, thêm nước (2mL) và axetonitril (0,5mL) vào và dung dịch được làm khô lạnh qua đêm để thu được hợp chất **F-62-2** là chất rắn màu trắng (34mg, 105%).

Hợp chất F-62:



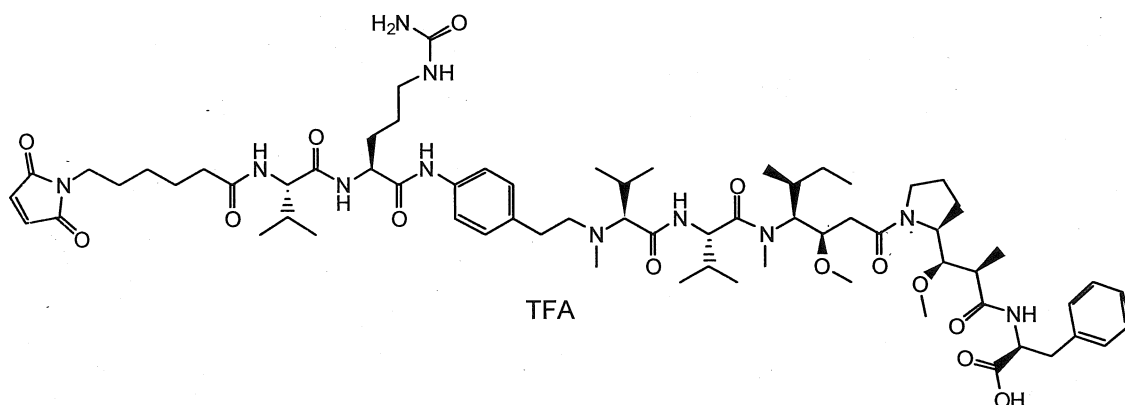
Hòa tan amin **F-62-2** (34mg, 5,55 μ mol, 1 đương lượng) trong axetonitril (3mL). Thêm DIEA (5 μ L, 0,028mmol, 5 đương lượng) và 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoat (2mg, 6,65 μ mol, 1,2 đương lượng) vào. Phân tích HPLC biểu thị sự tiêu thụ hoàn toàn vật liệu ban đầu. Làm bay hơi dung môi đến khô và phần còn lại được nghiền bằng hỗn hợp gồm EtOAc/Et₂O (80/20). Làm sạch sản phẩm thô HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đệm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gôm các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **F-62** là chất rắn màu trắng (5,5mg, 13%).

m/z (Q-TOF MS ESI⁺) 1336,7859 (2%, MNa⁺, C₆₉H₁₀₇N₁₁NaO₁₄ đòi hỏi 1336,7891), 657,9073 (100%, (MH₂)²⁺, C₆₉H₁₀₉N₁₁O₁₄ đòi hỏi 657,9072).

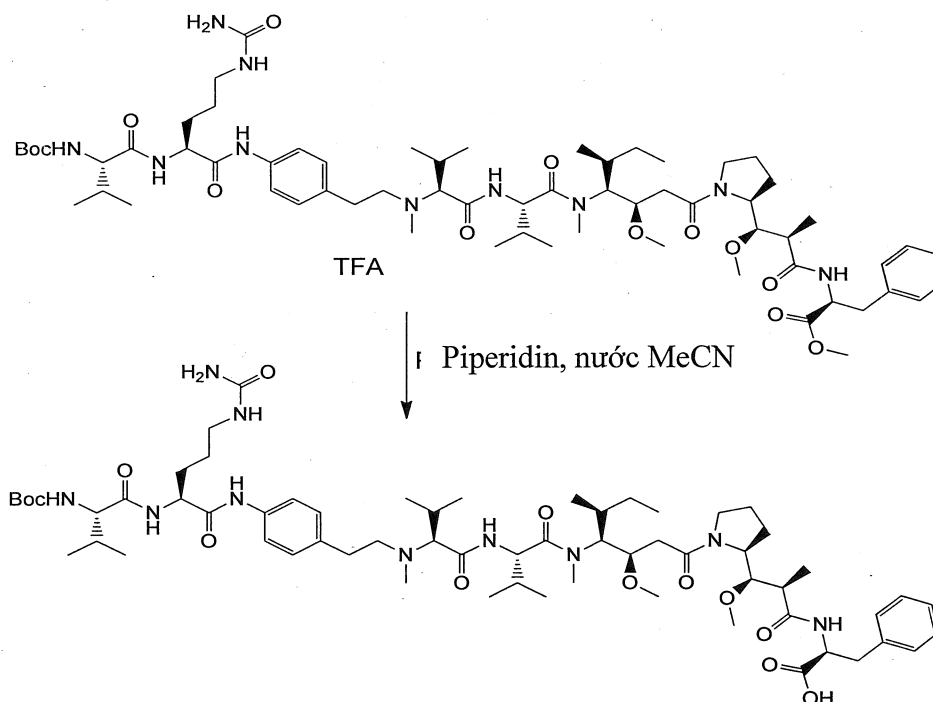
Hợp chất F-63:

((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-

dimethylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-L-phenylalanin 2,2,2-trifloaxetat

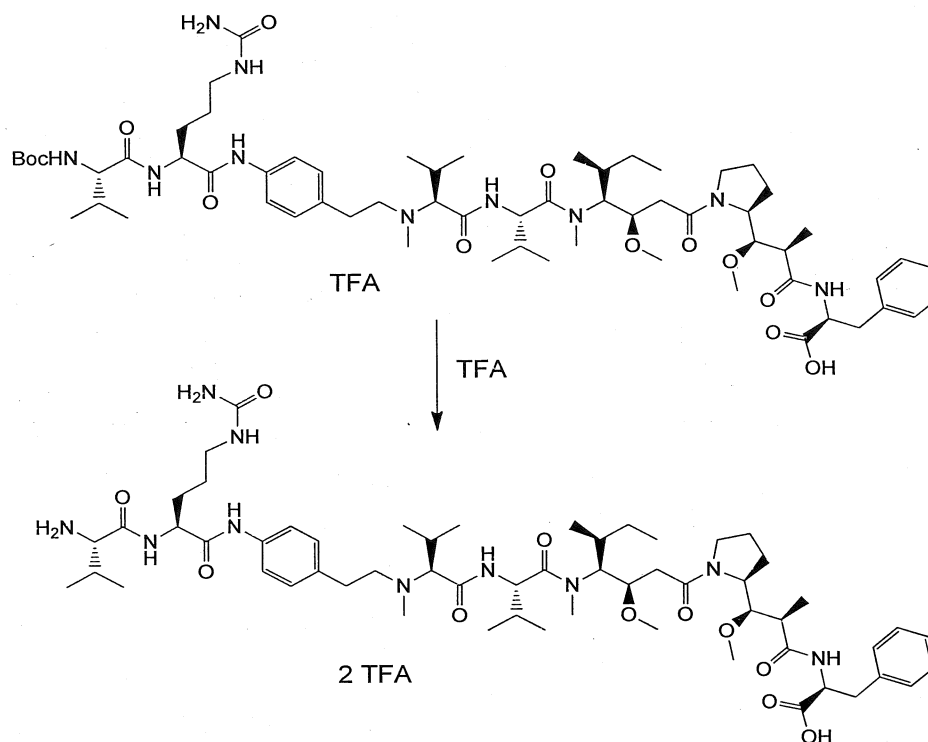


Hợp chất F-63-1: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl) (metyl)amino)-3-metylbutanamido)-N,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-L-phenylalanin

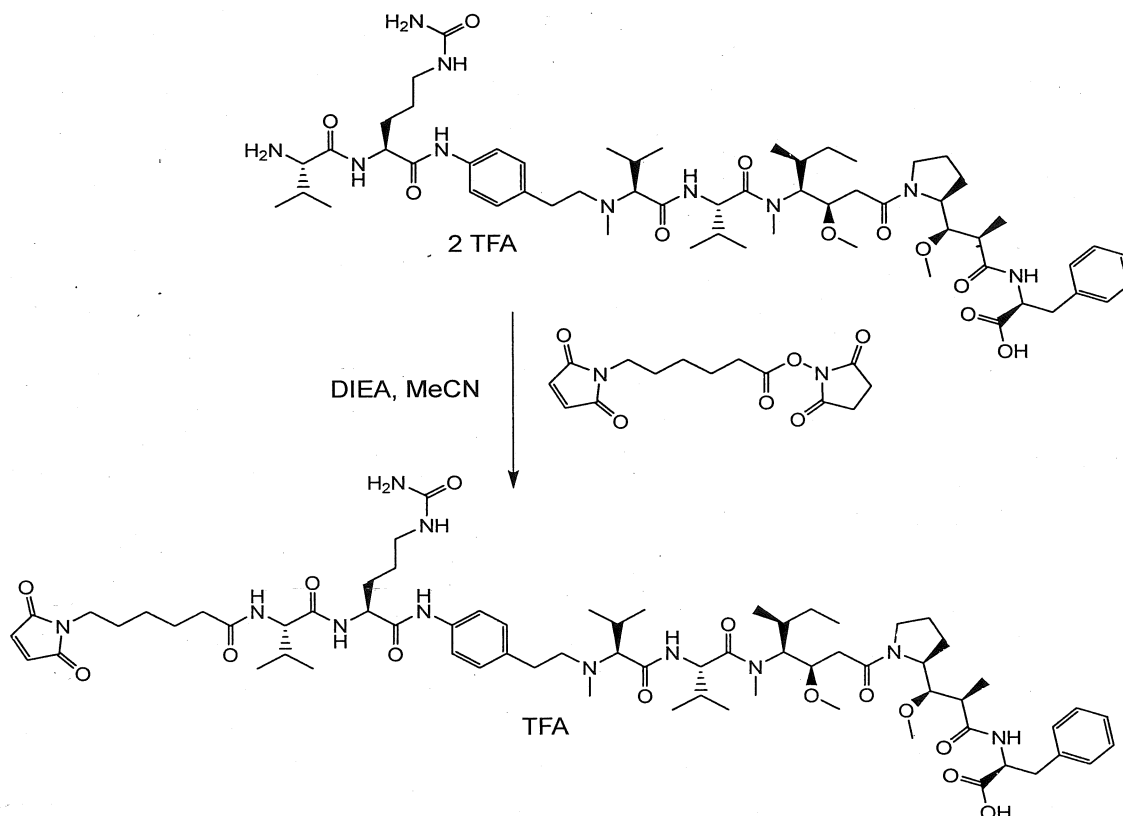


Hoà tan hợp chất **F-62-1** (157mg, 0,118mmol, 1 đương lượng) trong hỗn hợp gồm nước (4,5mL), axetonitril (4,5mL) và piperidin (3,5mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và phần còn lại được nghiền bằng Et₂O (60mL). Gom chất rắn bằng cách lọc và rửa nhẹ hai lần bằng Et₂O (10mL) để thu được hợp chất **F-63-1** là chất rắn màu trắng nhạt (153mg, 100%).

Hợp chất F-63-2: ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl) pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalanin bis 2,2,2-trifloaxetat



Hoà tan hợp chất **F-63-1** (153mg, 0,127mmol, 1,0 đương lượng) trong TFA (200 μ L). Sau 10 phút, thêm nước (2mL) và axetonitril (0,5mL) vào và dung dịch được làm khô lạnh qua đêm để thu được hợp chất **F-63-2** là chất rắn màu trắng (34mg, 105%).

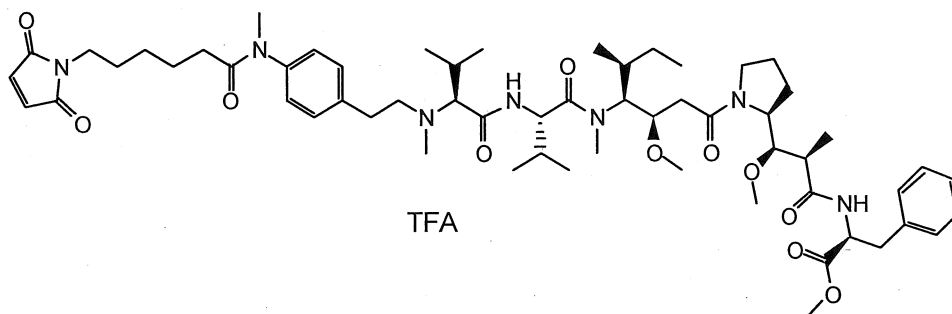
Hợp chất F-63:

Hoà tan amin **F-63-2** (100mg, 0,082mmol, 1 đương lượng) trong hỗn hợp gồm axetonitril (2mL) và DMF (0,5mL) và 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoat (45mg, 0,147mmol, 1,8 đương lượng) và thêm DIEA (71μL, 0,409mmol, 5 đương lượng) vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4,5 giờ, làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm. Làm sạch sản phẩm thô bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5μm, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 01% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **F-63** là chất rắn màu trắng sau đó (42mg, 36%).

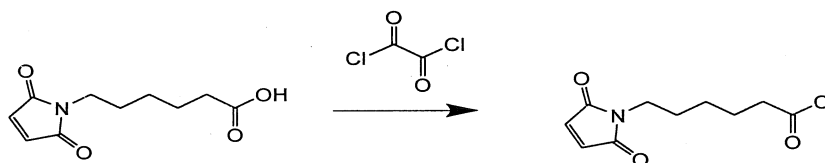
m/z (Q-TOF MS ESI⁺) 1300,7901 (2%, MH^+ , $C_{68}H_{106}N_{11}O_{14}$ đòi hỏi 1300,7915), 650,8990 (100%, $(MH_2)^{2+}$, $C_{68}H_{107}N_{11}O_{14}$ đòi hỏi 650,8994).

Hợp chất G-12

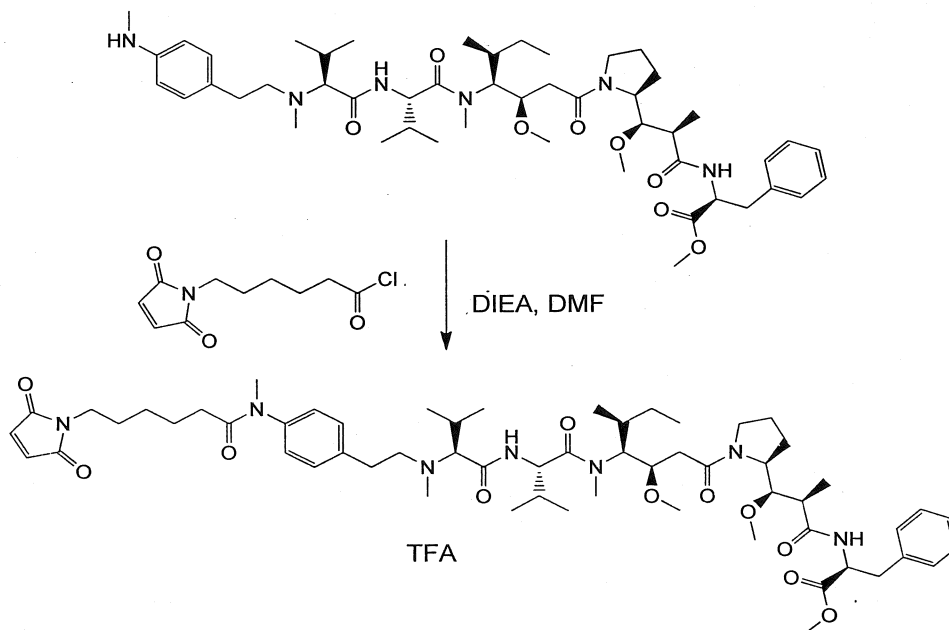
metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-methylhexanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-metoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat



Hợp chất G-12-1: benzyl *N*-(4-aminophenetyl)-*N*-metyl-*L*-valinat dihydroclorua



Hoà tan axit 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanoic (200mg, 0,947mmol, 1 đương lượng) trong oxalyl clorua (3mL). Khuấy dung dịch ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ trước khi làm bay hơi đến khô dưới áp suất giảm. Thu được hợp chất **G-12-1** là chất rắn màu be (217mg, 100%) và được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần phải làm sạch thêm.

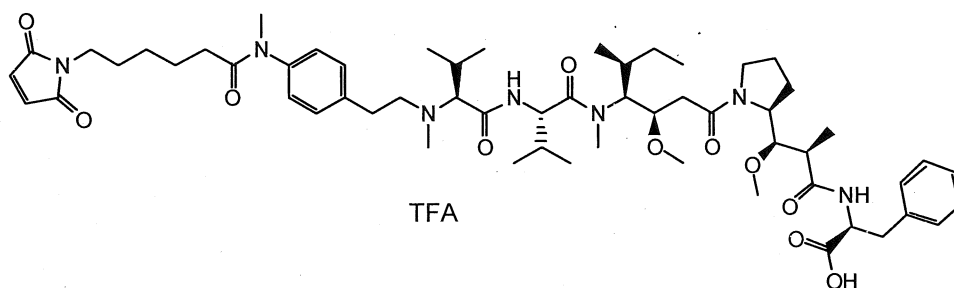
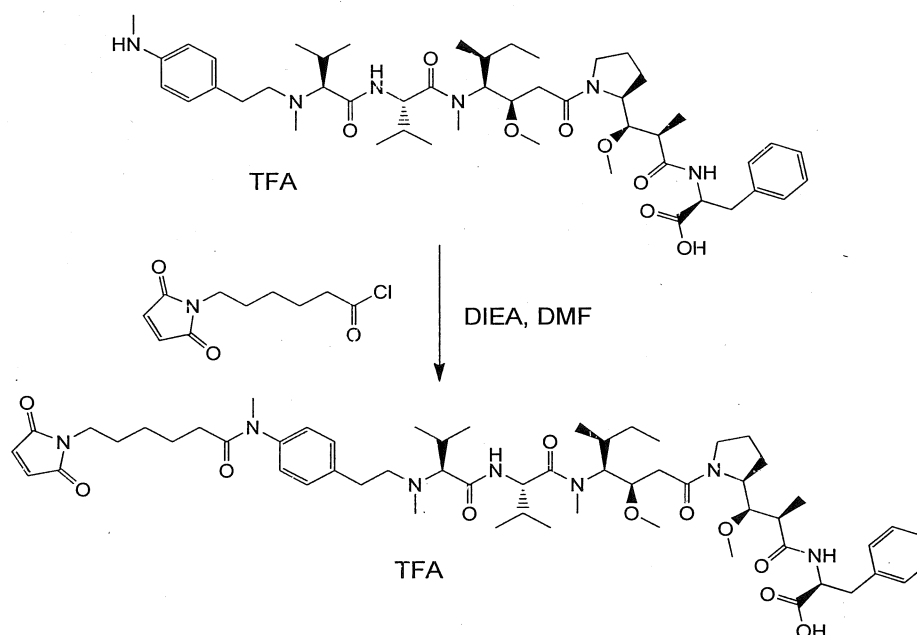
Hợp chất G-12:

Hoà tan anilin **12** (40mg, 0,045mmol, 1 đương lượng) trong DCM khô (1mL) ở 0°C và thêm DIEA (8μL, 0,045mmol, 1 đương lượng) vào. Sau khi khuấy trong 30 phút, đưa dung dịch chứa hợp chất **G-12-1** (10mg, 0,45mmol, 1 đương lượng) trong DCM khô (1mL) vào và phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở 0°C. Pha loãng hỗn hợp bằng DCM (25ml) và rửa hai lần bằng nước (20mL), một lần bằng nước muối (10mL). Làm khô pha hữu cơ qua Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô là chất rắn màu nâu nhạt (54mg). Làm sạch sản phẩm này bằng sắc ký nhanh trên silicagel (DCM/MeOH) tiếp theo HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5μm, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đệm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Làm khô lạnh sản phẩm được phân tách để thu được chất rắn màu trắng (23mg), mà được làm sạch bằng HPLC điều chế và gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **G-12** là chất rắn màu trắng (9mg, 16%).

m/z (Q-TOF MS ESI⁺) 1094,6543 (20%, MNa⁺, C₅₉H₈₉N₇NaO₁₁ đòi hỏi 1094,6512), 1072,6722 (16%, MH⁺, C₅₉H₉₀N₇O₁₁ đòi hỏi 1072,6693), 536,8358 (100%, (MH₂)²⁺, C₅₉H₉₁N₇O₁₁ đòi hỏi 536,8383).

Hợp chất G-13

((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-methylhexanamido)phenetyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalanin 2,2,2-trifloaxetat

Hợp chất G-13:

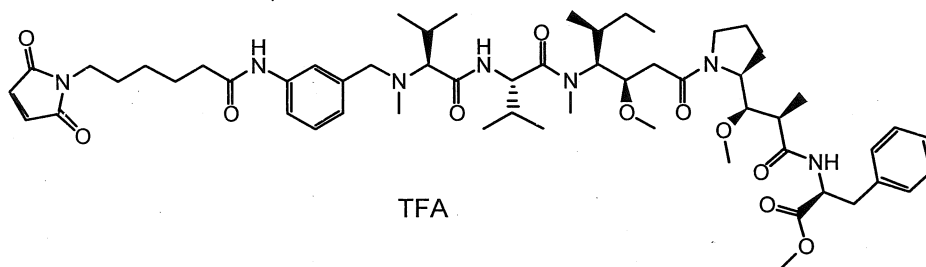
Hoà tan anilin **13** (15mg, 0,015mmol, 1 đương lượng) trong DCM khô (1,5mL) ở 0°C và thêm DIEA (8μL, 0,046mmol, 3 đương lượng) vào. Đưa dung dịch chứa hợp chất **G-12-1** (3,5mg, 0,046mmol, 1 đương lượng) trong DCM khô (0,5mL) vào và phản ứng được khuấy trong 1,5 giờ ở 0°C. Làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và sản phẩm thô được làm sạch bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5μm, 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở

220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **G-13** là chất rắn màu trắng (11,4mg, 62%).

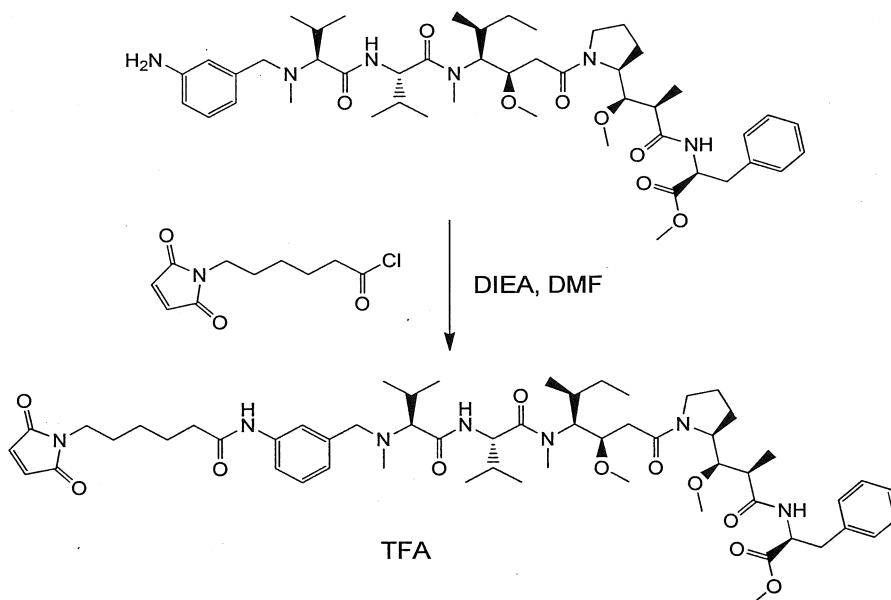
m/z (Q-TOF MS ESI+) 1058,6510 (30%, MH^+ , $C_{58}H_{88}N_7O_{11}$ đòi hỏi 1058,6536), 529,8285 (100%, $(MH_2)^{2+}$, $C_{58}H_{89}N_7O_{11}$ đòi hỏi 529,8305).

