



(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)



1-0032178

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 47/68; C12N 15/09; C07K 16/30; A61K 31/4745; A61P 35/00 (13) B

-
- (21) 1-2016-02685 (22) 24/12/2014
(86) PCT/JP2014/006421 24/12/2014 (87) WO 2015/098099 02/07/2015
(30) 2013-267548 25/12/2013 JP
(45) 25/06/2022 411 (43) 25/11/2016 344A
(73) 1. Daiichi Sankyo Company, Limited (JP)
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 1038426, Japan
2. SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (JP)
291-85, Minami 1-jo Nishi 17-chome, Chuo-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 0608556, Japan
(72) AGATSUMA, Toshinori (JP); TAKAHASHI, Shu (JP); HASEGAWA, Jun (JP); OKAJIMA, Daisuke (JP); HAMADA, Hirofumi (JP); YAMAGUCHI, Miki (JP).
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) THỂ LIÊN HỢP THUỐC-KHÁNG THỂ KHÁNG CHẤT TẢI NẠP TÍN HIỆU CANXI CÓ LIÊN QUAN ĐẾN KHỐI U 2 (TROP2) DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề xuất thuốc kháng khối u có tác dụng kháng khối u và tính an toàn. Sáng chế đề xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể, trong đó hợp chất kháng khối u được biểu thị bằng công thức dưới đây được liên hợp với kháng thể kháng-TROP2 thông qua liên kết có công thức cấu tạo: $-L^1-L^2-L^p-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$, trong đó kháng thể kháng-TROP2 được nối với đầu tận cùng của L^1 , và hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ với nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

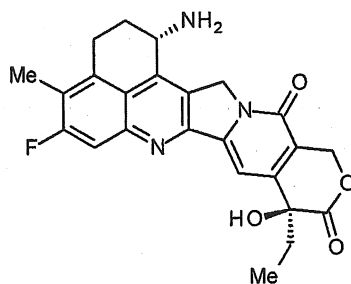
Sáng chế đề cập đến thể liên hợp thuốc-kháng thể có thuốc kháng khối u được liên hợp với kháng thể kháng TROP2 qua một gốc cấu trúc liên kết, thể liên hợp này hữu ích làm thuốc kháng khối u.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thể liên hợp thuốc-kháng thể (ADC) có thuốc có tính độc tế bào được liên hợp với một kháng thể, mà kháng nguyên của nó được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư và kháng thể này cũng gắn kết với kháng nguyên có khả năng nhập nội tế bào, và do đó có thể chuyển vận thuốc chọn lọc đến các tế bào ung thư và bởi vậy được cho là gây tích lũy thuốc trong các tế bào ung thư và tiêu diệt các tế bào ung thư (tham khảo, Tài liệu tham khảo không phải bằng độc quyền sáng chế từ 1 đến 3). Là một ADC, Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin (nhãn hiệu đã đăng ký bảo hộ độc quyền)), trong đó calicheamicin được liên hợp với kháng thể kháng CD33 được cấp phép lưu hành như chất trị liệu cho bệnh bạch cầu tủy cấp. Ngoài ra, Adcetris (Brentuximab vedotin (nhãn hiệu đã đăng ký)), trong đó auristatin E được liên hợp với kháng thể kháng CD30, gần đây đã được cấp phép lưu hành như một chất trị liệu cho u bạch huyết Hodgkin và u bạch huyết tế bào lớn thoái biến (tham khảo tài liệu không phải bằng độc quyền sáng chế 4). Các thuốc có chứa trong các ADC đã được cấp phép lưu hành cho đến nay nhằm đích ADN hoặc tubulin.

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

[Công thức 1]



(exatecan, tên hoá học: (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dion) là dẫn xuất tan trong nước của camptothecin (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 1 và 2). Khác với irinotecan hiện được sử dụng trong lâm sàng, hợp chất này không cần hoạt hoá bởi enzym để có tác dụng kháng khối u. Ngoài ra, hoạt tính ức chế đối với topoisomeraza I là lớn hơn SN-38, đây là dược chất chính của irinotecan và topotecan cũng được sử dụng trong lâm sàng, và có được hoạt tính tiêu diệt tế bào in vitro mạnh hơn đối với nhiều loại tế bào ung thư. Cụ thể là, hợp chất này thể hiện tác dụng kháng lại các tế bào ung thư có tính kháng đối với SN-38 hoặc hợp chất tương tự do có biểu hiện P-glycoprotein. Ngoài ra, trong khối u của người được cấy dưới da trên mô hình ở chuột, hợp chất này thể hiện tác dụng kháng khối u mạnh, và do đó đã được thử nghiệm trên lâm sàng, nhưng chưa được đưa ra thị trường (tham khảo, Tài liệu tham khảo không phải bằng độc quyền sáng chế từ 5 đến 10). Hiện chưa rõ là exatecan có tác dụng hữu hiệu như một ADC hay không.