Hợp chất G-15

metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((3-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)benzyl)(metyl)amino)-3-metylbutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat 2,2,2-trifloaxetat



Hợp chất G-15:



Hoà tan anilin **15** (40mg, 0,047mmol, 1 đương lượng) trong DCM khô (2mL) ở 0°C và thêm DIEA (10μL, 0,056mmol, 1,2 đương lượng) vào. Đưa dung dịch chứa hợp chất **G-12-1** (108mg, 0,47mmol, 10 đương lượng) trong DCM khô (1mL) vào và

phản ứng được khuấy trong 1,5 giờ ở 0°C. Pha loãng hỗn hợp bằng DCM (10ml) và rửa hai lần bằng nước (5mL). Làm khô pha hữu cơ qua MgSO_4 , lọc và làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô là chất rắn màu be. Làm sạch sản phẩm này bằng HPLC điều chế (Waters 600E, Cột SunFire Prep C18 OBD, 5 μm , 19 x 100mm; Pha giải hấp: nước/ MeCN được đậm với 0,1% TFA; Gradient 5% đến 100% MeCN trong 15 phút; Bộ dò tia tử ngoại Waters 2487 ở 220nm). Gom các phân đoạn được chọn và làm khô lạnh để thu được hợp chất **G15** là chất rắn màu trắng (27mg, 50%).

m/z (Q-TOF MS ESI+) 1066,6517 (2%, MNa^+ , $\text{C}_{57}\text{H}_{85}\text{N}_7\text{NaO}_{11}$ đòi hỏi 1066,6199), 522,8224 (100%, $(\text{MH}_2)^{2+}$, $\text{C}_{57}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{11}$ đòi hỏi 522,8226).

Ví dụ 17: Tổng hợp, làm sạch và đặc trưng hoá ADC

Quy trình được mô tả dưới đây áp dụng cho các dạng IgG1 khảm và được làm giống như của người. Cần phải hiểu rằng đối với dạng khác bất kỳ, như IgG2, IgG4, v.v., người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể làm thích ứng quy trình này bằng cách sử dụng kiến thức chung.

Các kháng thể (1-5mg/ml) được khử một phần bằng Tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua (TCEP) trong 10mM dung dịch đệm borat độ pH=8,4 chứa 150mM NaCl và 2mM EDTA trong 2 giờ ở 37°C. Thông thường, 2,5-3 đương lượng mol của TCEP lần lượt được sử dụng để hướng đích tỷ lệ được chất-kháng thể (DAR) bằng khoảng 4. Việc khử kháng thể một phần được xác nhận bằng phân tích SDS-PAGE trong các điều kiện không khử. Trước khi liên hợp phần tử liên kết-được chất với gốc cystein trong chuỗi được giải phóng, hỗn hợp khử được cho phép giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng. Sau đó, nồng độ kháng thể được điều chỉnh đến 1mg/ml bằng 10mM dung dịch đệm borat độ pH=8,4 chứa 150mM NaCl và 2mM EDTA và 5mol dư được chất với kháng thể được thêm vào từ 10mM dung dịch trong dimethyl sulfoxit (DMSO). Nồng độ DMSO cuối cùng được điều chỉnh đến 10% để duy trì độ hoà tan của được chất trong môi trường nước trong quá trình liên hợp. Phản ứng được thực hiện trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Lượng dư được chất được làm ngừng bằng việc thêm 1,5mol N-axetylcystein/mol được chất và ủ trong 1

giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi thẩm tách đối với 25mM dung dịch đệm His độ pH=6,5 chứa 150mM NaCl qua đêm ở 4°C, thể tiếp hợp kháng thể-được chất được làm sạch bằng cách sử dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết dựa trên các cột sắc ký thương mại và các bộ siêu lọc. Thứ nhất, không có được chất được liên hợp và khối quần tụ ADC được loại trừ bằng phép sắc ký ngoại cỡ (SEC) trên cột S200 (GE Life Sciences) hoặc TSK G3000 SW (Tosoh). Sau đó, các ADC monome được làm sạch được cô đặc đến 2-3mg/ml bằng cách siêu lọc trên các bộ lọc 30 hoặc 50kDa MWCO hoặc bằng phép phân tích ái lực trên Protein A. Các ADC được làm sạch được lưu giữ ở 4°C sau khi lọc vô trùng trên thiết bị lọc 0,2µm. Chúng được phân tích nữa bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử và không khử để xác nhận sự tiếp hợp được chất và bằng SEC trên cột S200 phân tích hoặc TSK G3000 SWXL để xác định hàm lượng monome và dạng được quần tụ. Nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm axit bicinechonic (BCA) với IgG làm tiêu chuẩn. DAR được ước lượng đối với mỗi ADC được làm sạch bằng HIC và LC-MS. Thông thường, hàm lượng của dạng được quần tụ là thấp hơn 5% và DAR nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5.

Ví dụ 18: Đánh giá tính độc tế bào của các kháng thể IGF-1R được liên hợp với các được chất khác nhau

18.1 Đánh giá của các kháng thể khảm đối với tế bào MCF-7

Năm kháng thể IGF-1R được thể hiện cần được nội bào hoá nhanh chóng vào trong lysosom và có khả năng gắn kết thấp trong môi trường có tính axit. Theo khía cạnh đó, các Ab này có tất cả các đặc tính cần được sử dụng như các ADC. Do đó, năm kháng thể khảm kháng IGF-1R được liên hợp với ba hợp chất khác nhau (G-13; E-13 và F-63). Tỷ lệ được chất kháng thể của các ADC này bằng khoảng 4. Để đánh giá tính độc tế bào không đặc hiệu, kháng thể khảm không phù hợp c9G4 cũng được liên hợp với các hợp chất này ở cùng DAR. Tế bào MCF-7 được ủ với nồng độ gia tăng của mỗi ADC ở 37°C trong 6 ngày trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh. Khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống của tế bào huỳnh quang (CellTiter-Glo, Promega). Tín hiệu huỳnh quang được đọc bằng

cách sử dụng bộ đọc đĩa Mithras (Berthold Technologies). Kháng thể khảm không phù hợp c9G4 được liên hợp với E-13, G-13 hoặc F-63 không có hoặc có hoạt tính độc tế bào nhẹ đối với tế bào MCF-7 (Fig.21). Trái lại, việc bổ sung tất cả các ADC khác thu được sau khi liên hợp kháng thể kháng IGF-1R với E-13, G-13 hoặc F-63 làm giảm mạnh khả năng sống của tế bào MCF-7.

18.2 Đánh giá các kháng thể khảm đối với tế bào bình thường

Mức độ biểu hiện nêu trong mục iGF-1R được đánh giá đối với các tế bào bình thường nguyên thủy (PromoCell GmbH) bằng cách sử dụng c208F2 mAb. Đối với mục đích đó, tế bào ($0,5 \times 10^6$ tế bào/ml) được ủ với $10 \mu\text{g/ml}$ kháng thể c208F2 trong 20 phút ở 4°C trong dung dịch đệm FACS (PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN_3). Sau đó, chúng được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp được liên hợp với Alexa 488 trong 20 phút nữa ở 4°C trong bóng tối trước khi được rửa 3 lần trong dung dịch đệm FACS. Sự gắn kết của kháng thể kháng IGF-1R được thực hiện ngay đối với tế bào có thể sống được mà được nhận dạng bằng cách sử dụng propidi iodua (mà nhuộm tế bào chết). Mức độ biểu hiện (B_{max}) là thấp đối với tế bào bình thường (Bảng 14) so với sự biểu hiện nêu trong mục iGF-1R đối với tế bào MCF-7 (xem ví dụ 2, bảng 8).

Bảng 14

Tế bào bình thường	B_{max}
Tế bào màng trong động mạch chủ của người (HAoEC)	21
Tế bào màng trong vi mạch phổi của người (HPMEC)	33
Tế bào cơ trơn phế quản của người (HBSMC)	26
Tế bào biểu mô thận của người (HREpC)	110
Tế bào chuyển tiếp của người (HUC)	181

Tính độc tế bào của ADC c208F2-G-13 được đánh giá đối với tế bào bình thường. Tế bào được ủ với các nồng độ gia tăng của c208F2-G-13 ở 37°C trong 6 ngày trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh. Khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống của tế bào huỳnh quang (CellTiter-Glo, Promega). Tín hiệu huỳnh quang được đọc bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa Mithras (Berthold Technologies). Không có tính độc đáng kể nào được quan sát đối với HBSMC, HPMEC, HAoEC và HREpC (Fig.25). Tính độc tế bào không đáng kể được đo đối với HUC chỉ ở các nồng độ cao của c208F2-G-13.

18.3 Đánh giá các biến thể được làm giống như của người của hz208F2

Mười sáu biến thể được làm giống như của người của 208F2 được liên hợp với hợp chất G-13. Tỷ lệ được chất kháng thể của các ADC bằng khoảng 4. Để đánh giá tính độc không đặc hiệu, kháng thể khảm c9G4 không phù hợp cũng được liên hợp với các hợp chất này ở cùng DAR. Kháng thể khảm c208F2 cũng được liên hợp với G-13. Tế bào MCF-7 được ủ với các nồng độ gia tăng của mỗi ADC ở 37°C trong 6 ngày trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh. Khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống của tế bào (CellTiter-Glo, Promega). Tín hiệu huỳnh quang được đọc bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa Mithras (Berthold Technologies). Kháng thể khảm không phù hợp c9G4 được liên hợp với G-13 không có hoặc có hoạt tính độc tế bào nhẹ đối với tế bào MCF-7 (Fig.26). Trái lại, việc bổ sung tất cả các ADC khác thu được sau khi liên hợp với các kháng thể kháng IGF-1R với G-13 giảm mạnh khả năng sống của tế bào MCF-7. Khả năng của mười sáu biến thể được làm giống như của người gây độc tế bào ít nhất là tương đương thậm chí tốt hơn với khả năng được đo với với dạng khảm c208F2-G-13 như được thể hiện trong Bảng 15 và được minh họa với một biến thể được làm giống như của người trên Fig.26.

Bảng 15

		EC50
mAb khảm	c208F2-G-13	9.0E-11
Biến thể được làm giống như của người	H208F2 (H026/L024)-G-13	1.1E-10
	hz208F2 (H037/L018)-G-13	3.7E-11
	hz208F2 (H047/L018)-G-13	4.4E-11
	hz208F2 (H049/L018)-G-13	6.6E-11
	hz208F2 (H051/L018)-G-13	3.6E-11
	hz208F2 (H052/L018)-G-13	3.4E-11
	hz208F2 (H057/L018)-G-13	5.2E-11
	hz208F2 (H068/L018)-G-13	6.2E-11
	hz208F2 (H070/L018)-G-13	5.7E-11
	hz208F2 (H071/L018)-G-13	8.5E-11
	hz208F2 (H076/L018)-G-13	5.3E-11
	hz208F2 (H077/L018)-G-13	3.0E-11
	hz208F2 (H037/L021)-G-13	3.9E-11
	hz208F2 (H049/L021)-G-13	5.2E-11
	hz208F2 (H052/L021)-G-13	3.7E-11
	hz208F2 (H076/L021)-G-13	4.5E-11

Ví dụ 19: Hoạt tính *In vivo* của kháng thể c208F2 được tiếp hợp với các hợp chất E-13, G-13 hoặc F-63 trong mô hình ghép khác loài MCF-7.

Để xác nhận rằng hiệu quả *in vitro* của c208F2 được liên hợp với các hợp chất G-13, E-13 hoặc F-63 có thể được dịch mã *in vivo*, chúng đã được thử nghiệm trong mô hình ghép khác loài MCF-7.

Tất cả quy trình động vật được thực hiện theo hướng dẫn của 2010/63/UE Directive đối với việc bảo vệ động vật được sử dụng cho các mục đích khoa học. Quy trình này được chấp thuận bởi Animal Ethical Committee of the Pierre Fabre Institute. Năm triệu tế bào MCF-7 được tiêm dưới da vào chuột Thụy sĩ/Trụi lông 7 tuần tuổi.

Trước khi tiêm tế bào, hạt oestrogen (Innovative Research of America) được cấy vào hông bên trái đối với chuột để giải phóng các estrogen cần thiết cho sự sinh trưởng in vivo của các khối u MCF-7.

Hai mươi ngày sau khi cấy ghép tế bào MCF-7, khi khối u đạt đến cỡ trung bình 120-150mm³, động vật được chia thành các nhóm gồm 5 chuột theo cỡ và phương diện khối u. Các lần điều trị khác nhau được tiêm truyền bằng cách tiêm trong màng bụng. Trạng thái sức khỏe của động vật được kiểm tra hằng ngày. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần bằng compa điện tử cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Thể tích khối u được tính toán bằng công thức sau: $\pi/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$. Tính độc được đánh giá theo trọng lượng của động vật ba lần/tuần. Các phân tích thống kê được thực hiện ở mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm Mann-Whitney. Tất cả các hợp chất được tiêm trong màng bụng (i.p.). Trong ví dụ này, hoạt tính kháng khối u của c208F2 mAb được liên hợp với E-13, F-13 hoặc F-63 ở khoảng DAR 4 được đánh giá sau 2 lần tiêm 7mg/kg liều ở D20 và D27 (Fig.22A, Fig.22B và Fig.22C). Theo cách song song, các gốc được chất được nắp E-13, F-13 và F-63 được tiêm ở liều tương đương của một gốc tương ứng với 7mg/kg c208F2-E-13, c208F2-F-13 và c208F2-F-63 DAR khoảng 4.

Việc tiêm c208-E-13 (Fig.22A), c208F2-G-13 (Fig.22B) hoặc c208F2-F-63 (Fig.22C) ức chế đáng kể và thậm chí gây ra sự hồi quy sinh trưởng khối u hoàn toàn ($p < 0,05$ so với được chất được nắp tương ứng). Không có sự khác nhau về hoạt tính thống kê nào giữa c208-E-13, c208F2-G-13 và c208F2-F-63 có thể được lưu ý. Các được chất được nắp không có tác dụng đối với sự sinh trưởng khối u MCF-7 ($p > 0,05$ so với nhóm đối chứng)

Nhóm thử nghiệm thứ hai được thực hiện với c208F2 được liên hợp với E-13 hoặc G-13 và với kháng thể không phù hợp c9G4 được liên hợp với E-13 hoặc G-13 trong mô hình ghép khác loài MCF-7 như được mô tả trên đây. Chuột được tiêm i.p. với 7mg/kg mỗi ADC ở D20 và D27 (các hình vẽ Fig.23A và Fig.23B).

Việc tiêm cả c9G4-E-13 và c9G4-F-13 tác động nhẹ và chuyển tiếp sự sinh trưởng của mô hình ghép khác loài MCF-7. Tuy nhiên, thử nghiệm thứ hai này xác

nhận rằng việc tiêm c208-E-13 hoặc c208F2-G-13 gây ra sự hồi quy khối u hoàn toàn do D43 thể hiện hoạt tính kháng khối u cao của các ADC.

Ví dụ 20: Hoạt tính *In vivo* của kháng thể hz208F2 được tiếp hợp với hợp chất G-13 trong mô hình ghép khác loài 3⁺ MCF-7.

Các dạng được làm giống như của người của 208F2 được liên hợp với hợp chất G-13 đã được đánh giá *in vivo*, trong mô hình ghép khác loài MCF-7.

Tất cả quy trình động vật được thực hiện theo hướng dẫn 2010/63/UE Directive đối với sự bảo vệ động vật được sử dụng cho các mục đích khoa học. Quy trình được chấp thuận bởi Animal Ethical Committee of the Pierre Fabre Institute. Năm triệu tế bào MCF-7 được tiêm dưới da vào chuột Thụy sĩ/Trụi lông 7 tuần tuổi. Trước khi tiêm tế bào, hạt oestrogen (Innovative Research of America) được cấy ghép vào hông bên trái của chuột để giải phóng các estrogen cần thiết cho sự sinh trưởng *in vivo* của khối u MCF-7.

Hai mươi ngày sau khi cấy ghép tế bào MCF-7, khi khối u đạt đến cỡ trung bình 120-150mm³, động vật được chia thành các nhóm gồm 6 chuột theo cỡ và phương diện khối u. Các điều trị khác nhau được tiêm truyền bằng cách tiêm trong màng bụng như quy trình 4 lần tiêm; một lần tiêm mỗi bốn ngày (Q4d4). Trạng thái sức khỏe của động vật được kiểm tra hằng ngày. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần bằng copax điện tử cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Thể tích khối u được tính toán bằng công thức sau: $\pi/6 \times \text{chiều dài} \times \text{chiều rộng} \times \text{chiều cao}$. Tính độc được đánh giá theo trọng lượng của động vật ba lần/tuần. Các phân tích thống kê được thực hiện ở mỗi lần đo bằng cách sử dụng thử nghiệm Mann-Whitney. Tất cả các hợp chất được tiêm trong màng bụng (i.p.). Trong ví dụ này, hoạt tính kháng khối u của c208F2 mAb được liên hợp với hợp chất G-13 được so với các dạng được làm giống như của người khác nhau cũng được liên hợp với G-13 (Fig.27). Các dạng được làm giống như của người được thử nghiệm này được mô tả trong bảng 16 dưới đây:

Bảng 16

Dạng được làm giống như
của người

Humanized forms	VH/VL tương ứng	Tên khác của dạng hz	ADC tương ứng
208F2 085hz0107 (G1)	H057/L018	n/a	hz208F2 (H057/L018)-G-13
208F2 085hz0119 (G1)	H070/L018	n/a	hz208F2 (H070/L018)-G-13
208F2 085hz0126 (G1)	H077/L018	hz208F2-4	hz208F2 (H077/L018)-G-13
hz208F2 (VH3VL3)	H26/L024	n/a	hz208F2 (H026/L024)-G-13

Việc tiêm dạng được làm giống như của người c208-G-13 hoặc 208F2 ức chế đáng kể và thậm chí gây ra sự hồi quy sinh trưởng khối u hoàn toàn ($p < 0,05$ so với đối chứng tương ứng). Không có sự khác nhau nhau hoạt tính thống kê nào giữa c208F2-G-13 và các dạng được làm giống như của người được thử nghiệm được quan sát.

Bộ thử nghiệm thứ hai được thực hiện với c208F2 hoặc hz208F2-4 được liên hợp với mô hình ghép khác loài G-13 trong MCF-7 như được mô tả trên đây (lần lượt các hình vẽ Fig.28A và Fig.28B). Chuột được tiêm i.p. với 3mg/kg mỗi ADC, mỗi bốn ngày đối với 4 lần tiêm (Q4d4) hoặc chỉ một lần.

Cùng hoạt tính kháng khối u mạnh được quan sát khi ADC được tiêm bốn lần hoặc chỉ một lần trong mô hình ghép khác loài MCF.

Ví dụ 21: Hoạt tính *In vivo* của kháng thể 208F2 được tiếp hợp với các hợp chất G-13 hoặc E-13 trong mô hình ghép khác loài 2^+ CaOV-3.

Hoạt tính kháng khối u cũng được nghiên cứu trong khối u biểu hiện 2^+ , mô hình ghép khác loài CaOV-3 mà là dòng tế bào ung thư biểu mô buồng trứng. Đối với mục đích đó, chuột được tiêm dưới da ở D0 với 7×10^6 tế bào. Khi khối u đạt đến khoảng 120 mm^3 (19 ngày sau khi tiêm tế bào khối u), động vật được chia thành 5 nhóm gồm 5 chuột với cỡ khối u có thể so sánh được và được điều trị trong màng bụng với c208F2 được liên hợp với E-13 hoặc G-13 và với kháng thể không phù hợp c9G4 được liên hợp với E-13 hoặc G-13. Chuột được tiêm i.p. với 3mg/kg mỗi ADC đối với chu trình 6 lần tiêm; một lần tiêm mỗi bốn ngày. Chuột được tiếp theo quan sát đối với tốc độ sinh trưởng ghép khác loài. Thể tích khối u được tính toán bằng công thức: $\pi/6$ X chiều dài X chiều rộng X chiều cao.

So với c9G4-E-13 mà làm chậm sự sinh trưởng vừa phải và tạm thời, việc tiêm c9G4-G-13 không tác động đến sự sinh trưởng của khối u ghép khác loài CaOV-3.

Trong khi đó, việc tiêm c208F2-E-13 hoặc c208F2-G-13 lần lượt tạo ra mức ức chế sinh trưởng khối u 95% và 77% ở ngày 50 (các hình vẽ Fig.29A và Fig.29B).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức (I) sau:

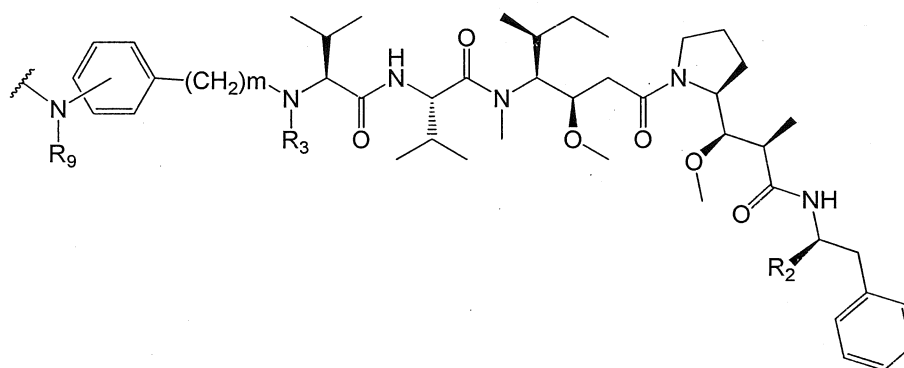


hoặc muối được dụng của nó,

trong đó

Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có khả năng gắn kết với IGF-1R của người, kháng thể này chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.1, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.4, 5 và 6; **L** là phần tử liên kết;

D là gốc được chất có công thức (II) sau:



(II)

trong đó:

R_2 là COOH , COOCH_3 hoặc thiazolyl;

R_3 là H hoặc $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$;

R_9 là H hoặc $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$;

m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8;

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào **L**; và

n nằm trong khoảng từ 1 đến 12.

2. Thẻ tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó **Ab** này được chọn từ:

- a) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11;
- b) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.10, 5 và 11;
- c) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12; và
- d) kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.8, 2 và 3 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11.

3. Thẻ tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó **Ab** này được chọn từ:

- a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.13 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11;
- b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.14 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.10, 5 và 11;
- c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.15 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12;
- d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.16 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11; và
- e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.17 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 12.

4. Thẻ tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó **Ab** này được chọn từ:

- a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.18 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;
- b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.19 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;

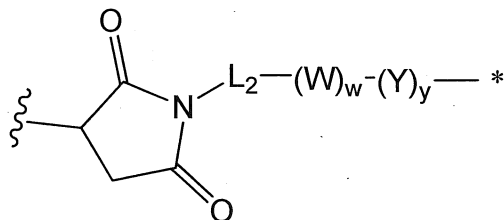
- c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.20 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3;
 - d) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.21 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.8, 2 và 3; và
 - e) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.22 và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3.
5. Thẻ tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó **Ab** này được chọn từ các kháng thể 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 và 213B10.
6. Thẻ tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó **Ab** này chứa:
- a) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự nêu trong SEQ ID No.33 trong đó trình tự SEQ ID No.33 này chứa ít nhất một đột biến ngược được chọn từ các gốc 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 và 95; và
 - b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự nêu trong SEQ ID No.35, trong đó trình tự SEQ ID No.35 này chứa ít nhất một đột biến ngược được chọn từ các gốc 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 hoặc 87.
7. Thẻ tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó **Ab** này được chọn từ:
- a) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No. 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80; và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No.9, 5 và 11;
 - b) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60; và ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No.7, 2 và 3; và
 - c) kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 và 80 hoặc trình tự bất

kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 hoặc 80; và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.57 hoặc 60.

8. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó **Ab** này chứa:

- a) chuỗi nặng có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 và 81 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 hoặc 81; và
- b) chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ trình tự nêu trong SEQ ID No.59 và 61 hoặc trình tự bất kỳ ít nhất 80% đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID No.59 hoặc 61.

9. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó **L** là phần tử liên kết có công thức (III) sau:



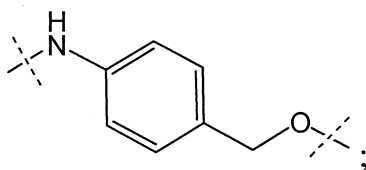
(III)

trong đó

L_2 là (C_4-C_{10}) cycloalkyl-carbonyl, (C_2-C_6) alkyl, (C_2-C_6) alkyl-carbonyl,

W là đơn vị axit amin; w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 5;

Y là PAB-carbonyl với PAB có công thức

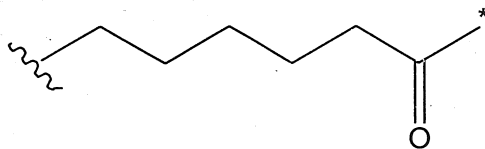


y là 0 hoặc 1;

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào **D**; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào **Ab**.

10. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 9, trong đó L_2 có công thức sau:



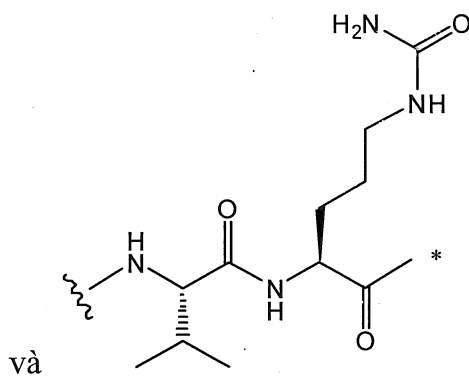
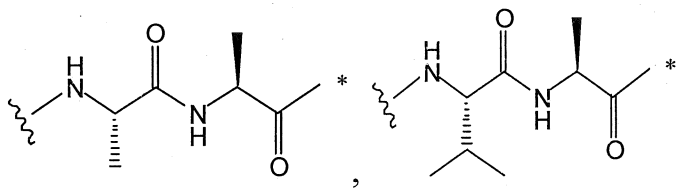
trong đó

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào $(W)_w$; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào nguyên tử nitơ của gốc maleimit.

11. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 9, trong đó $(W)_w$ được chọn từ:

liên kết đơn, phân tử có công thức:



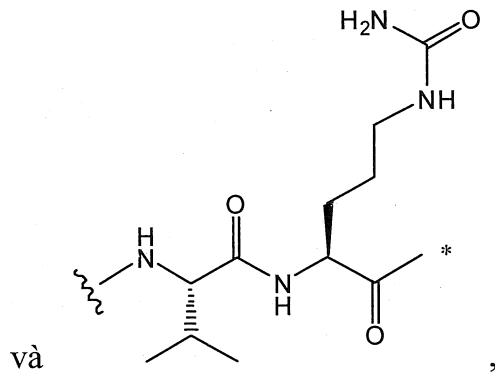
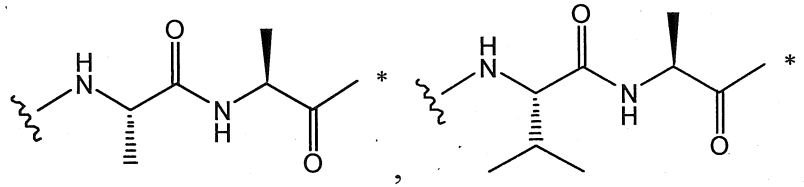
trong đó

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào $(Y)_y$; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào L_2 .

12. Thử tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 9, trong đó $w = 0$; hoặc $w = 2$ và $(W)_w$ được chọn từ:

phần tử có công thức:



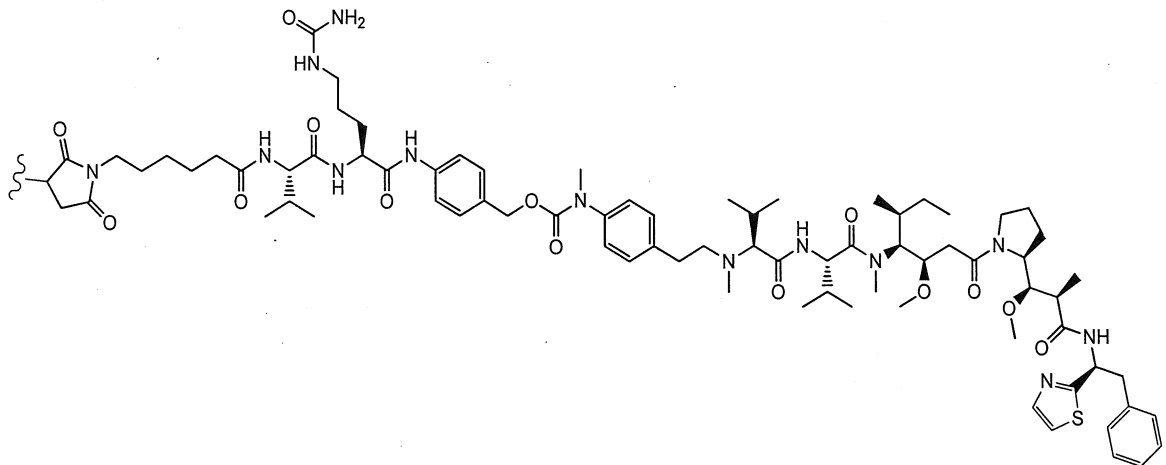
trong đó

dấu hoa thị biểu thị điểm gắn vào $(Y)_y$; và

đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào L_2 .

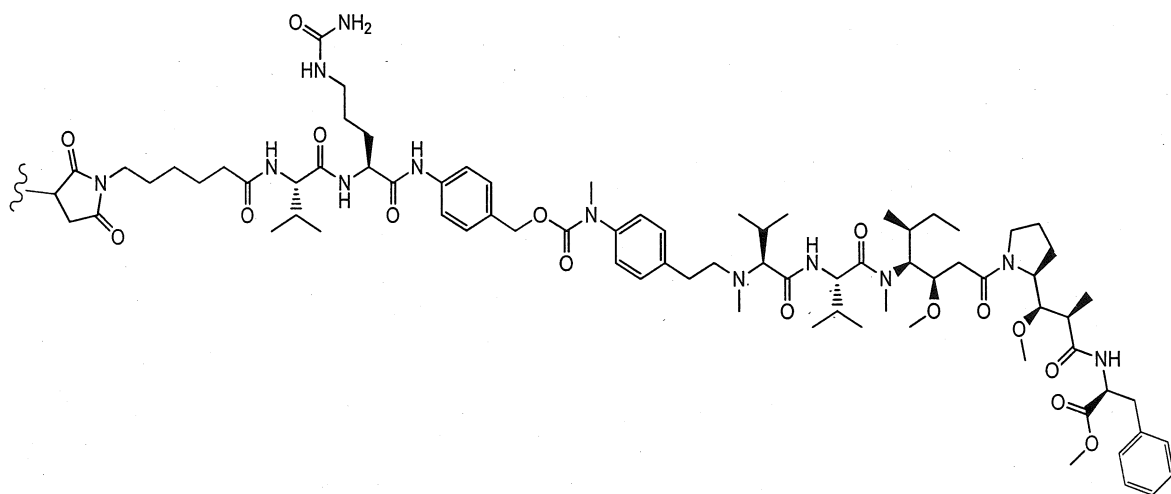
13. Thử tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó **(L-D)** được chọn từ:

phần tử có công thức:



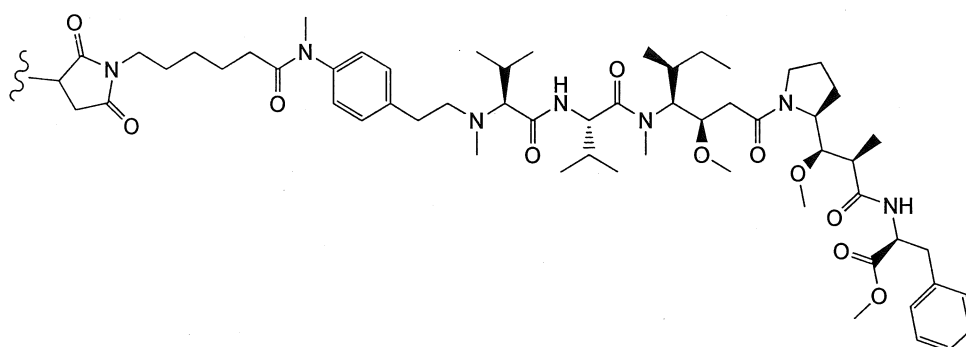
(E-11)

phần tử có công thức:



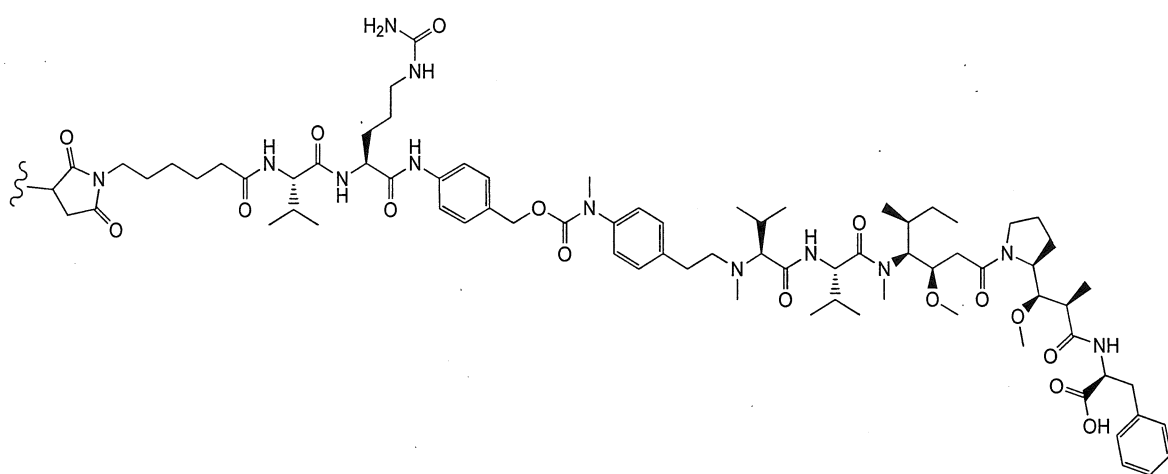
(E-12)

phần tử có công thức:



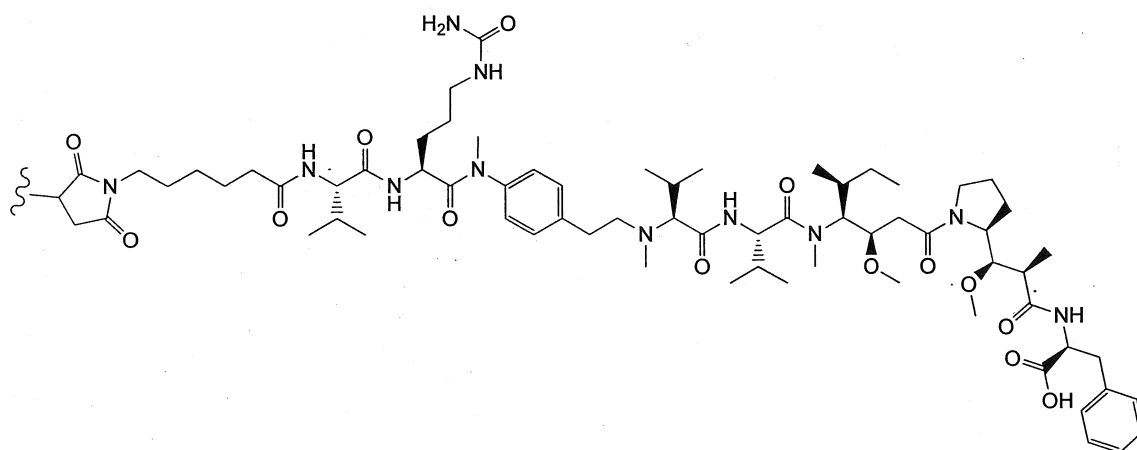
(G-12)

phần tử có công thức:



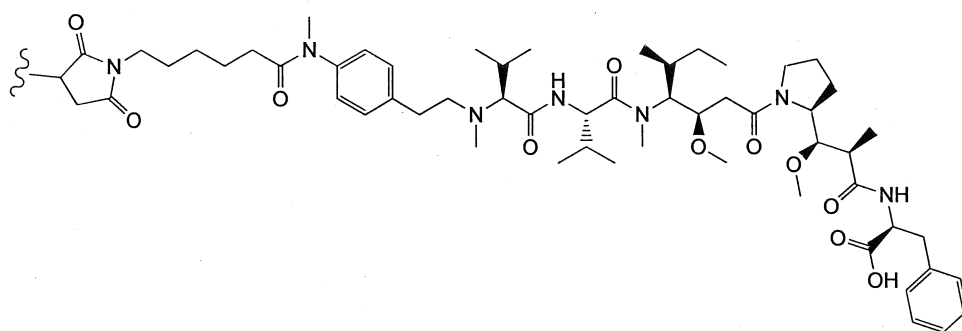
(E-13)

phần tử có công thức:



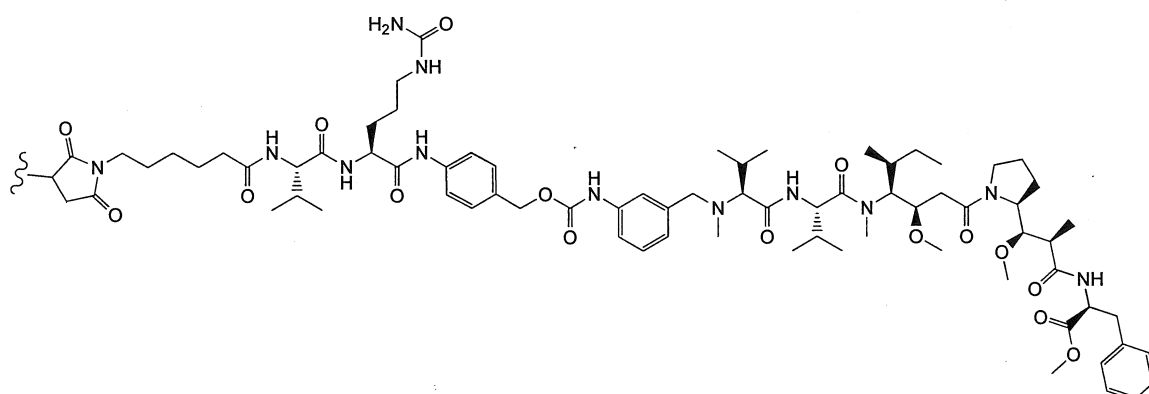
(F-13)

phần tử có công thức:



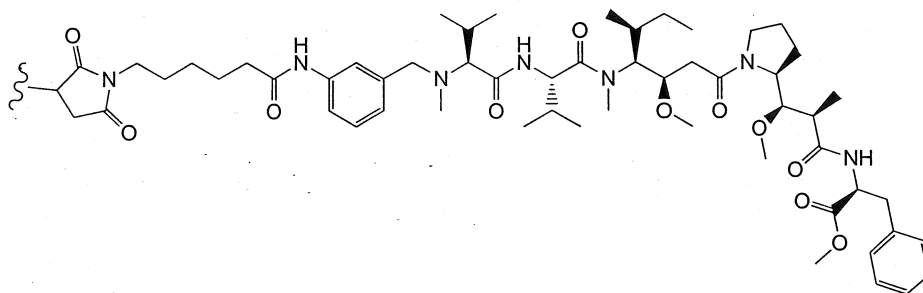
(G-13)

phần tử có công thức:



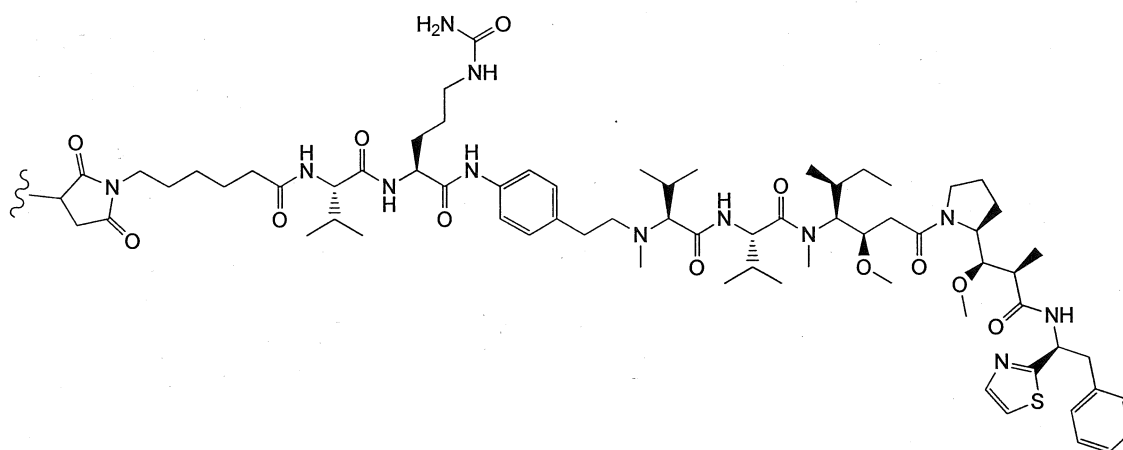
(E-15)

phần tử có công thức:



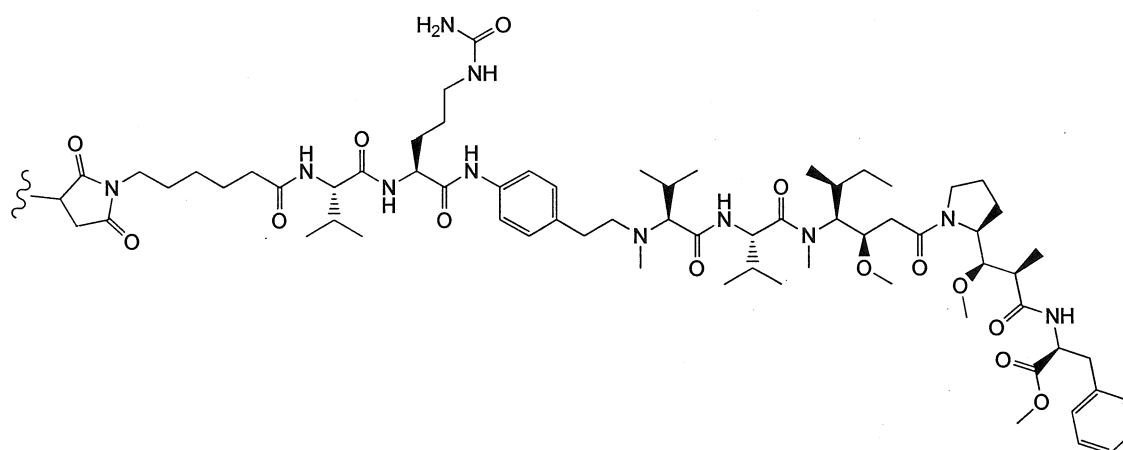
(G-15)

phần tử có công thức:



(F-61)

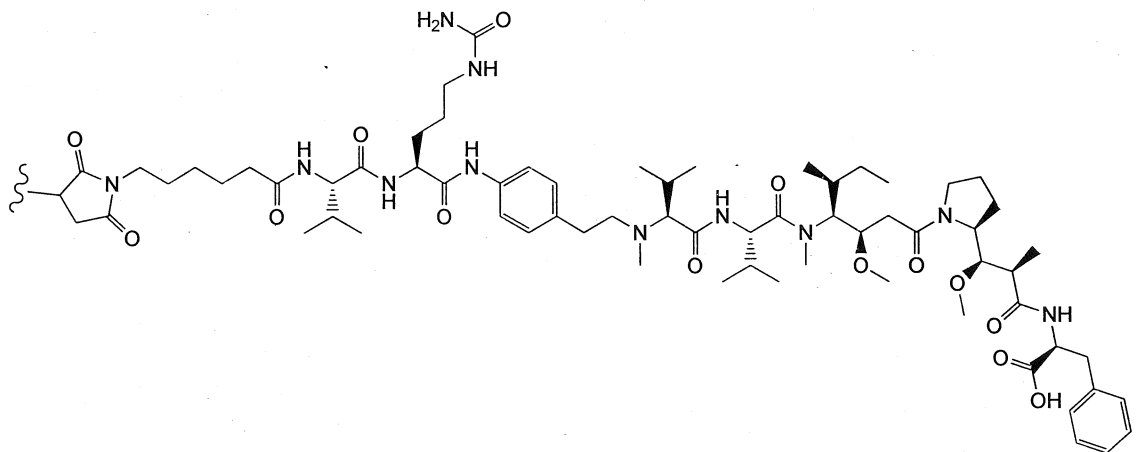
phần tử có công thức:



(F-62)

và

phần tử có công thức:

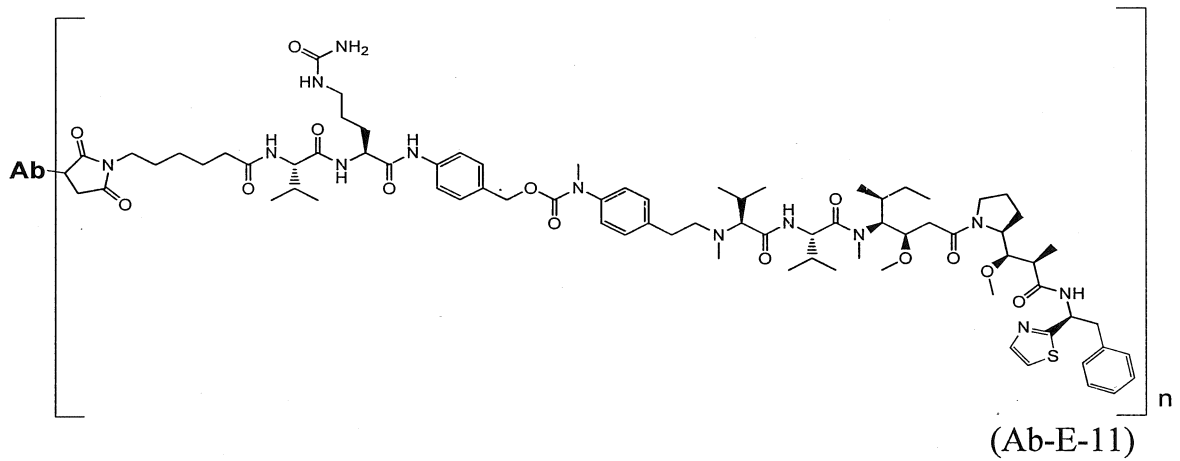


(F-63)

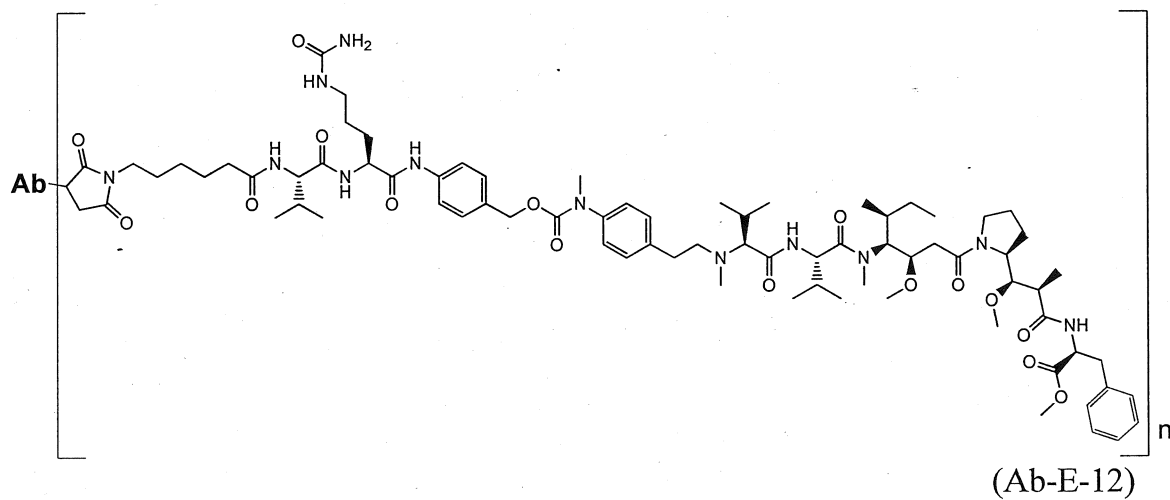
trong đó đường dạng sóng biểu thị điểm gắn vào **Ab**.