DE-310 là phức hợp, trong đó exatecan được liên hợp với polyme rượu đa chức carboxymetyldextran dễ bị vi sinh vật phân huỷ qua nhóm đệm peptit GGFG (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 3). Bằng cách chuyển hoá exatecan thành dạng tiền dược chất polyme, có thể duy trì tính chất lưu giữ trong máu và cũng gia tăng thụ động tính chất có thể nhắm đích đến các vùng khối u bằng cách sử dụng tính thấm gia tăng của các mạch máu mới tạo ở trong khối u và tính chất lưu giữ ở các mô khối u. Đối với DE-310, thông qua phân giải nhóm đệm peptit bằng enzym, exatecan và exatecan với glyxin được nối với một nhóm amino được giải phóng liên tục dưới dạng hoạt chất chính. Do đó, các tính chất dược động học được cải thiện. DE-310 đã xác định được là có hiệu quả cao hơn

exatecan khi sử dụng một mình cho dù tổng lượng exatecan có chứa trong đó thấp hơn khi sử dụng exatecan một mình theo nhiều loại mô hình đánh giá khối u trong các nghiên cứu phi lâm sàng. Một nghiên cứu lâm sàng đã được tiến hành đối với DE-310, và đã khẳng định các trường hợp có hiệu quả, trong đó một báo cáo gợi ý là hoạt chất chính này tích lũy trong khối u nhiều hơn các mô bình thường, tuy nhiên, cũng có báo cáo chỉ ra là sự tích lũy DE-310 và hoạt chất chính trong khối u là không khác nhiều so với tích lũy ở các mô bình thường ở người, và do đó không nhận thấy có nhằm đích thụ động ở người (tham khảo, Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế từ 11 đến 14). Do đó, DE-310 không được đưa ra thị trường, và hiện vẫn chưa rõ là exatecan có tác dụng hữu hiệu như một thuốc nhằm đích như thế này hay không.

Dưới dạng hợp chất liên quan đến DE-310, phức hợp trong đó nhóm cấu trúc có công thức $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$ được cài xen giữa nhóm đệm-GGFG- và exatecan để tạo thành $\text{-GGFG-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$ được sử dụng như cấu trúc đệm, cũng là đã biết (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 4). Tuy nhiên, tác dụng kháng khối u của phức hợp này hiện hoàn toàn chưa rõ.

TROP2 của người (TACSTD2: chất tải nạp tín hiệu canxi có liên quan đến khối u 2, GA733-1, EGP-1, M1S1; sau đây được gọi là hTROP2) là protein màng tế bào tủy 1 xuyên màng đơn nhất gồm có 323 gốc axit amin. Trong khi sự có mặt của protein màng tế bào có tham gia vào quá trình đề kháng miễn dịch, hay gặp đối với các các dưỡng mạc và các tế bào ung thư của người (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 15), trước đây đã được gợi ý, phân tử kháng nguyên được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng (162-25.3 hoặc 162-46.2) kháng lại protein màng tế bào ở dòng tế bào ung thư nhau của người đã được nhận dạng và ký hiệu là TROP2 như một trong số các phân tử được biểu hiện trong các dưỡng mạc của người (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 16). Phân tử này sau đó cũng được các nhà nghiên cứu khác xác định và cũng được gọi là kháng nguyên khối u GA733-1 được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng GA733 của chuột (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 17) thu được bằng cách gây miễn dịch bằng dòng tế bào ung thư dạ dày hoặc

glycoprotein biểu mô (EGP-1; Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 18) được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng RS7-3G11 của chuột thu được bằng cách gây miễn dịch bằng các tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ. Vào năm 1995, tuy nhiên, đã tách dòng gen TROP2, và tất cả các phân tử này được xác nhận là các phân tử giống nhau (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 19). Trình tự ADN và trình tự axit amin của hTROP2 là có trong các cơ sở dữ liệu công bố công khai và có thể truy cập, ví dụ, theo số truy cập số NM_002353 và NP_002344 (NCBI).

Gen hTROP2 cấu thành họ gen TACSTD, cùng với gen TROP-1 của người (EpCAM, EGP-2, TACSTD1) có mức tương đồng khoảng 50% (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 21). Protein hTROP2 cấu thành bởi trình tự tín hiệu gồm có 26 gốc axit amin đầu tận cùng-N, miền ngoại bào gồm có 248 gốc axit amin, miền xuyên màng gồm có 23 gốc axit amin, và miền nội bào gồm có 26 gốc axit amin. Miền ngoại bào có bốn vị trí glycosyl hoá được liên kết qua-N và đã biết có phân tử lượng biểu kiến khoảng 10 kD + giá trị được tính trên cơ sở lý thuyết 35 kD (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 19).