14. Thử tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó thử tiếp hợp này có công thức được chọn từ:

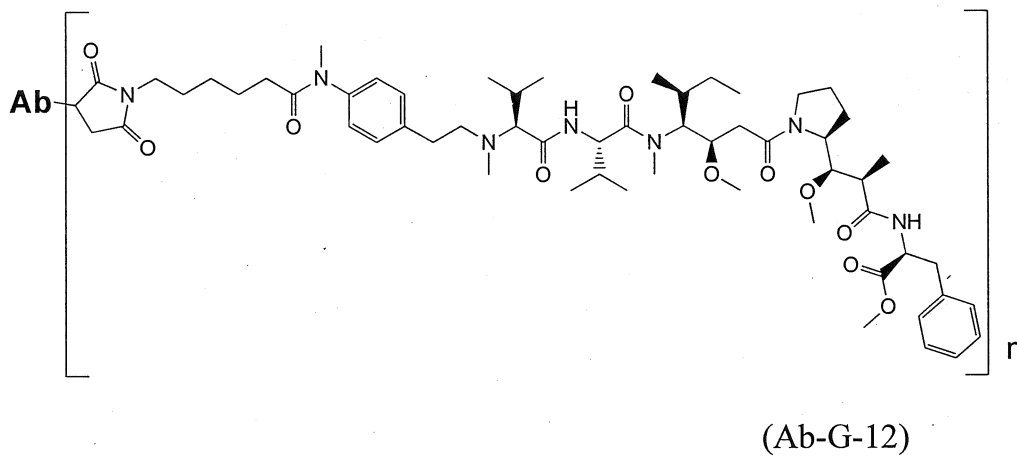
phần tử có công thức:



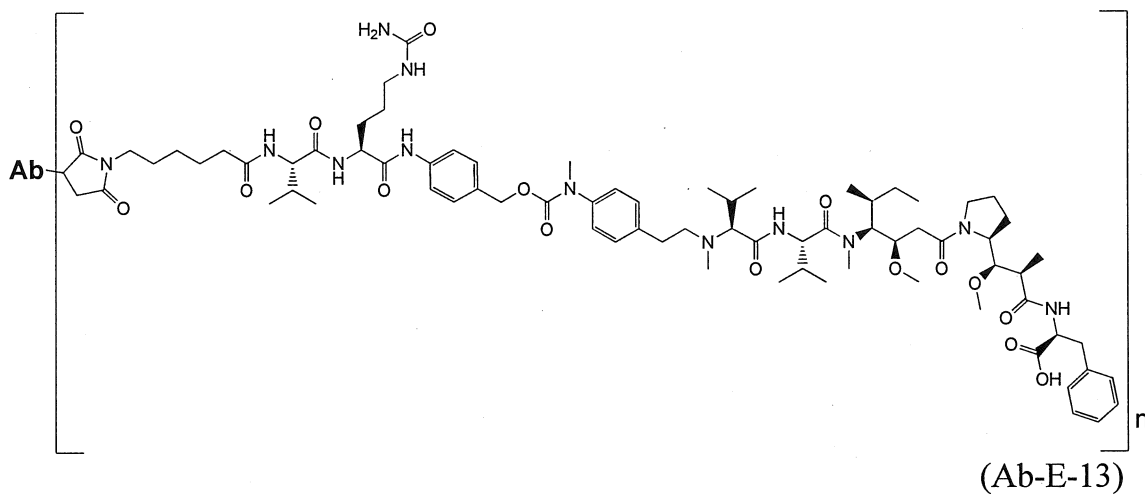
phần tử có công thức:



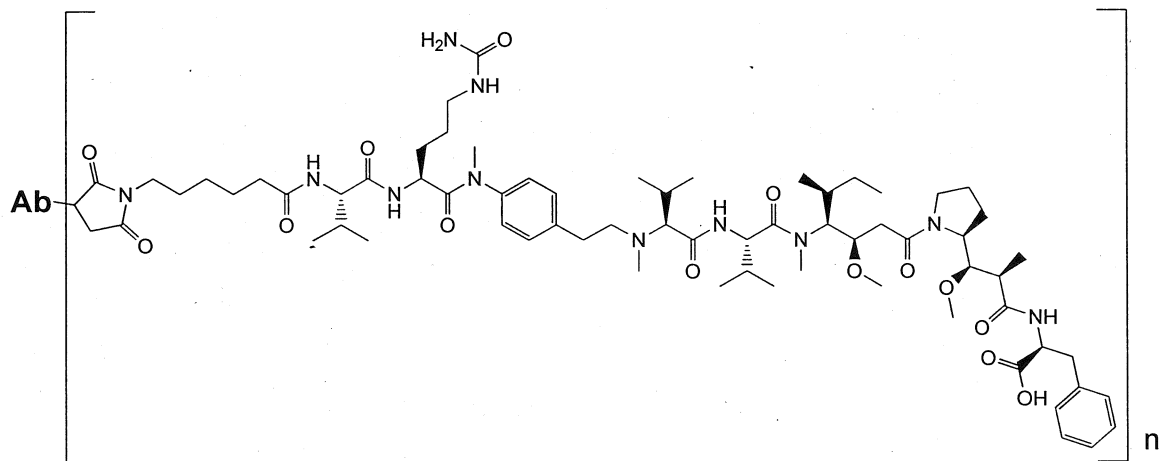
phần tử có công thức:



phần tử có công thức:

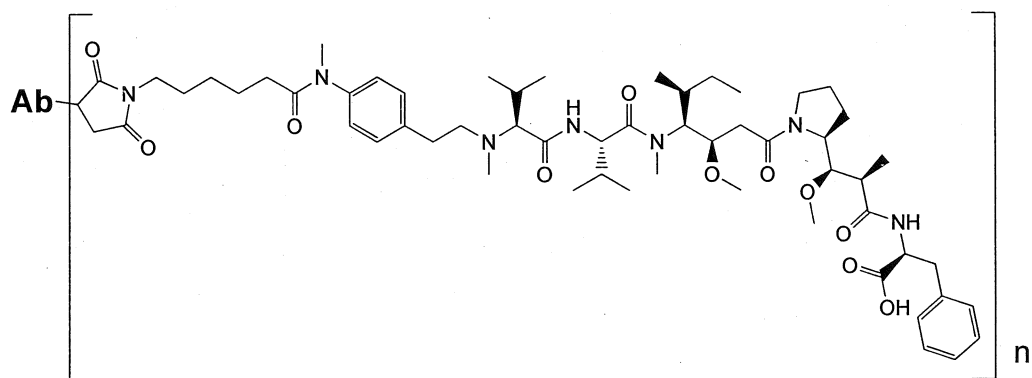


phần tử có công thức:



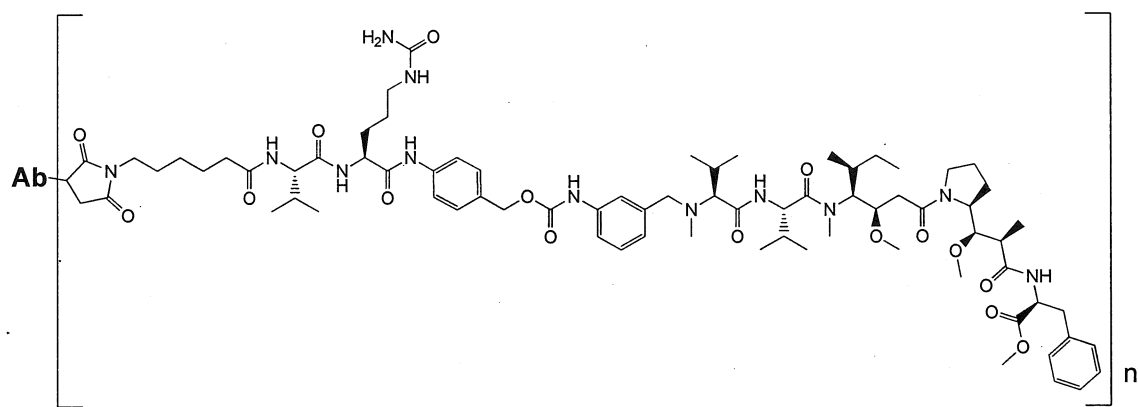
(Ab-F-13)

phần tử có công thức:



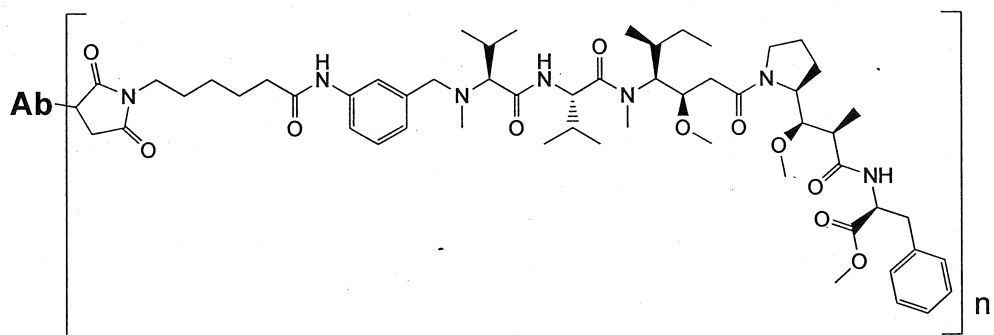
(Ab-G-13)

phần tử có công thức:



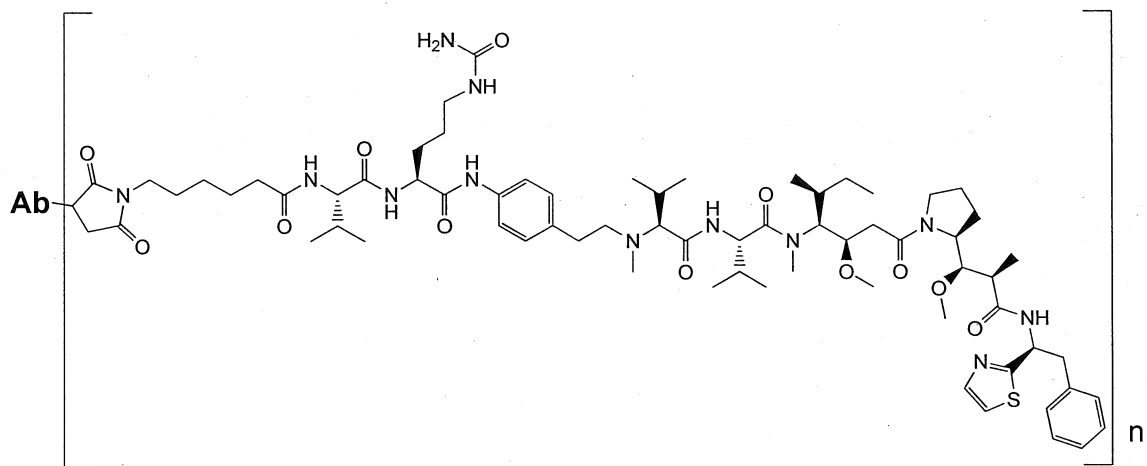
(Ab-E-15)

phần tử có công thức:



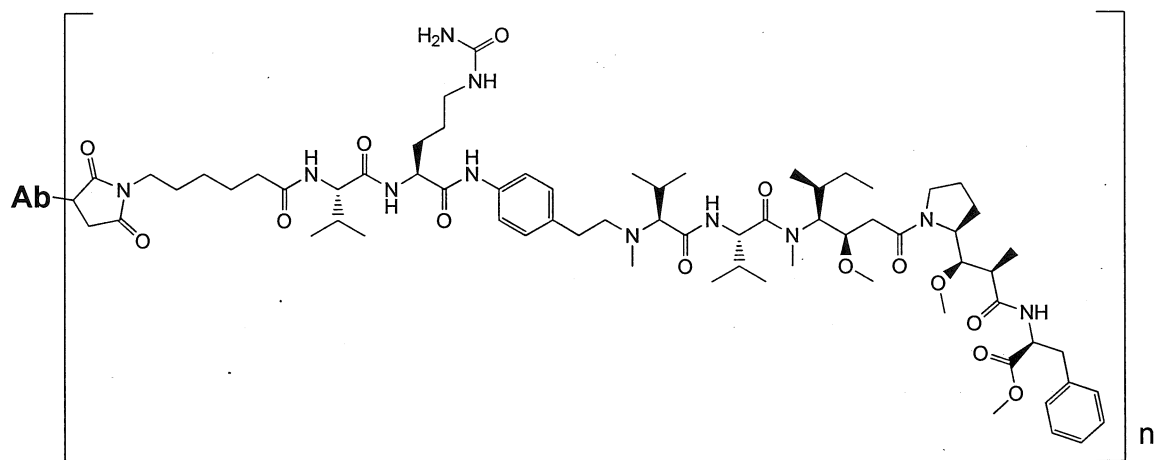
(Ab-G-15)

phần tử có công thức:



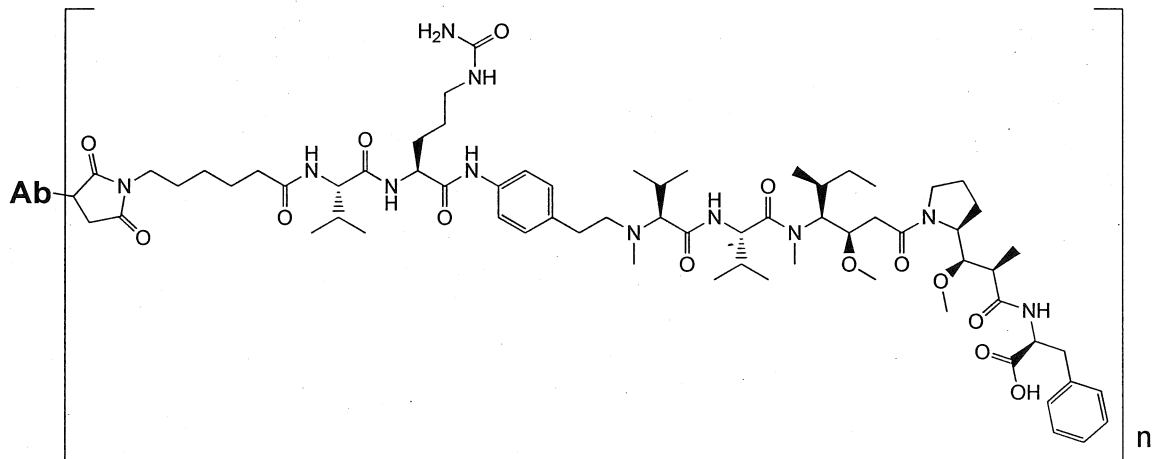
(Ab-F-61)

phần tử có công thức:



(Ab-F-62)

phần tử có công thức:



(Ab-F-63)

và các muối được dụng của nó,

trong đó **Ab** được chọn từ nhóm bao gồm các kháng thể 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 và 213B10.

15. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 14, trong đó Ab được chọn từ nhóm gồm:

- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 56 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 56 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 60;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 62 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 64 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 64 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 60;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 66 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;

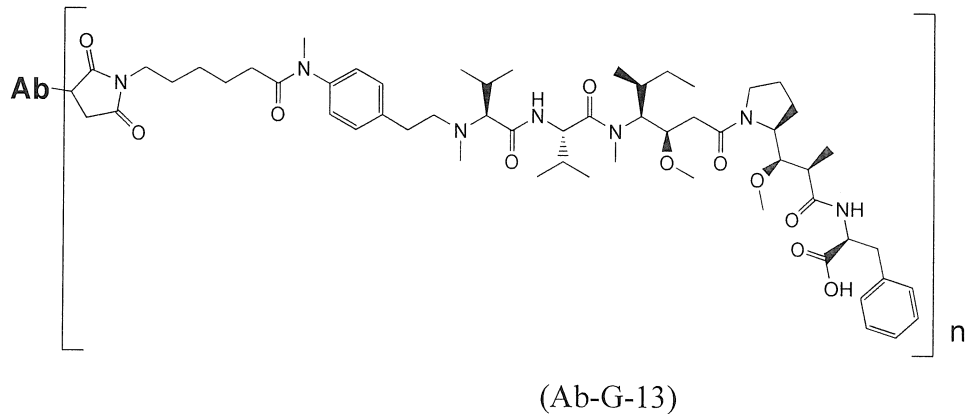
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 68 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 68 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 60;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 70 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 72 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 74 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 76 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 78 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 78 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 60; and
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 80 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57.

16. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 15, trong đó Ab được chọn từ nhóm gồm:

- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 58 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 58 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 61;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 63 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;

- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 65 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 65 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 61;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 67 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 69 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 69 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 61;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 71 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 73 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 75 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 77 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 79 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 79 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 61; và
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 81 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59.

17. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 14, trong đó thể tiếp hợp này có công thức sau:



trong đó Ab được chọn từ nhóm gồm:

- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 70 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 74 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57;
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 80 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 57; và
- kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 34 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 36.

18. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm 17, trong đó Ab được chọn từ nhóm gồm:

- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 71 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 75 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59;
- kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 81 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 59; và

– kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID No. 38 và chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID No. 40.

19. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó n bằng 2.

20. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm 1, trong đó n bằng 4.

21. Được phẩm chứa ít nhất một thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.

22. Được phẩm theo điểm 21, trong đó được phẩm này còn chứa tá được được dụng.