Chưa nhận dạng được phối tử sinh lý của hTROP2, hoặc các chức năng phân tử của nó hiện chưa được biết. hTROP2 đã được xác định là gây tải nạp tín hiệu canxi trong các tế bào khối u (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 20). Hơn nữa, hTROP2 được phosphoryl hoá ở gốc nội bào serin 303 bởi protein kinaza C, đây là kinaza phụ thuộc vào -Ca^{2+} (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 18), và có trình tự gắn kết-PIP₂ ở miền nội bào, gợi ý là có các chức năng phát tín hiệu ở các tế bào khối u (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 22).

Trong phân tích hoá mô miễn dịch bằng cách sử dụng các mẫu lâm sàng, hTROP2 được xác định là có biểu hiện quá mức ở nhiều loại caxinom tế bào biểu mô và có biểu hiện ở các tế bào biểu mô ở một số loại hạn chế các mô bình thường ở mức biểu hiện thấp so với các mô khối u (Tài liệu tham khảo không phải bằng độc quyền sáng chế từ 23 đến 27). Ngoài ra, sự biểu hiện của hTROP2

đã được báo cáo là có liên quan đến tiên lượng xấu của ung thư ruột kết-trực tràng (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 23), ung thư dạ dày (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 24), ung thư tụy (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 25), ung thư miệng (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 26), và u thần kinh đệm (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 27).

Từ các mô hình sử dụng các tế bào ung thư ruột kết-trực tràng, còn ghi nhận có biểu hiện hTROP2 có liên quan đến tăng trưởng tế bào không phụ thuộc 'khung-scaffold' của các tế bào khối u và sinh khối u ở chuột suy giảm miễn dịch (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 28).

Do thông tin gợi ý mối liên quan này với bệnh ung thư, cho đến nay đã xác định nhiều kháng thể kháng-hTROP2 và nghiên cứu về tác dụng kháng khối u của chúng. Trong số các kháng thể này, ví dụ đã công bố kháng thể không được liên hợp thể hiện hoạt tính kháng khối u trên các mô hình dị ghép chuột trụi lông (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế từ 5 đến 8) cũng như một kháng thể có thể hiện hoạt tính kháng khối u dưới dạng ADC với thuốc gây độc tế bào (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế từ 9 đến 12). Tuy nhiên, mức độ hoặc phổ hoạt tính của chúng vẫn chưa thoả mãn, và có các nhu cầu y học chưa được đáp ứng đối với hTROP2 như một đích trị liệu.

Danh sách tài liệu tham khảo

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 1: Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 5-59061

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 2: Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 8-337584

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 3: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 1997/46260

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 4: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2000/25825

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 5: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2008/144891

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 6: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2011/145744

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 7: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2011/155579

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 8: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2013/077458

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 9: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2003/074566

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 10: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2011/068845

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 11: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2013/068946

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 12: Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 7999083

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 1: Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13 của Ducry, L., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 2: Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537 của Alley, S. C., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 3: Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452 của Damle N.K..

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 4: Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637 của Senter P. D., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 5: Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632 của Kumazawa, E., Tohgo, A..