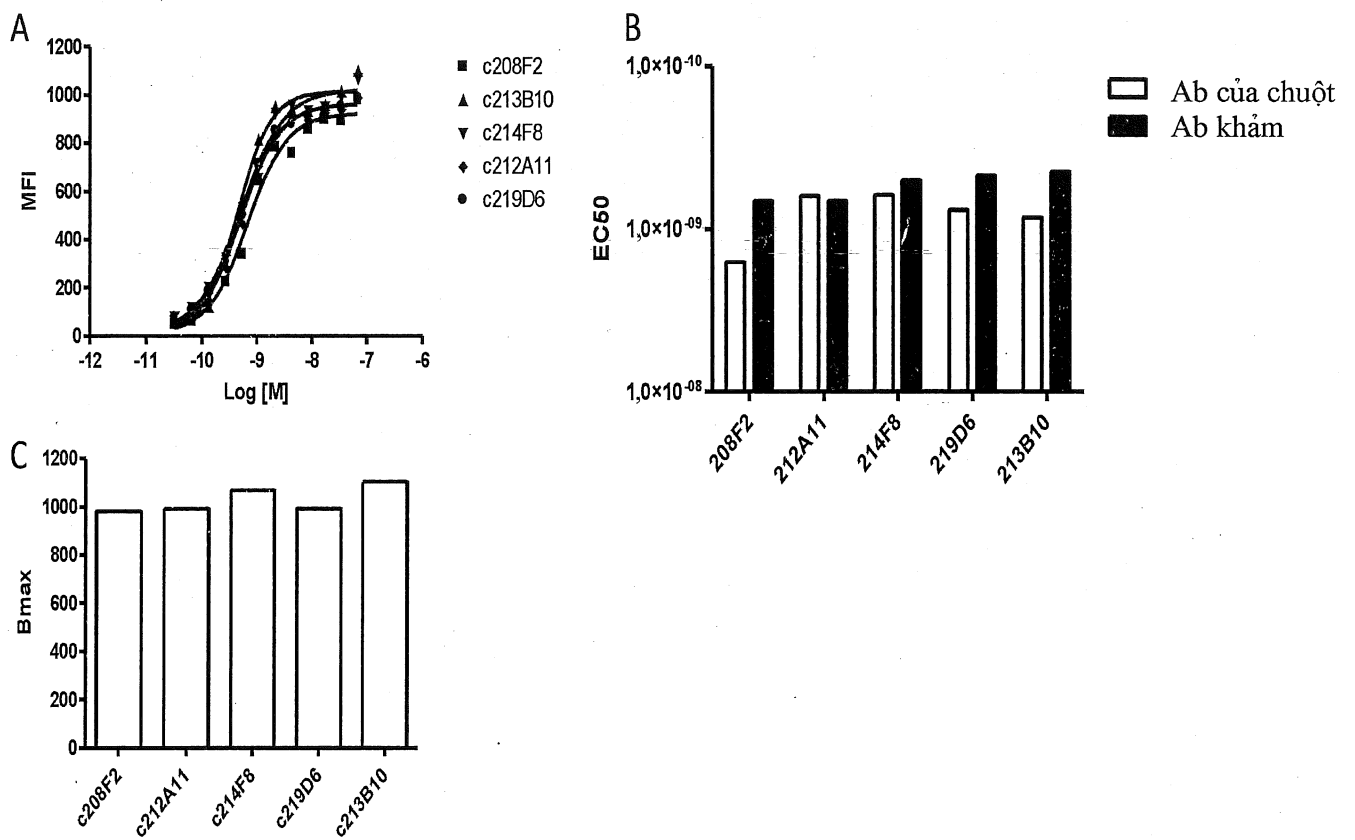


Fig.1

2 / 25

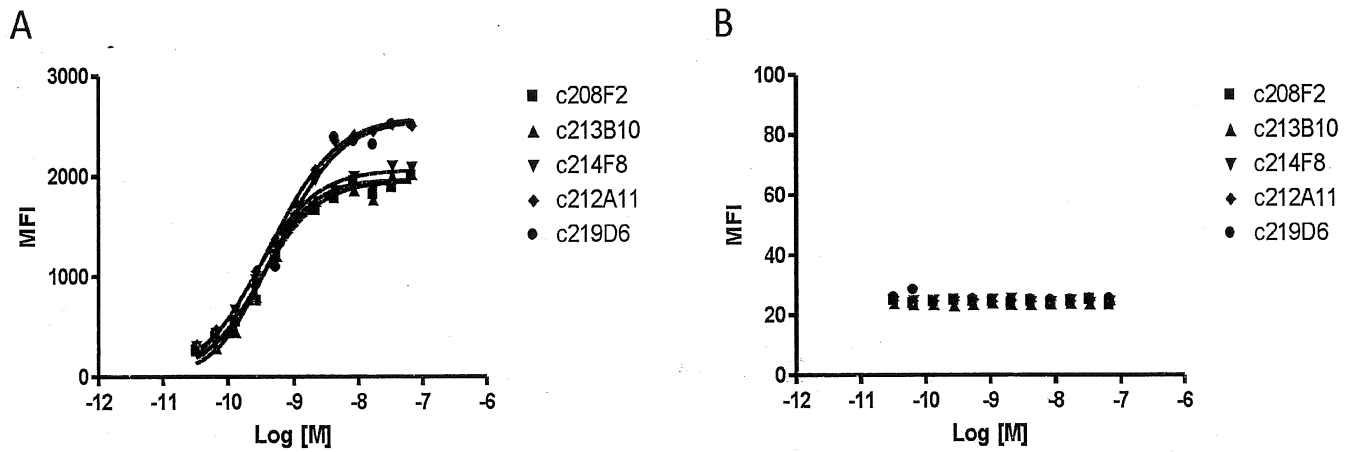


Fig.2

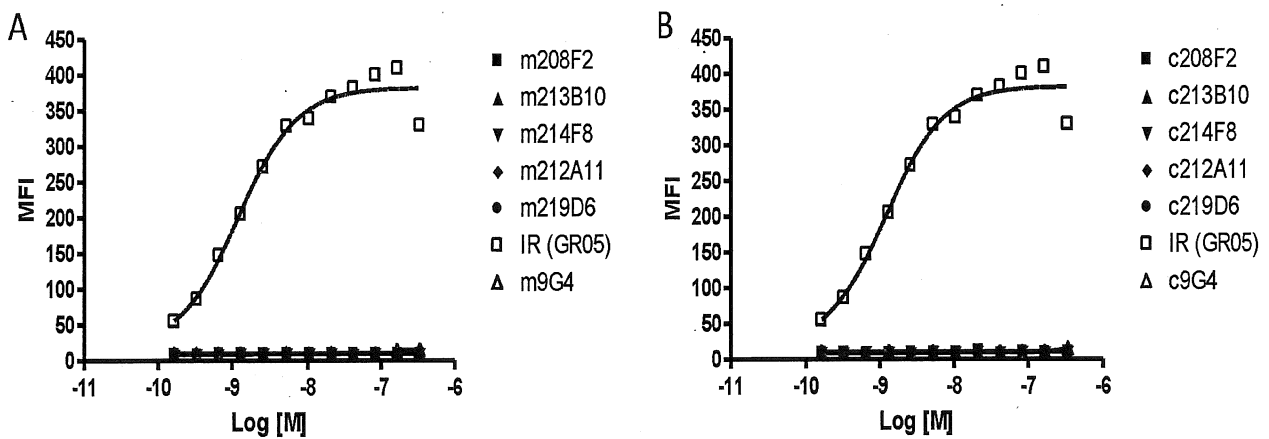


Fig.3

3 / 25

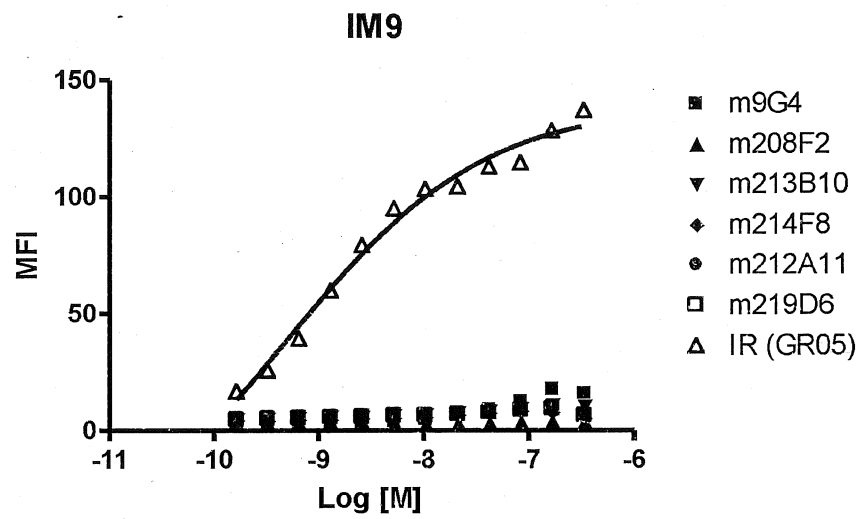


Fig.4

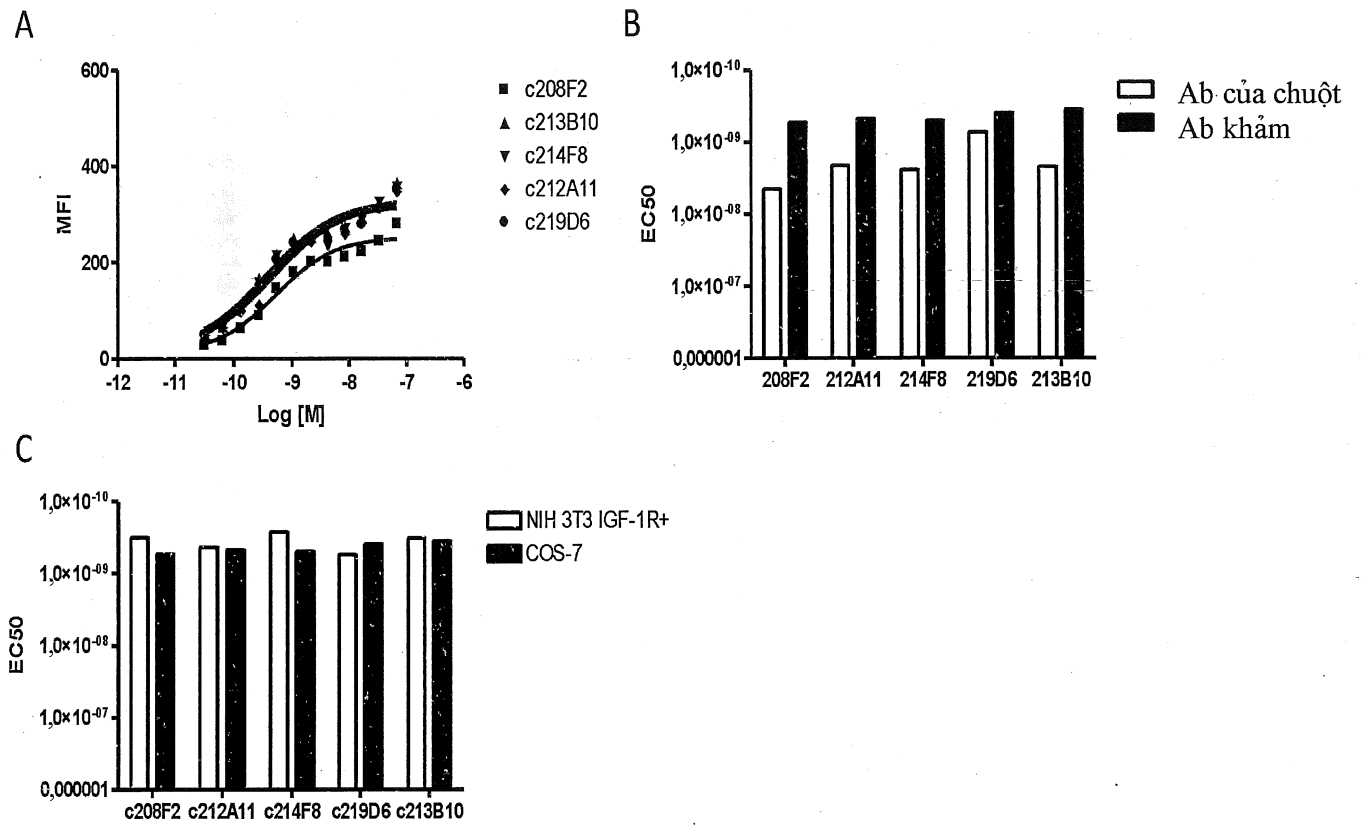


Fig.5

5 / 25

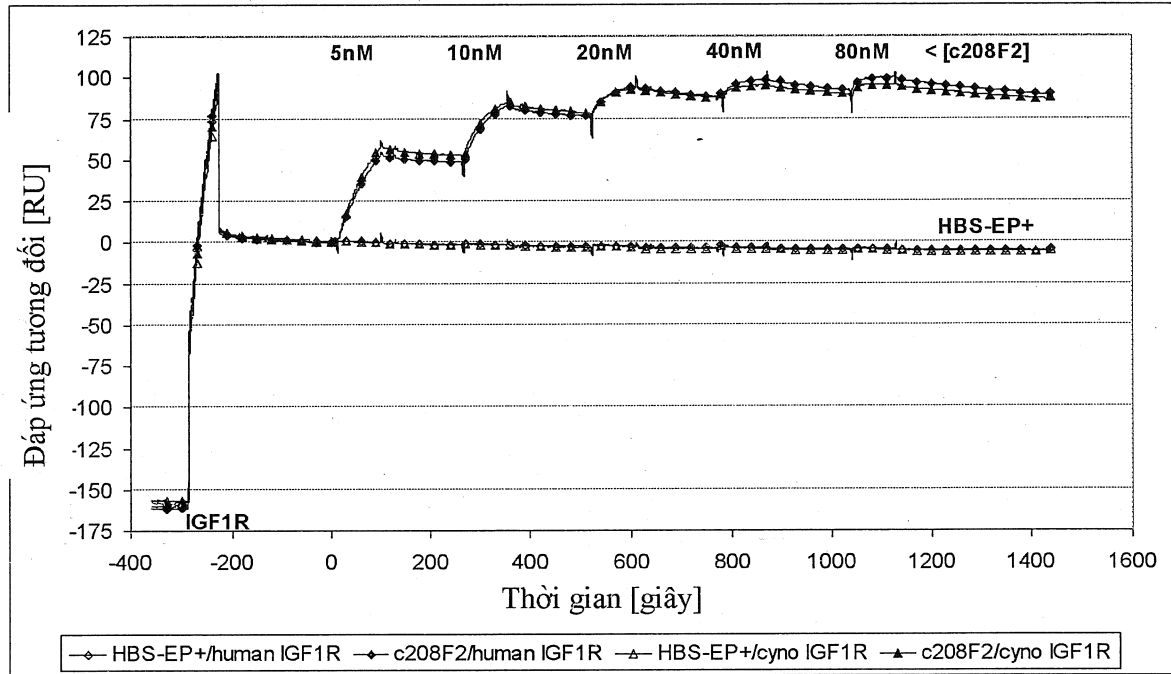


Fig.6

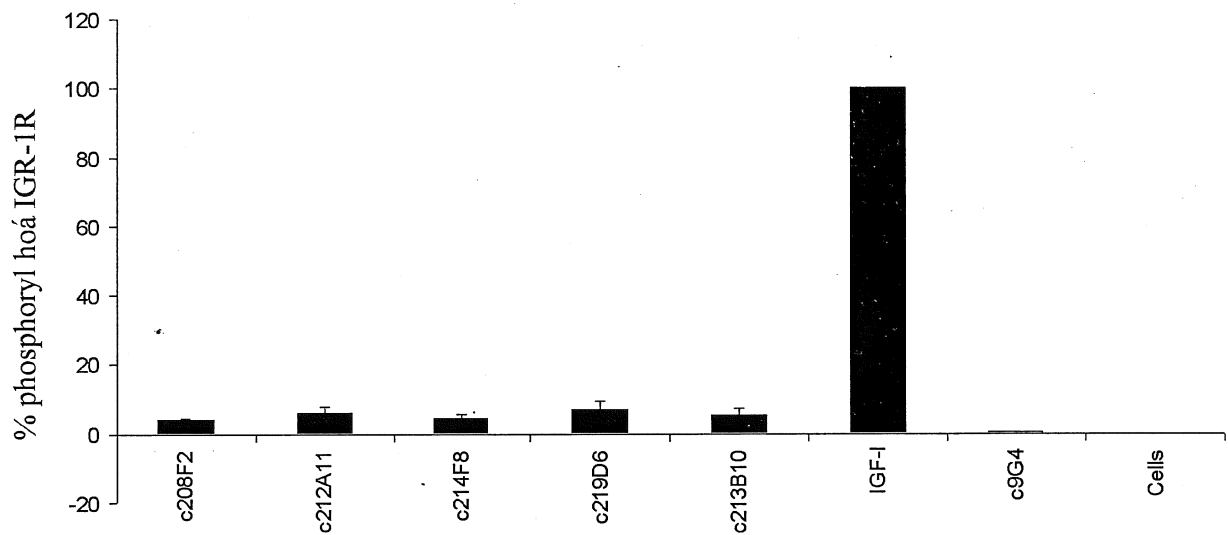


Fig.7

6 / 25

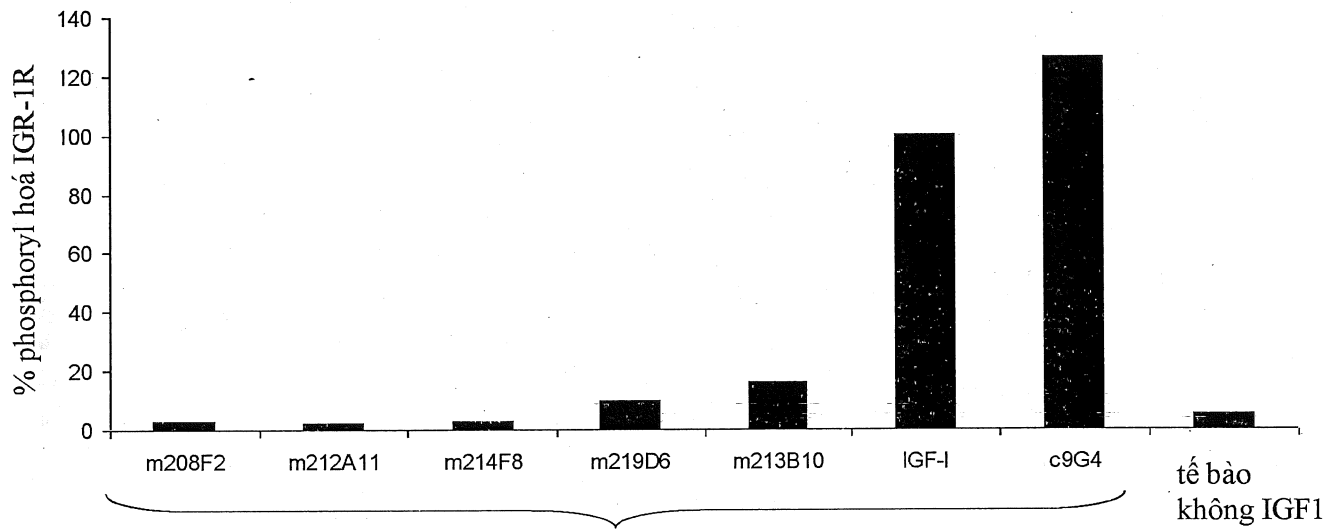


Fig.8

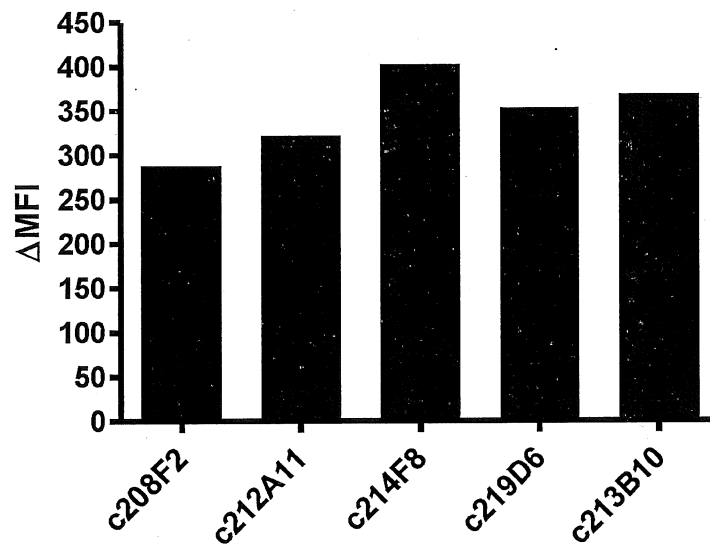
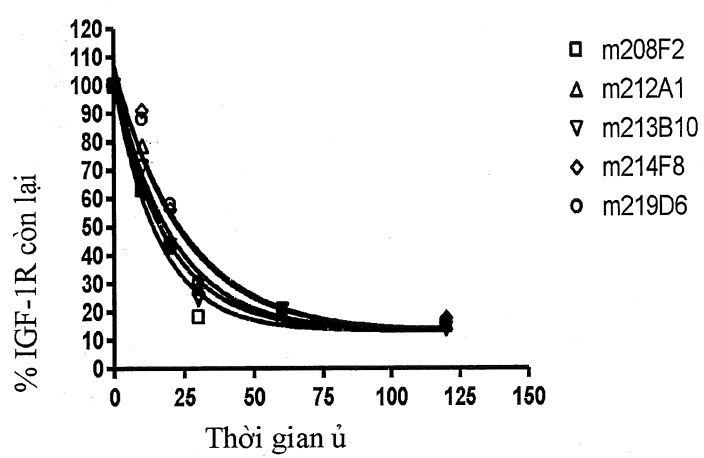


Fig.9

A



B

Abs	HalfLife (t _{1/2})
m208F2	11,11
m212A11	14,3
m214F8	16,81
m219D6	17,85
m213B10	12,83

Fig.10

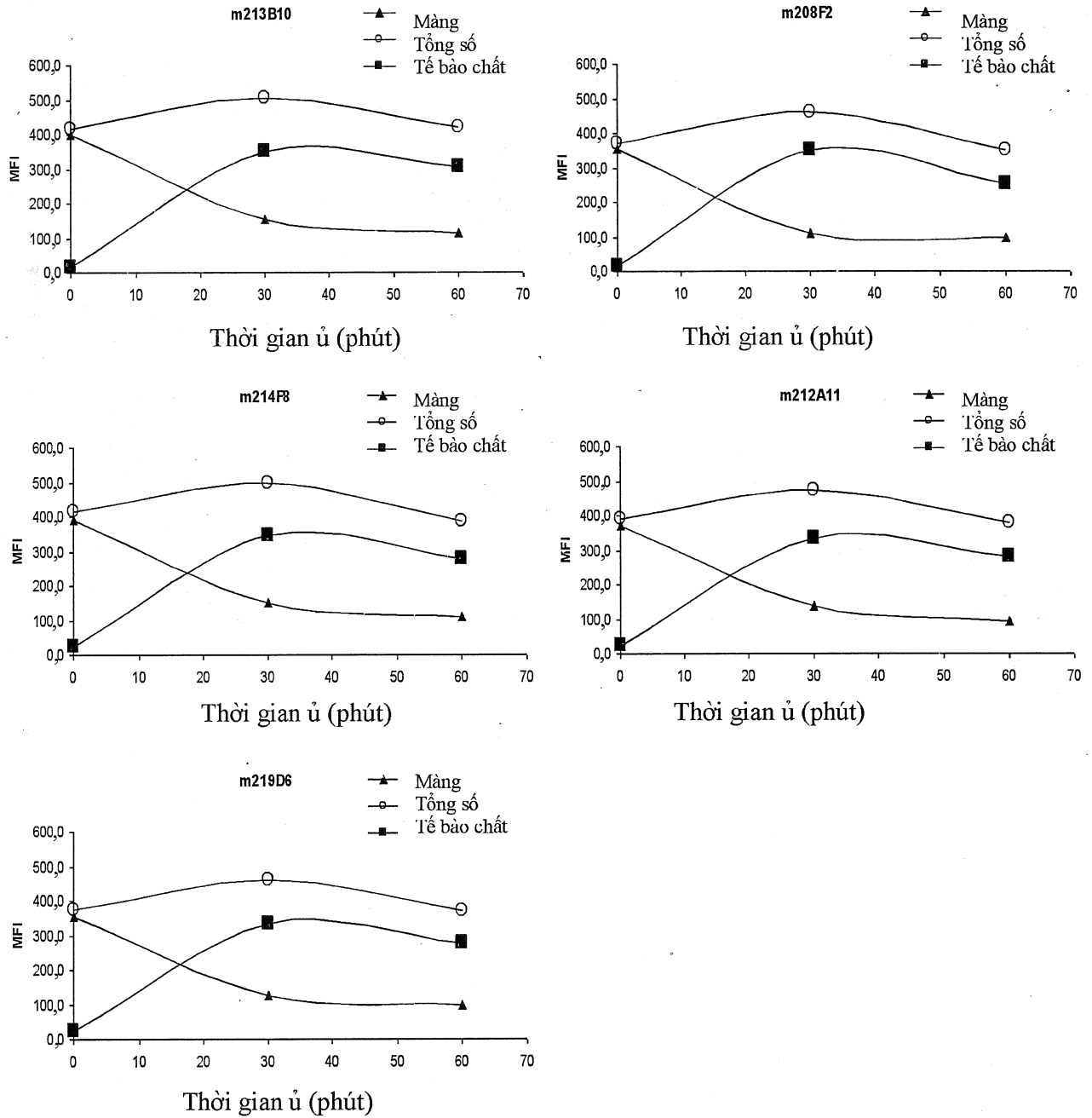


Fig.11

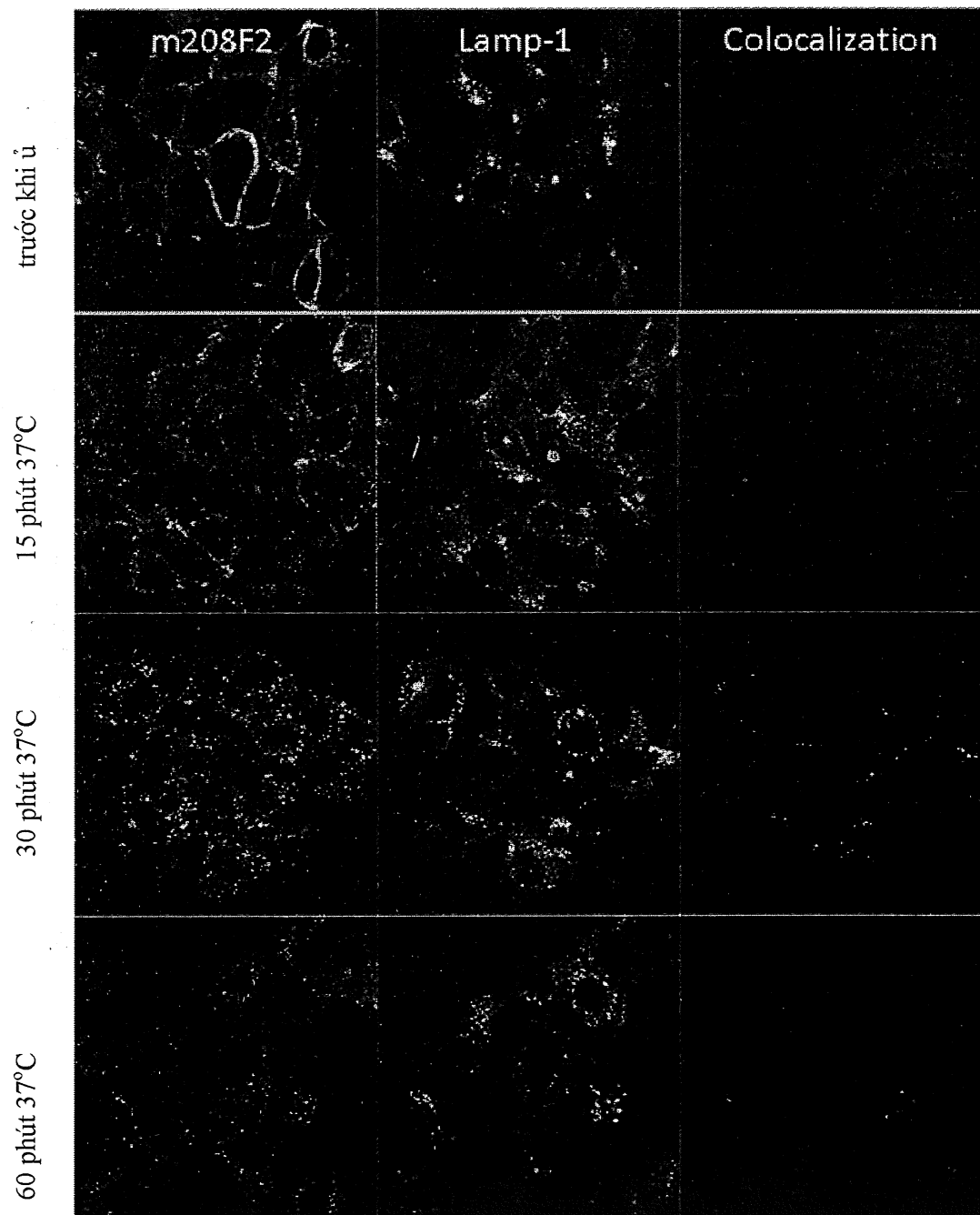


Fig.12A

10 / 25

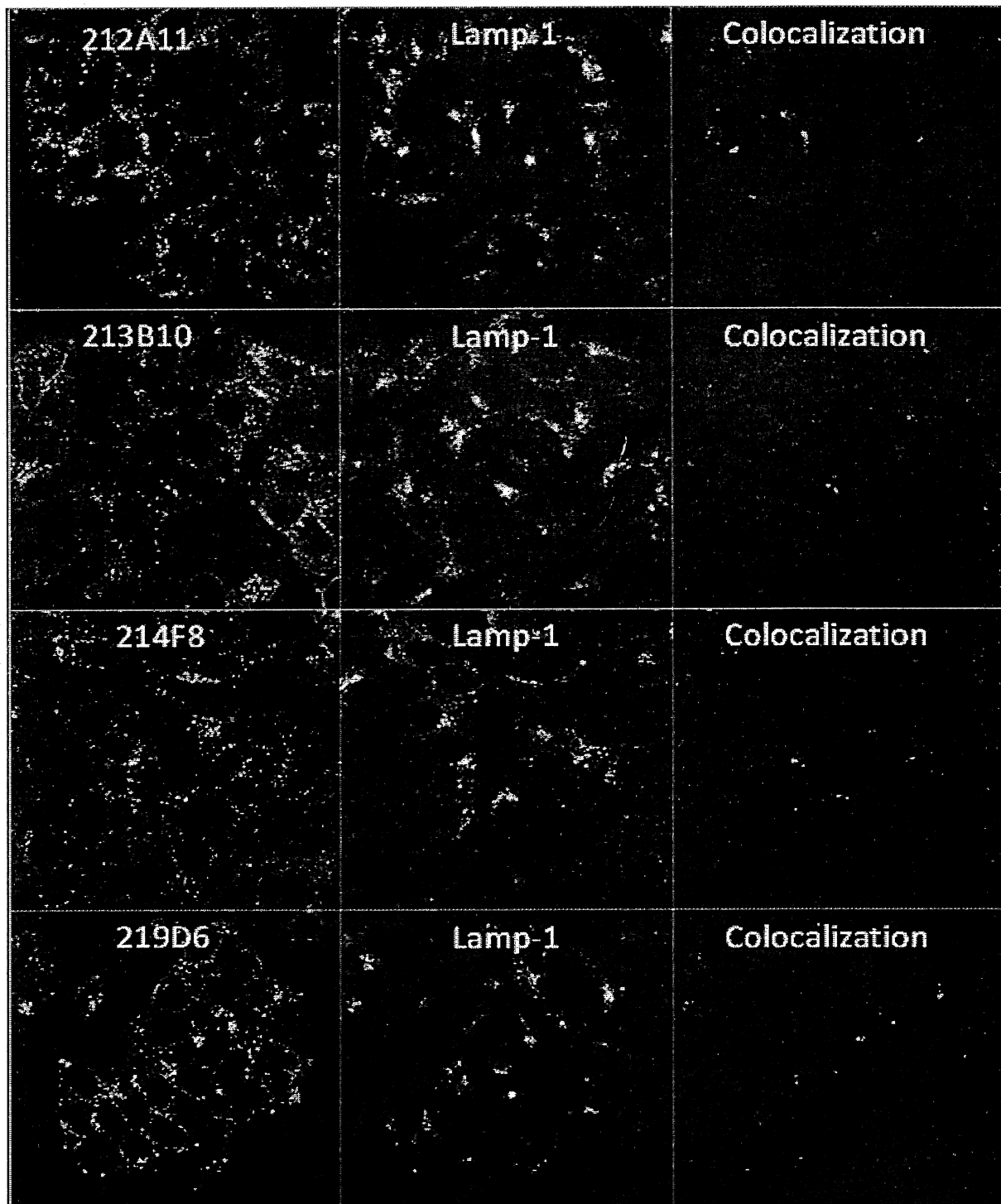


Fig.12B

11 / 25

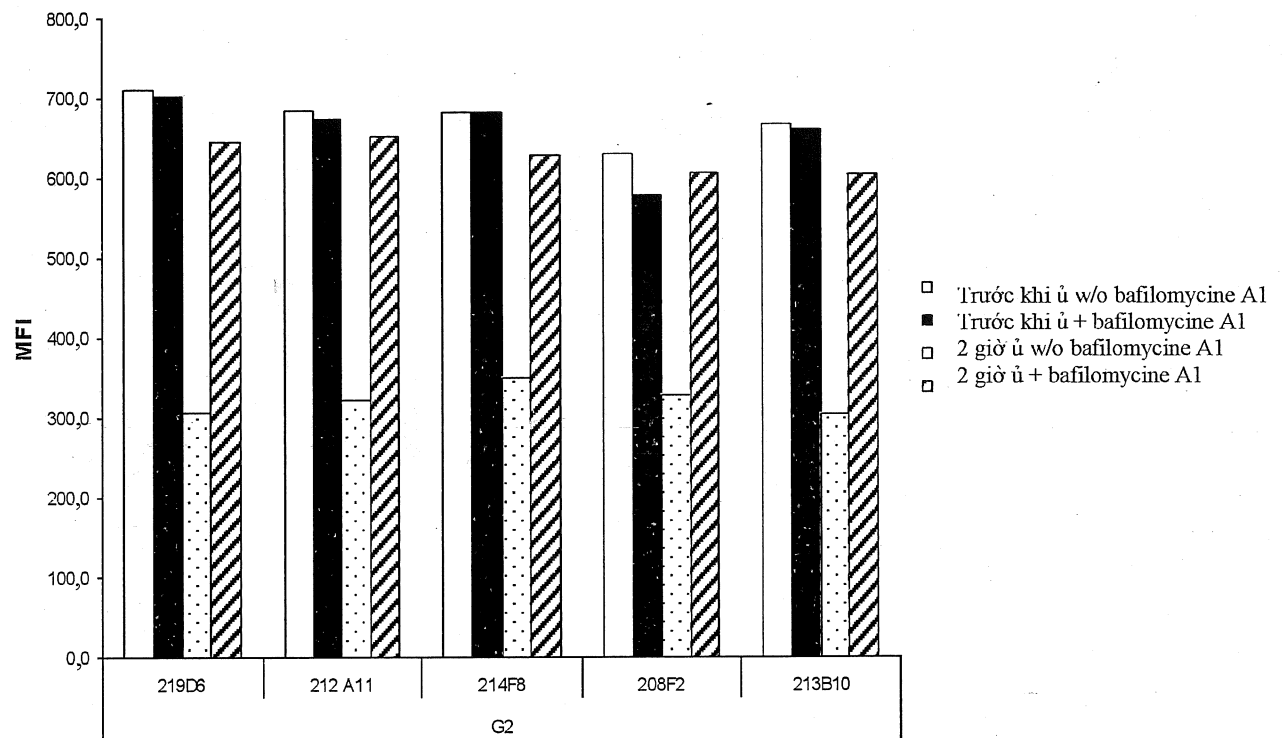


Fig.13

12 / 25

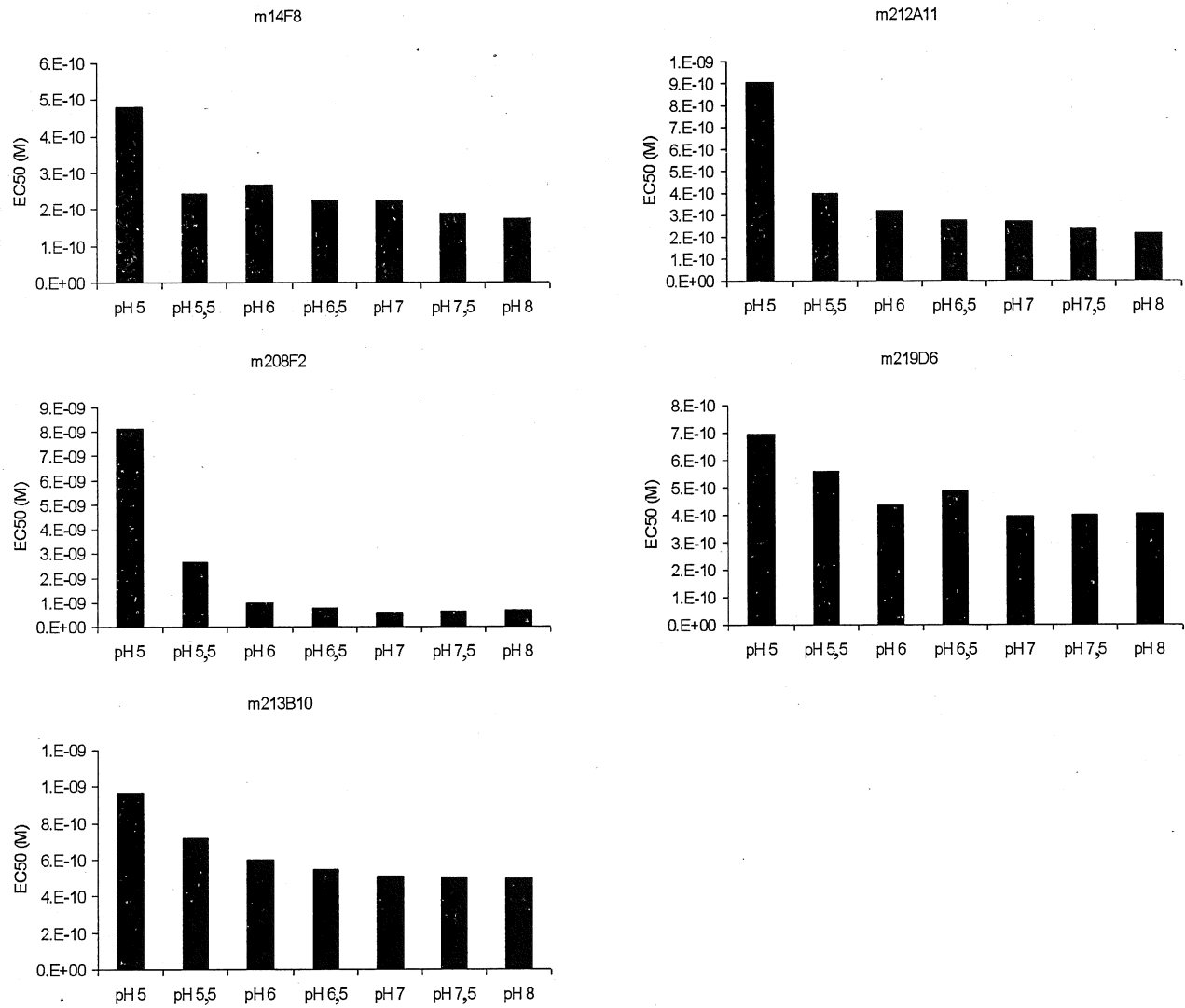


Fig.14

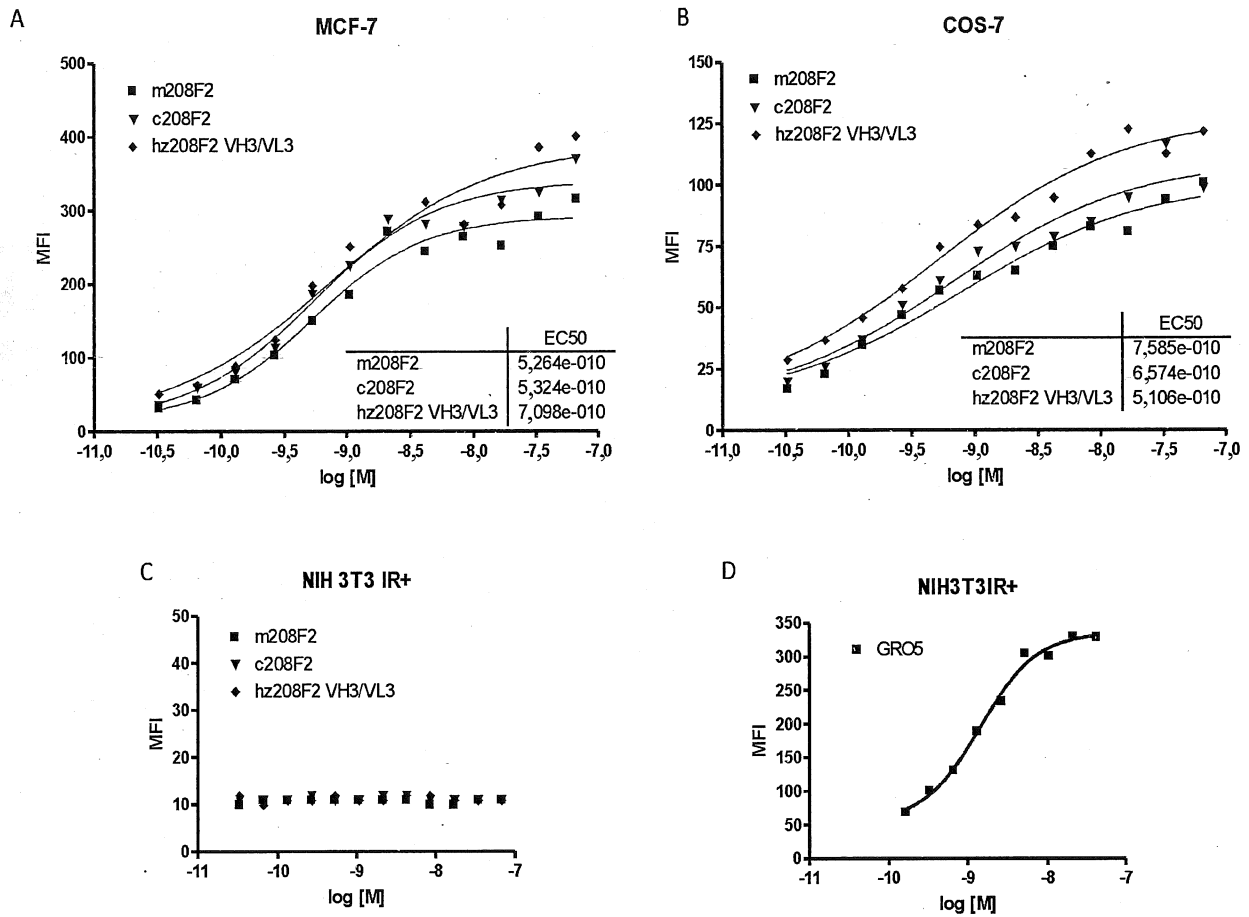


Fig.15

14 / 25

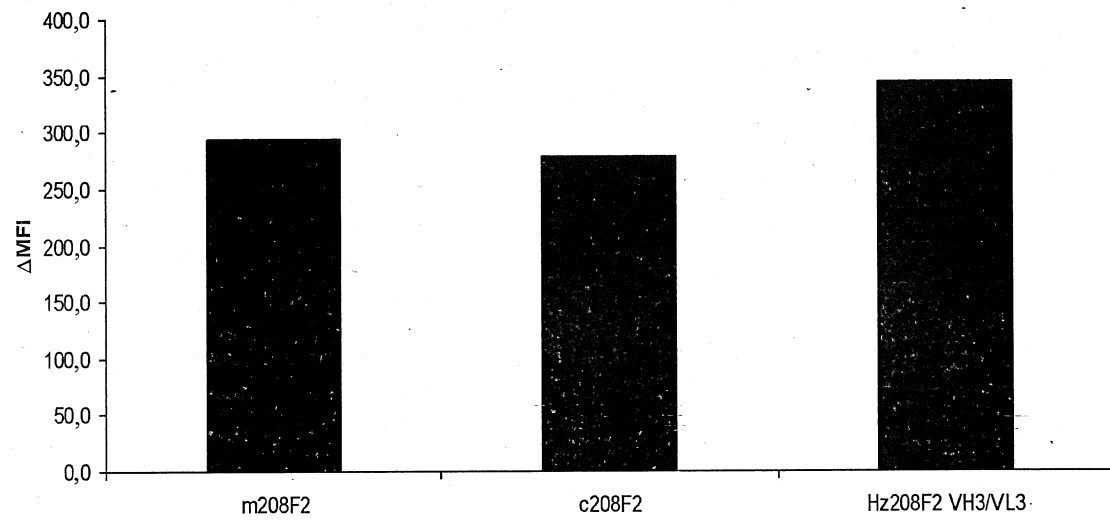


Fig.16

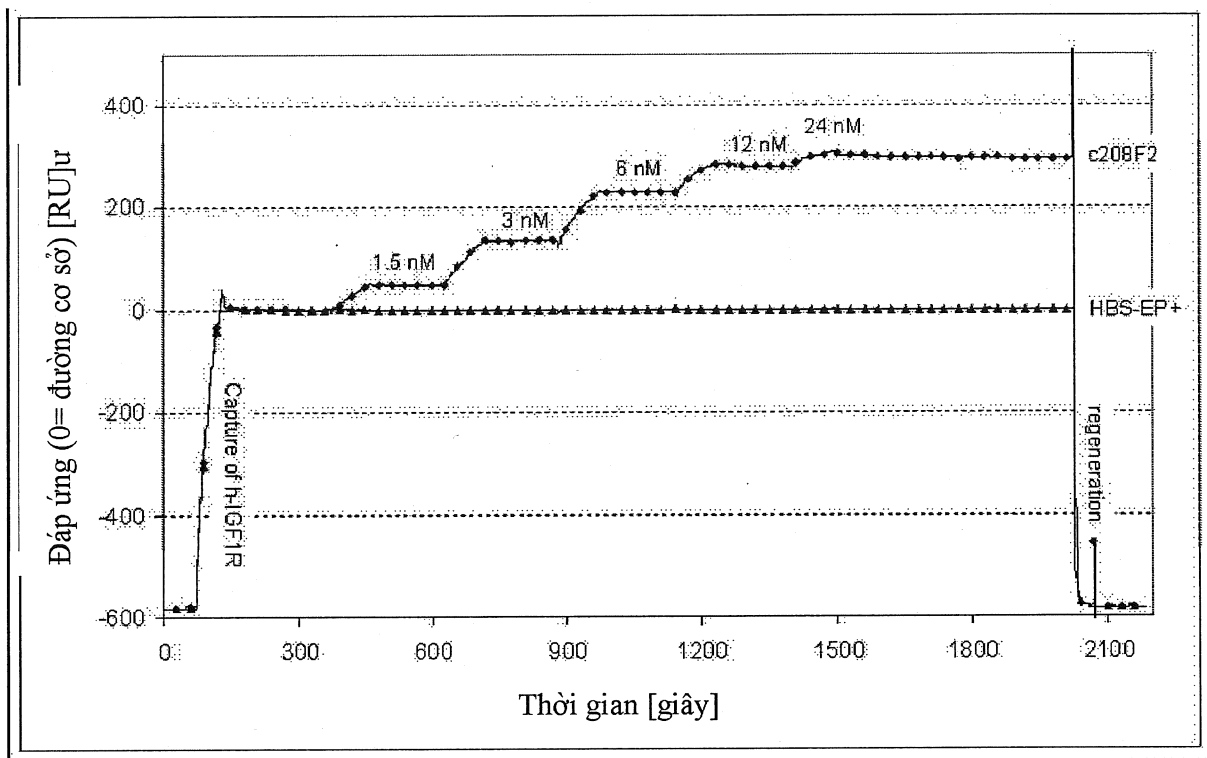


Fig.17

15 / 25

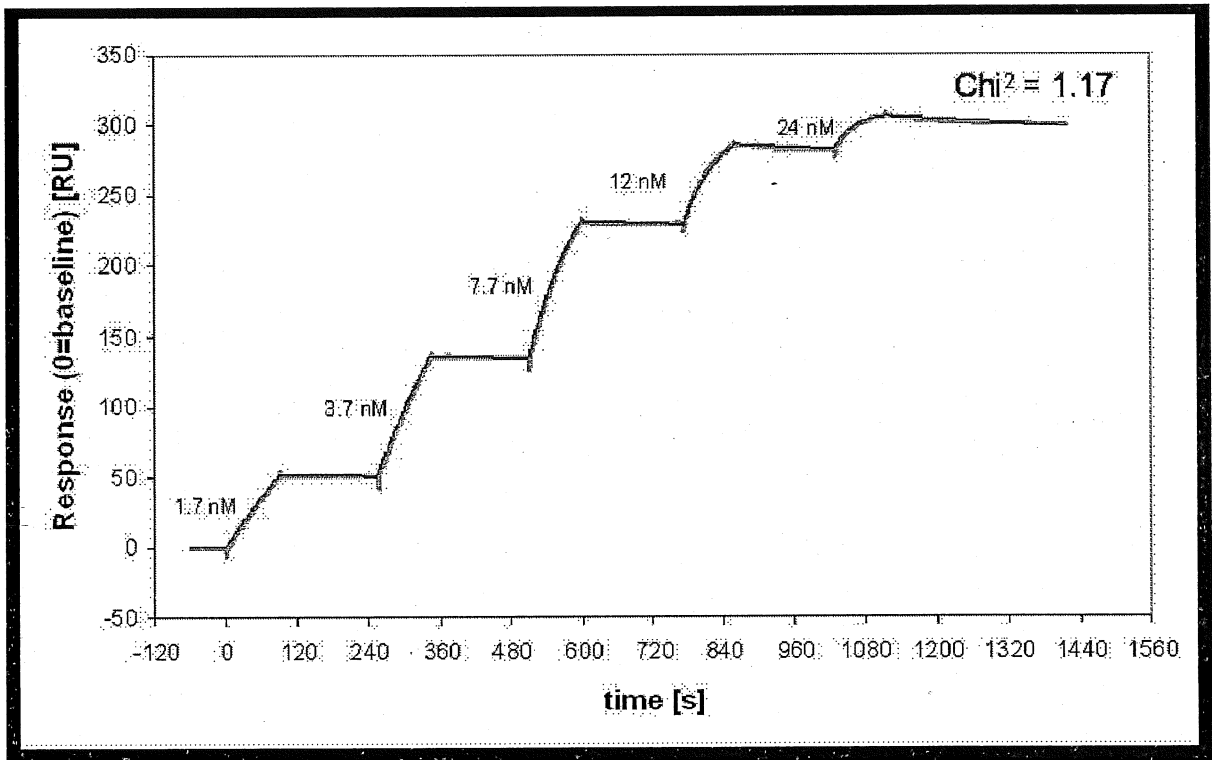


Fig.18

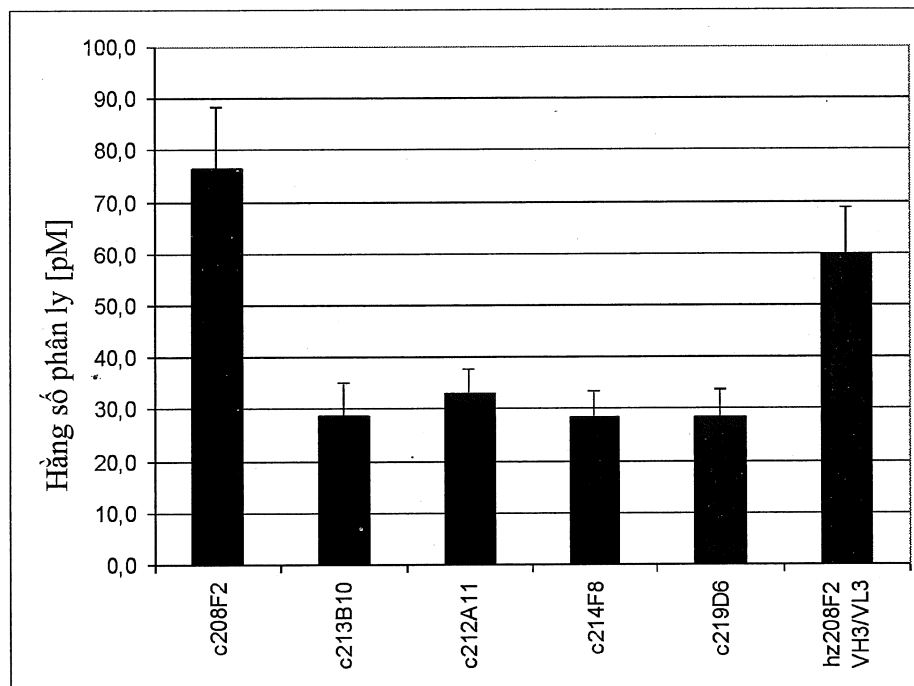


Fig.19

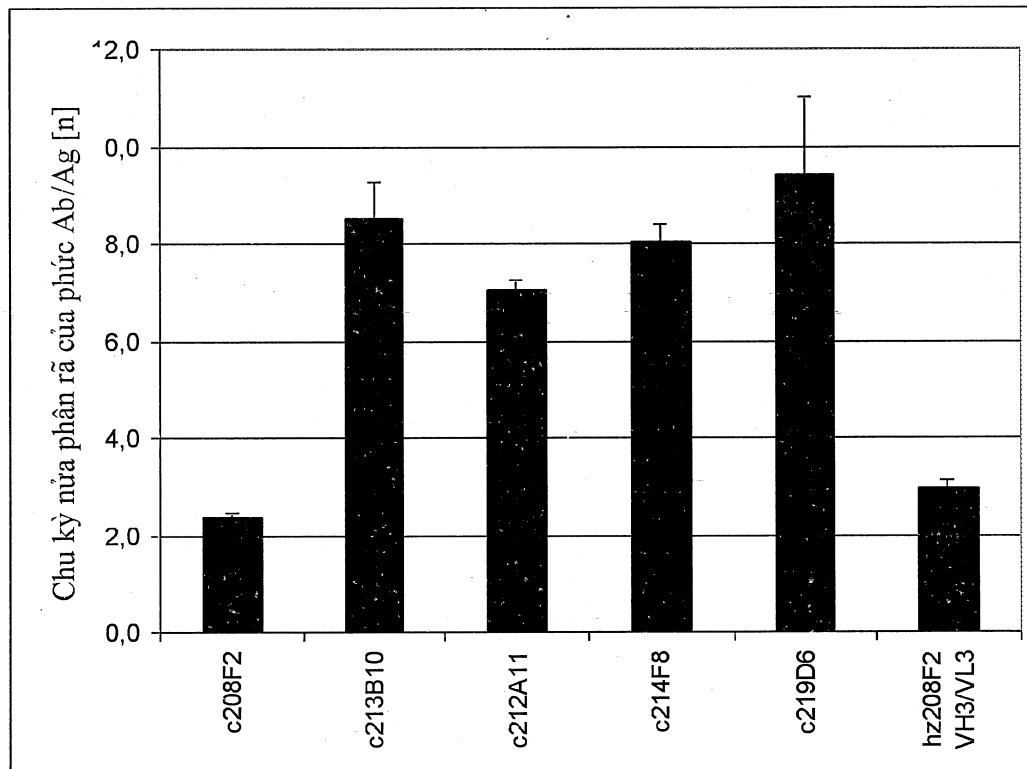


Fig.20

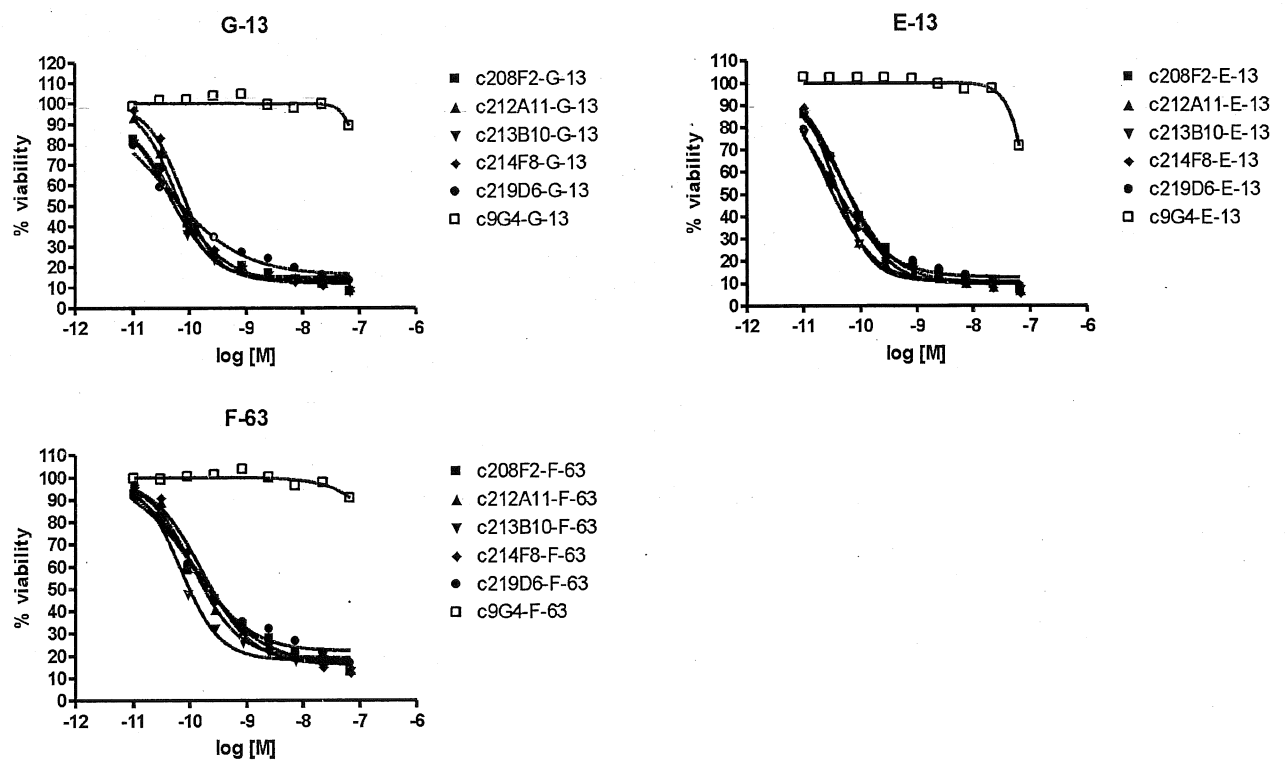


Fig.21

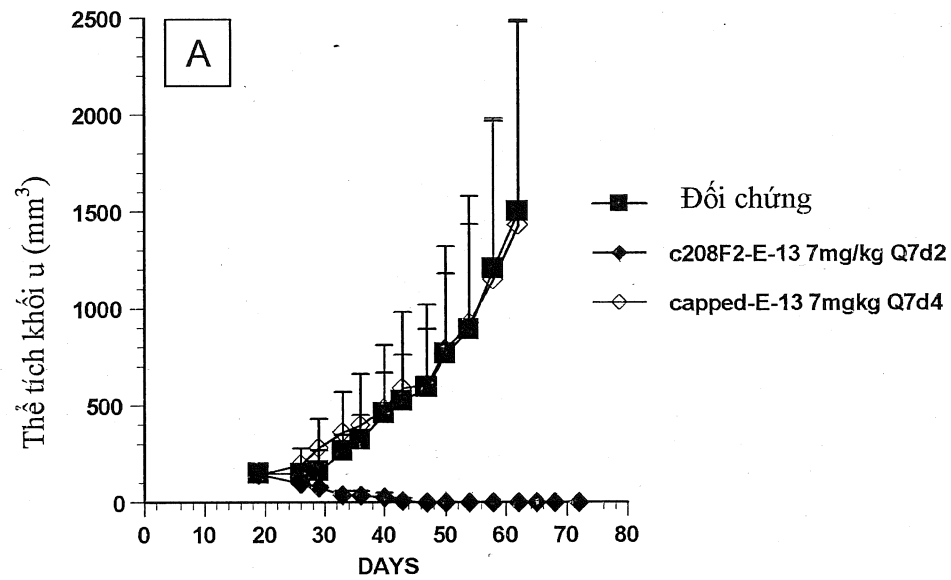


Fig.22A

19 / 25

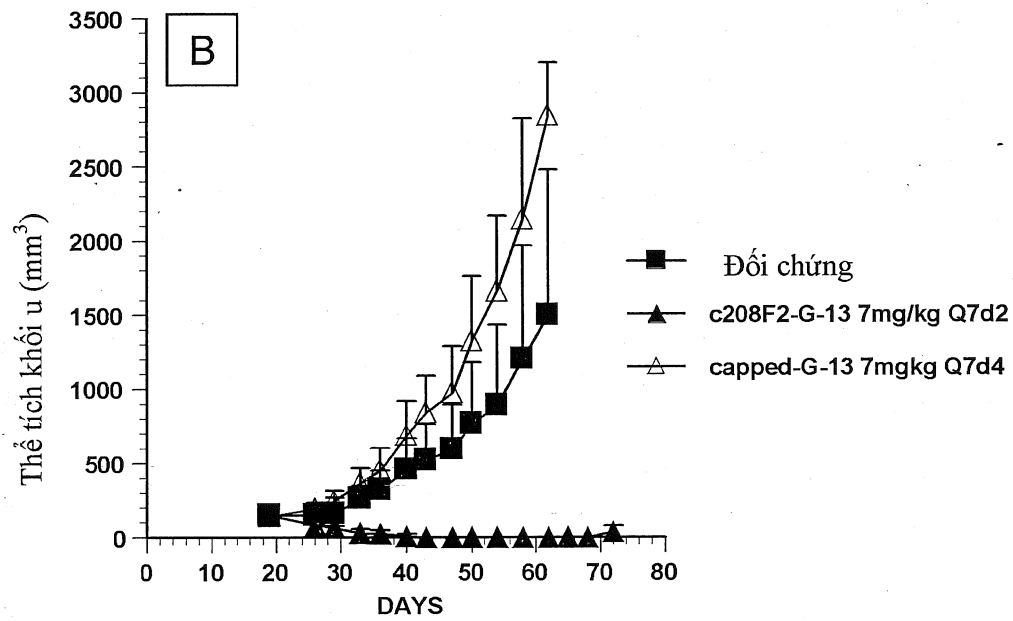


Fig.22B

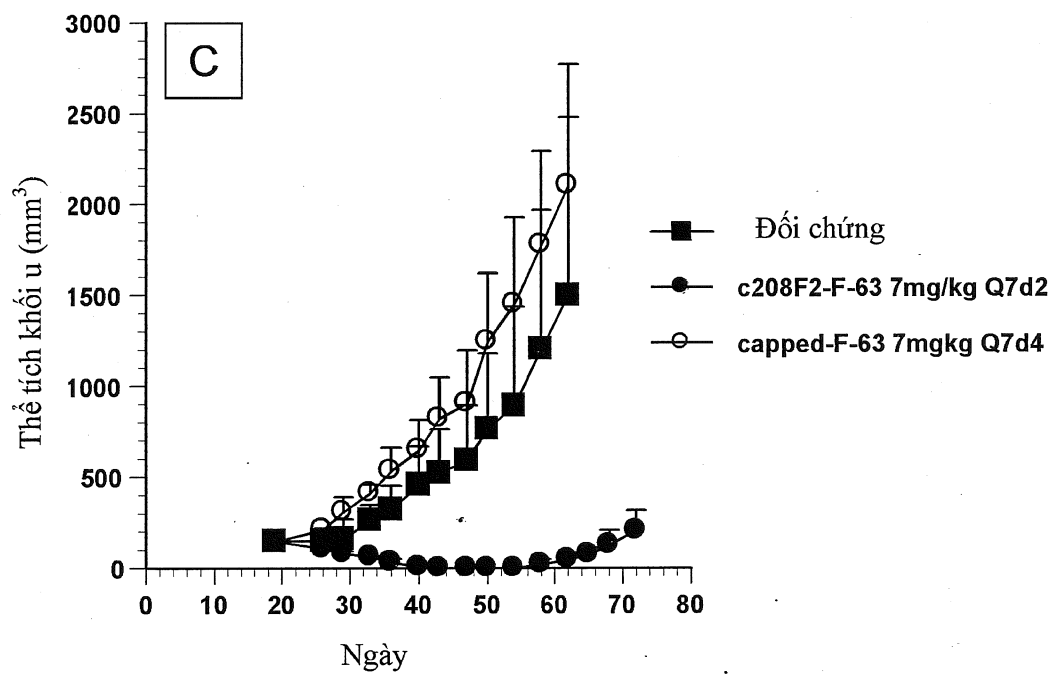


Fig.22C

20 / 25

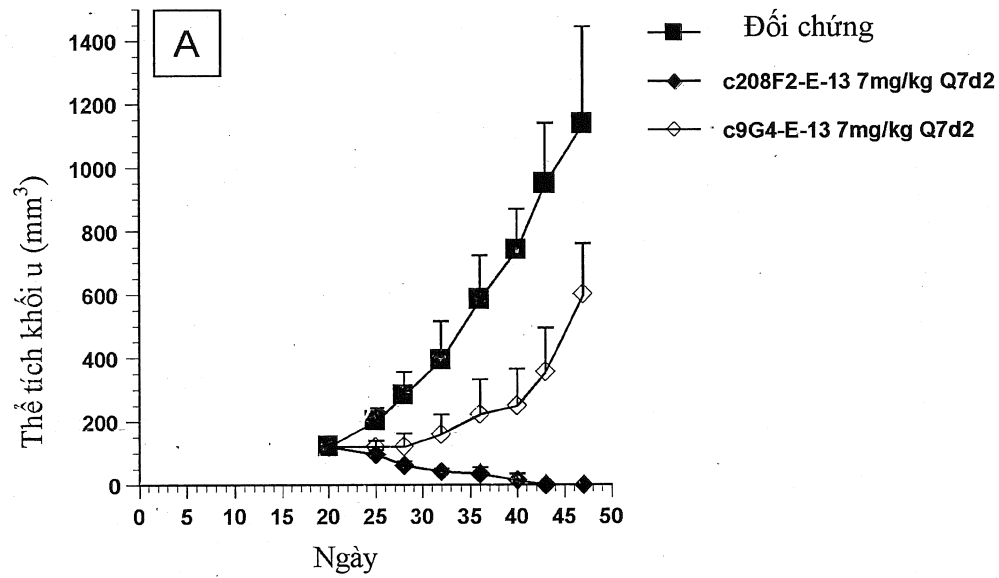


Fig.23A

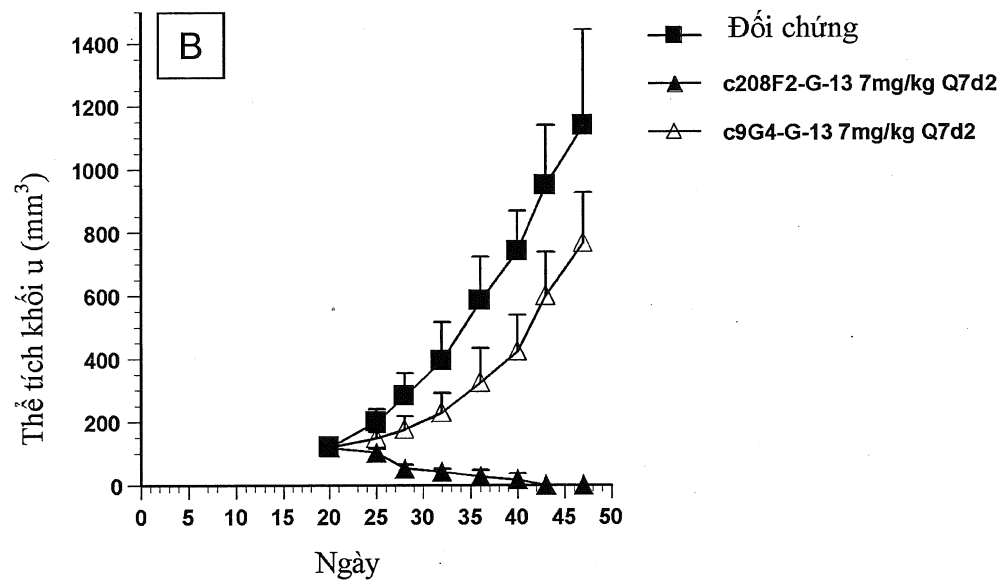


Fig.23B

21 / 25

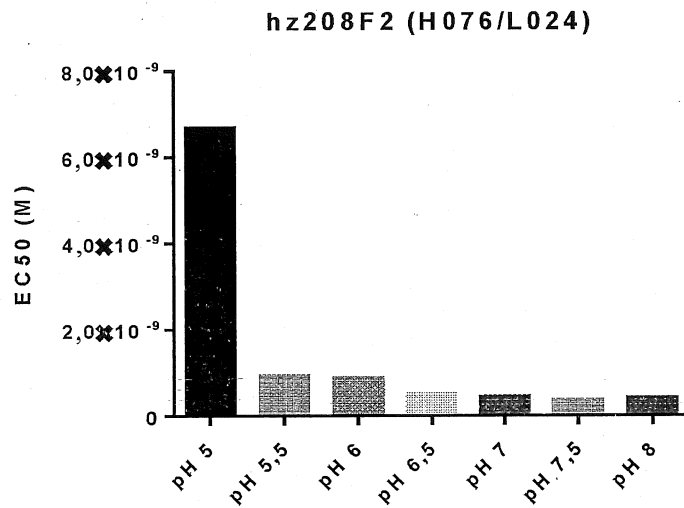


Fig.24A

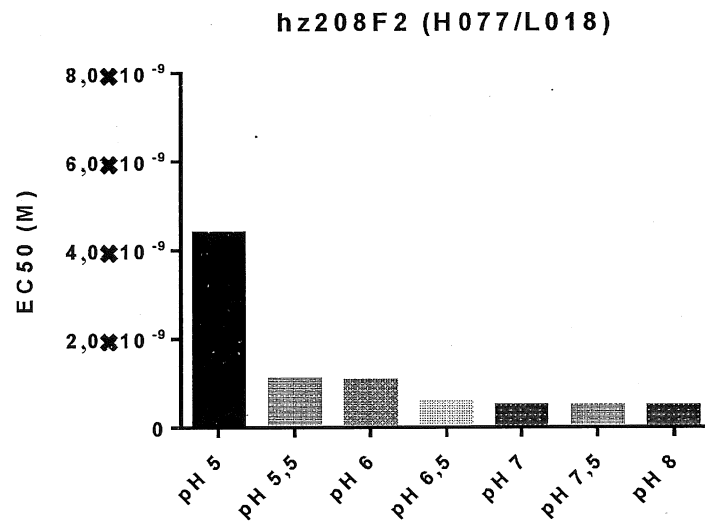


Fig.24B

22 / 25

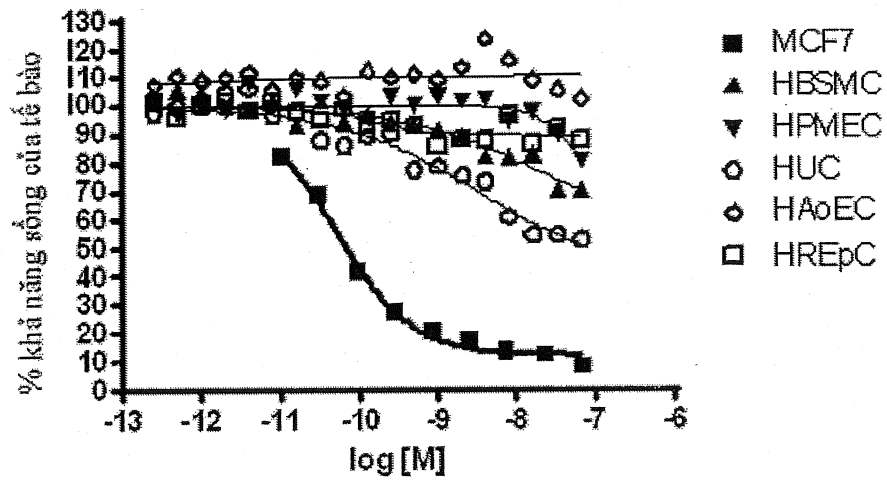


Fig.25

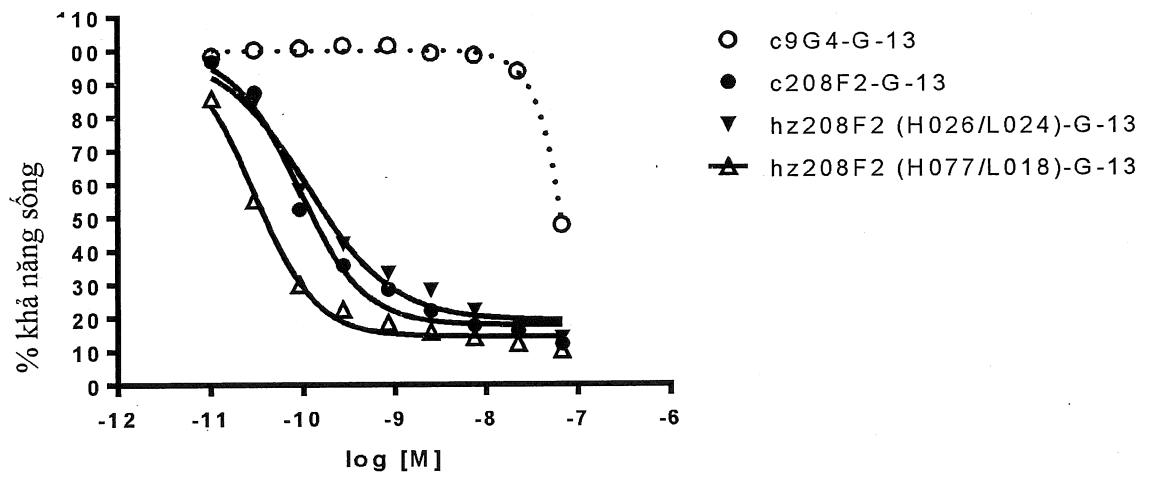


Fig.26

23 / 25

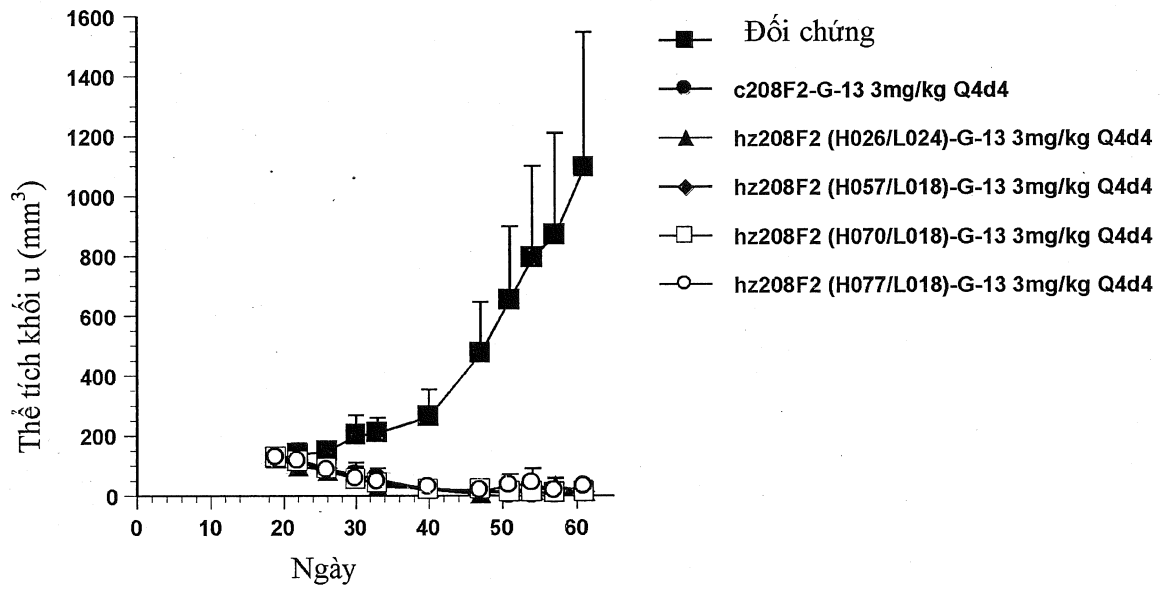


Fig.27

24 / 25

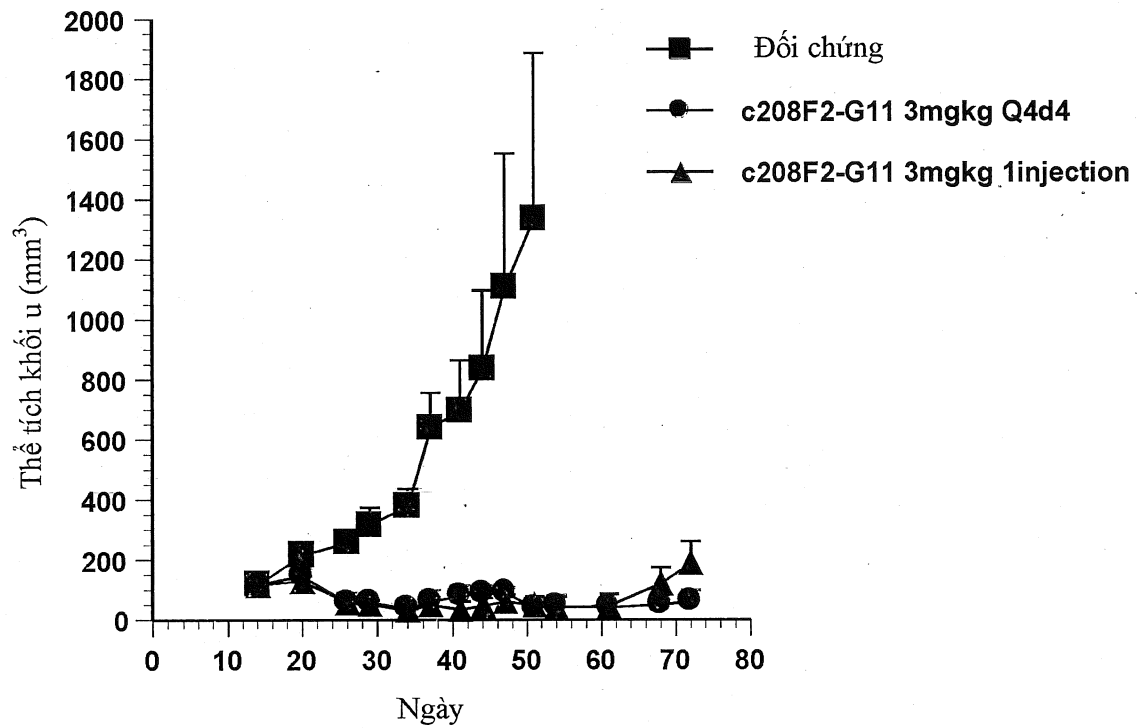


Fig.28A

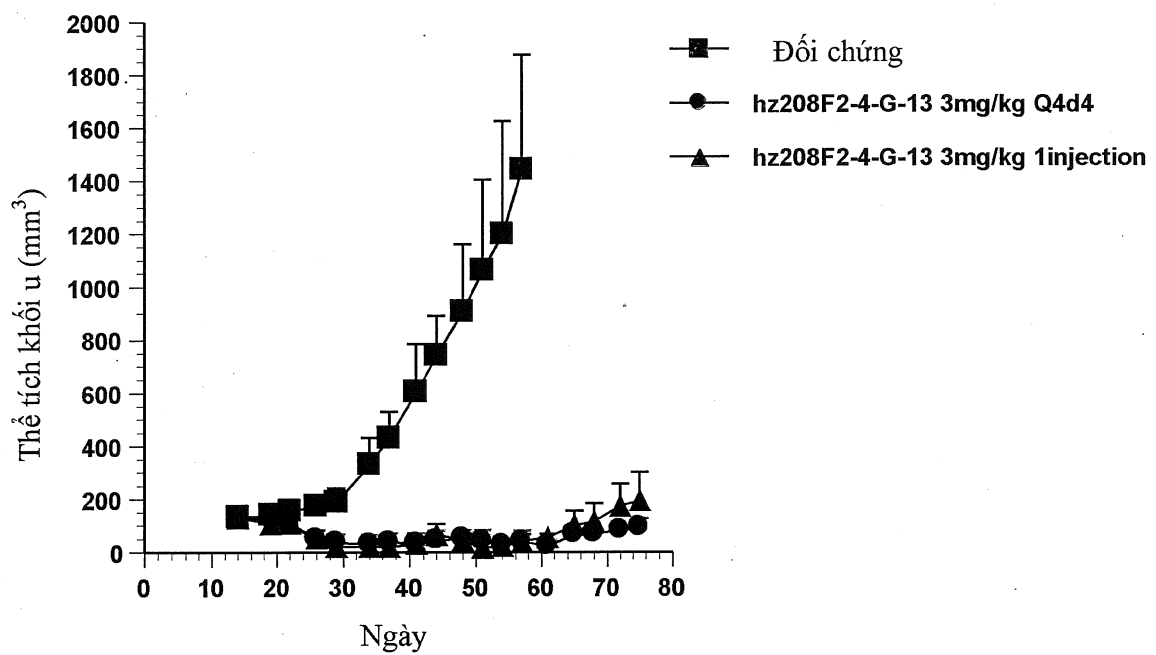


Fig.28B

25 / 25

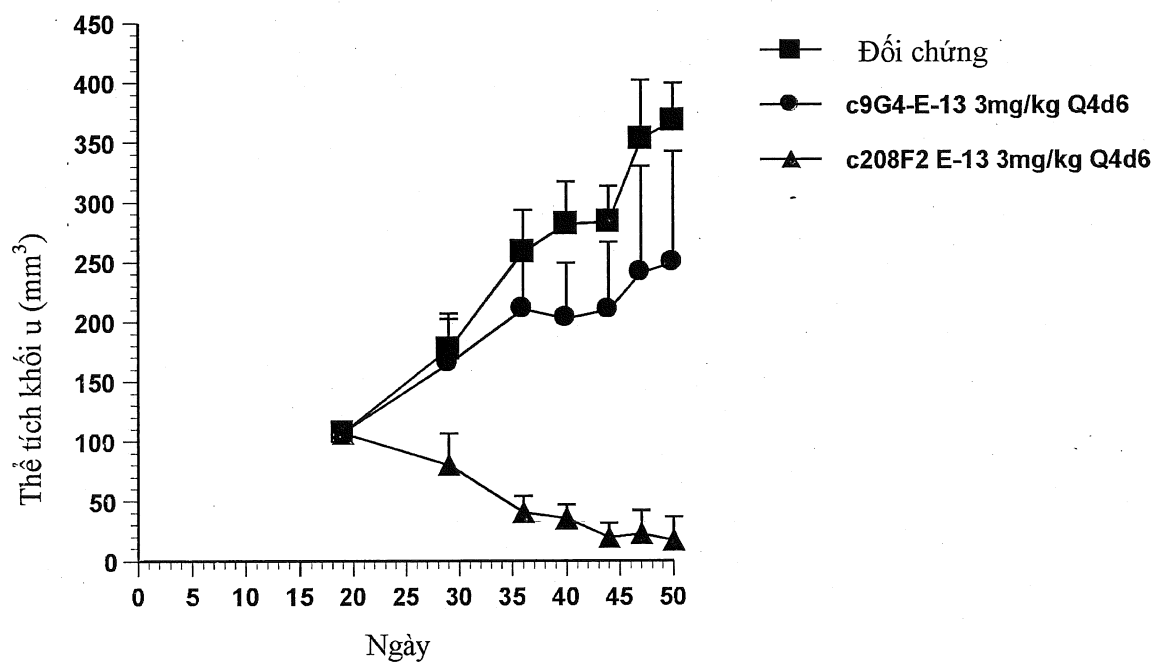


Fig.29A

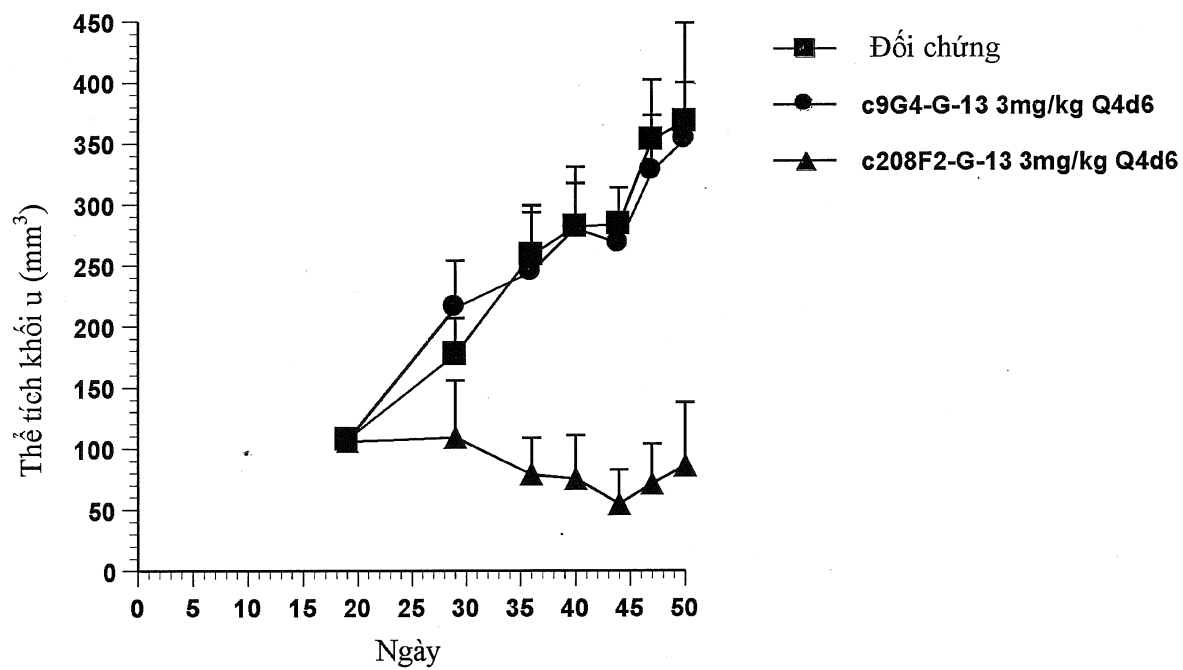


Fig.29B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
 <120> THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT CÓ KHẢ NĂNG GẮN KẾT VỚI
 IGF-1R VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY
 <130> D33593
 <140> PCT/EP2015/059045
 <141> 2015-04-27
 <150> EP14305620.8
 <151> 2014-04-25
 <160> 81
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR -H1 thống nhất
 <220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (3)..(3)
 <223> Thr có thể được thay thế bằng Ser
 <220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (8)..(8)
 <223> Tyr có thể được thay thế bằng Phe
 <400> 1
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> CDR-H2 thống nhất
 <400> 2
 Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr
 1 5

<210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H3 thống nhất

<400> 3

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L1 thống nhất

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (4)..(4)
 <223> Ser có thể được thay thế bằng Asn

<400> 4

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L2 thống nhất

<400> 5

Tyr Thr Ser
 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L3 thống nhất

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (5)..(5)
 <223> Thr có thể được thay thế bằng Ala

<400> 6.

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H1

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-H1

<400> 8

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Phe
 1 5

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L1

<400> 9

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

1

5

<210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L1

<400> 10

Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L3

<400> 11

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CDR-L3

<400> 12

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> c208F2, chuỗi nặng, VH

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> c212A11, chuỗi nặng, VH

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> c214F8, chuỗi nặng, VH

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> c219D6, chuỗi nặng, VH

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> c213B10, chuỗi nặng, VH

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c208F2, chuỗi nhẹ, VL

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c212A11, chuỗi nhẹ, VL

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> c214F8, chuỗi nhẹ, VL

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> c219D6, chuỗi nhẹ, VL

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c213B10, chuỗi nhẹ, VL

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 23

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c208F2, chuỗi nặng, đủ chiều dài

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c212A11, chuỗi nặng, đủ chiều dài

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Ser 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 25

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c214F8, chuỗi nặng, đủ chiều dài

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
		35					40					45					
Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Arg	Phe		
	50					55					60						
Lys	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr		
	65				70					75					80		
Met	Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys		
				85					90					95			
Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
Gly	Ala	Ser	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	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
	210					215					220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
	225				230					235					240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
				245					250					255			

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 26
<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c219D6, chuỗi nặng, đủ chiều dài

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Ser 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 27

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c213B10, chuỗi nặng, đủ chiều dài

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Ser 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 28

<211> 214

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c208F2, chuỗi nhẹ, đủ chiều dài

<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c212A11, chuỗi nhẹ, đủ chiều dài

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 30
<211> 214
<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c214F8, chuỗi nhẹ, đủ chiều dài

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> c219D6, chuỗi nhẹ, đủ chiều dài

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210>	32
<211>	214
<212>	PRT
<213>	nhân tạo

<220>
<223> c213B10, chuỗi nhẹ, đủ chiều dài

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 33
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> hz208F2 (var.1) chuỗi nặng, VH

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 (var. 3), VH

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> hz208F2 (var. 1), VL

<400> 35

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 Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly 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 Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> hz208F2 (var.3), VL

<400> 36

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 (var. 1), chuỗi nặng, đủ chiều dài

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 38

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 (var.3), chuỗi nặng đủ chiều dài

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30
Tyr	Ile	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45
Gly	Trp	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	50	55	60
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	65	70	75
Met	Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	85	90	95
Ala	Ser	Pro	Met	Ile	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130	135	140
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	195	200	205
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	210	215	220
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	225	230	235
																240		

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 39
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 (var. 1), chuỗi nhẹ, đủ chiều dài

<400> 39.

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	Ile	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	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	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		

Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			

Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				

Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160

Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 (var.3), chuỗi nhẹ, đủ chiều dài

<400> 40

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 41
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> hz208F2 (var.2) chuỗi nặng, VH

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (20)..(20)
 <223> Met có thể được thay thế bằng Val

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (34)..(34)
 <223> Ile có thể được thay thế bằng Met

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (35)..(35)
 <223> Tyr có thể được thay thế bằng His

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (38)..(38)
 <223> Lys có thể được thay thế bằng Arg

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU

<222> (48)..(48)
 <223> Leu có thể được thay thế bằng Met

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (50)..(50)
 <223> Trp có thể được thay thế bằng Ile

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (59)..(59)
 <223> Lys có thể được thay thế bằng Ser

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (61)..(61)
 <223> Asn có thể được thay thế bằng Ala

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (62)..(62)
 <223> Glu có thể được thay thế bằng Gln

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (70)..(70)
 <223> Leu có thể được thay thế bằng Met

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (72)..(72)
 <223> Ala có thể được thay thế bằng Arg

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (74)..(74)
 <223> Lys có thể được thay thế bằng Thr

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (76)..(76)
 <223> Ser có thể được thay thế bằng Thr

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (77)..(77)
 <223> Asn có thể được thay thế bằng Ser

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (79)..(79)
 <223> Ala có thể được thay thế bằng Val

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU

<222> (82)..(82)

<223> Phe có thể được thay thế bằng Glu

<220>

<221> MISC_DẤU HIỆU

<222> (95)..(95)

<223> Phe có thể được thay thế bằng Tyr

<400> 41

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 (var. 2), chuỗi nhẹ, VL

<220>

<221> MISC_DẤU HIỆU

<222> (22)..(22)

<223> Ser có thể được thay thế bằng Thr

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (53)..(53)
 <223> Arg có thể được thay thế bằng Ser

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (55)..(55)
 <223> His có thể được thay thế bằng Gln

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (65)..(65)
 <223> Arg có thể được thay thế bằng Ser

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (71)..(71)
 <223> Tyr có thể được thay thế bằng Phe

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (72)..(72)
 <223> Ser có thể được thay thế bằng Thr

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (77)..(77)
 <223> Asn có thể được thay thế bằng Ser

<220>
 <221> MISC_DẤU HIỆU
 <222> (87)..(87)
 <223> Phe có thể được thay thế bằng Tyr

<400> 42

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro

65					70						75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr	
				85					90					95		

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>	43
<211>	329
<212>	PRT
<213>	nhân tạo

<220>
<223> Miền cố định (VH) IgG1

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 44

<211> 326

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền cố định (VH) IgG4 (S228P)

<400> 44

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> Miền kapa (VL)

<400> 45

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 46

<211> 98

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Dòng mầm của người IGHV1-46*01

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 47
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Dòng mầm của người IGKV1-39*01

<400> 47

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 Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly 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 Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Dòng mầm của người IGHJ4*01

<400> 48

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Dòng mầm của người IGKJ4*01

<400> 49

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 50

<211> 1367

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> IGF-1R (của người)

<400> 50

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
 50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
 65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
 85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
 275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
 340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val

370		375		380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser				
385		390		395
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly				
	405		410	415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp				
	420		425	430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe				
	435		440	445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu				
	450		455	460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg				
465		470		475
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr				
	485		490	495
Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr				
	500		505	510
Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys				
	515		520	525
Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys				
	530		535	540
Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys				
545		550		555
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln				
	565		570	575
Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp				
	580		585	590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
930 935 940

Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
945 950 955 960

Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
965 970 975

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
980 985 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
995 1000 1005

Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
1010 1015 1020

Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
1025 1030 1035

Ala	Ser	Met	Arg	Glu	Arg	Ile	Glu	Phe	Leu	Asn	Glu	Ala	Ser	Val
1040						1045					1050			
Met	Lys	Glu	Phe	Asn	Cys	His	His	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Val
1055						1060					1065			
Val	Ser	Gln	Gly	Gln	Pro	Thr	Leu	Val	Ile	Met	Glu	Leu	Met	Thr
1070						1075					1080			
Arg	Gly	Asp	Leu	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Met
1085						1090					1095			
Glu	Asn	Asn	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Pro	Ser	Leu	Ser	Lys	Met	Ile
1100						1105					1110			
Gln	Met	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	Asp	Gly	Met	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ala
1115						1120					1125			
Asn	Lys	Phe	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Val
1130						1135					1140			
Ala	Glu	Asp	Phe	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Met	Thr	Arg
1145						1150					1155			
Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Leu
1160						1165					1170			
Leu	Pro	Val	Arg	Trp	Met	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Gly	Val
1175						1180					1185			
Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Val	Leu	Trp
1190						1195					1200			
Glu	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Gln	Pro	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Asn
1205						1210					1215			
Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Met	Glu	Gly	Gly	Leu	Leu	Asp	Lys
1220						1225					1230			
Pro	Asp	Asn	Cys	Pro	Asp	Met	Leu	Phe	Glu	Leu	Met	Arg	Met	Cys

1235 1240 1245
 Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile
 1250 1255 1260
 Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser
 1265 1270 1275
 Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu
 1280 1285 1290
 Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser
 1295 1300 1305
 Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His
 1310 1315 1320
 Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
 1325 1330 1335
 Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
 1340 1345 1350
 Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
 1355 1360 1365

 <210> 51
 <211> 932
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> IGF-1R ECD (của người)

 <400> 51

 Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15

 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30

 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu

			260						265							270			
Gly	Trp	Arg	Cys	Val	Asp	Arg	Asp	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala				
		275					280					285							
Glu	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly	Phe	Val	Ile	His	Asp	Gly	Glu	Cys	Met				
	290					295					300								
Gln	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr				
305					310					315					320				
Cys	Ile	Pro	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Val	Cys	Glu	Glu	Glu	Lys				
				325					330						335				
Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Met	Leu	Gln	Gly				
			340					345					350						
Cys	Thr	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asn				
		355					360					365							
Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val				
	370					375					380								
Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ser				
385					390					395					400				
Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly				
				405					410					415					
Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp				
			420					425					430						
Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe				
		435					440					445							
Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu				
	450					455					460								
Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg				
465					470					475					480				

Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr	
				485					490					495		
Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr	
			500					505					510			
Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys	
		515					520						525			
Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys	
	530					535					540					
Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys	
545					550					555					560	
Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln	
				565					570						575	
Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp	
			580					585					590			
His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala	
		595					600					605				
Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser	
	610					615					620					
Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn	
625					630					635					640	
Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly	Tyr	
				645					650					655		
Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Lys	
			660					665					670			
Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro	Lys	
		675					680					685				
Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	Lys	
	690					695					700					

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925

Gly Tyr Glu Asn
930

<210> 52

<211> 512

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> IGF-1R ECD Nterminal (của người)

<400> 52

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> tetrapeptit (cầu liên kết)

<400> 53

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> tetrapeptit (cầu liên kết)

<400> 54

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> tetrapeptit (cầu liên kết)

<400> 55

Pro Val Gly Val Val
1 5

<210> 56

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H037, VH

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nhẹ L018, VL

<400> 57

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 Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 58

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H037 đủ chiều dài

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400.

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

445

Gly

<210> 59

<211> 214

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nhẹ L018 đủ chiều dài

<400> 59

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	Ile	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		

Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			

Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				

Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145				150						155					160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nhẹ L021, VL

<400> 60

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 Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 61
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> hz208F2 chuỗi nhẹ L021 đủ chiều dài

<400> 61

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 Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210-

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H047, VH

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63

<211> 449
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> hz208F2 chuỗi nặng H047 đủ chiều dài

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405

410

415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H049, VH

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> hz208F2 chuỗi nặng H049 đủ chiều dài

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 66

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H051, VH

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H051 đủ chiều dài

<400> 67

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 68
<211> 120
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> hz208F2 chuỗi nặng H052, VH

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H052 đủ chiều dài

<400> 69

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210					215					220				
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225					230					235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290					295					300				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325					330					335	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
			340					345					350		
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		355					360					365			

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 70

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H057, VH

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H057 đủ chiều dài

<400> 71

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355

360

365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H068, VH

<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H068 đủ chiều dài

<400> 73

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp			
	210					215					220							
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly			
225					230					235					240			
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile			
				245					250					255				
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu			
			260					265					270					
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His			
		275					280					285						
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg			
	290					295					300							
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys			
305					310					315					320			
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu			
				325					330					335				
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr			
			340					345					350					

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 74

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H070, VH

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H070 đủ chiều dài

<400> 75

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130	135	140
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	195	200	205
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	210	215	220
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	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
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	325	330	335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 76

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H071, VH

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 77

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H071 đủ chiều dài

<400> 77

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

[illegible]

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 78

<211> 120

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H076, VH

<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H076 đủ chiều dài

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 80
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> hz208F2 chuỗi nặng H077, VH

<400> 80

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 81

<211> 449

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> hz208F2 chuỗi nặng H077 đủ chiều dài

<400> 81

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn 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 Arg 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