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 6: Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-782 của Mitsui, I., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 7: Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769 của Takiguchi, S., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 8: Int J Cancer (1997) 72, 680-686 của Joto, N. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 9: Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220 của Kumazawa, E. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 10: Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273 của De Jager, R., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 11: Polymer Drugs in the Clinical Stage, của Inoue, K. và các đồng tác giả, Maeda và các đồng tác giả biên tập (2003), 145-153.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 12: Cancer Sci (2004) 95, 168-175 của Kumazawa, E. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 13: Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711 của Soepenbergh, O. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 14: Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347 của Wenthe M. N. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 15: Proc. Natl. Acad. Sci. 75(4), 1947-1951 (1978) của Faulk WP, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 16: Proc. Natl. Acad. Sci. 78(8), 5147-5150 (1981) của Lipinski M, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 17: Proc. Natl. Acad. Sci. 86(1), 27-31 (1989) của Linnenbach A J, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 18: Int. J. Cancer, 62(4), 472-479 (1995) của Basu A, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 19: Int. J. Cancer, 62(5), 610-618 (1995) của Fornaro M, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 20: Int. J. Cancer, 76(5), 671-676 (1998) của Ripani E, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 21: Cytogenet. Cell Genet., 92(1-2), 164-165 (2001) của Calabrese G, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 22: Int. J. Cancer, 75(2), 324-330 (1998) của El Sewedy T, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 23: Clin. Cancer Res., 12(10), 3057-3063 (2006) của Ohmachi T, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 24: J. Clin. Pathol., 62(2), 152-158 (2009) của Muhlmann G, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 25: Br. J. Cancer, 99(8), 1290-1295 (2008) của Fong D, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 26: Mod. Pathol., 21(2), 186-191 (2008) của Fong D, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 27: Neurol. Sci., 34(10), 1745-1750 (2013) của Ning S, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 28: Mol. Cancer Ther., 7(2), 280-285 (2008) của Wang J, và các đồng tác giả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Đối với việc điều trị khối u bằng kháng thể, có thể nhận thấy tác dụng kháng khối u không đầy đủ thậm chí khi kháng thể này nhận biết kháng nguyên để gắn kết với các tế bào khối u, và có trường hợp trong đó cần một kháng thể kháng khối u hiệu quả hơn. Ngoài ra, nhiều hợp chất phân tử lượng thấp kháng khối u có vấn đề về tác dụng phụ liên quan đến tính an toàn và độc tính thậm chí các hợp chất có tác dụng kháng khối u tuyệt vời, hợp chất này vẫn cần đạt được tác dụng trị liệu ưu việt hơn bằng cách tăng cường hơn nữa tính an toàn. Do đó, đối tượng của sáng chế là cung cấp thuốc kháng khối u có tác dụng trị liệu tuyệt vời, mà đặc biệt tốt về tác dụng kháng khối u và tính an toàn.

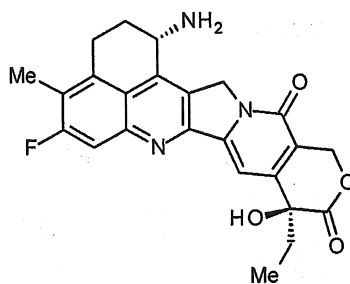
Các tác giả sáng chế cho rằng, khi hợp chất kháng khối u exatecan được chuyển hoá thành thể liên hợp thuốc-kháng thể, qua một gốc cấu trúc liên kết, bằng cách tiếp hợp với kháng thể kháng-TROP2, đây là kháng thể có khả năng nhắm đích các tế bào khối u, nghĩa là có tính chất có khả năng nhận biết các tế bào khối u, tính chất có khả năng gắn kết với các tế bào khối u, tính chất nhập nội vào các tế bào khối u, hoặc tính chất tương tự, hoạt tính tiêu diệt tế bào dựa trên kháng thể có thể có được, hợp chất kháng khối u có thể được chuyển vận một cách chắc chắn hơn đến các tế bào khối u để biểu hiện đặc hiệu tác dụng kháng khối u của hợp chất này ở các tế bào khối u, và do đó tác dụng kháng khối u có thể chắc chắn được thể hiện, và liều dùng của hợp chất kháng khối u có thể giảm đi so với trường hợp sử dụng hợp chất này một mình, và do đó ảnh hưởng của hợp chất kháng khối u đối với các tế bào bình thường có thể giảm nhẹ để có thể đạt được tính an toàn cao hơn.

Về khía cạnh này, các tác giả sáng chế đã tạo ra một liên kết có cấu trúc cụ thể và thành công thu được thể liên hợp thuốc-kháng thể, trong đó kháng thể kháng-TROP2 và exatecan được liên hợp với với nhau qua liên kết này, và khẳng định tác dụng kháng khối u tuyệt vời được thể liên hợp này thể hiện để thực hiện sáng chế.

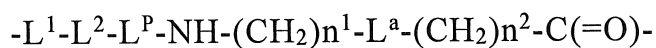
Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các đối tượng dưới đây.

[1] Thể liên hợp thuốc-kháng thể trong đó hợp chất kháng khối u có công thức:

[Công thức 2]



được liên hợp với kháng thể kháng-TROP2 bởi liên kết thioete, liên kết này được tạo thành ở nhóm liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2 qua liên kết có công thức cấu tạo:



Trong công thức này, kháng thể kháng-TROP2 được nối với đầu tận cùng của L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm $-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$ với nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối,

trong đó

n^1 là số nguyên từ 0 đến 6,

n^2 là số nguyên từ 0 đến 5,

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

trong đó n^3 là số nguyên từ 2 đến 8,

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

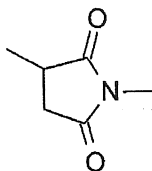
trong đó n^4 là số nguyên từ 1 đến 6,

L^P là gốc peptit gồm có từ 2 đến 7 axit amin,

L^a là $-O-$ hoặc liên kết đơn, và

$-(\text{succinimit-3-yl-N})-$ có công thức cấu tạo:

[Công thức 3]



mà được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen ở cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1.

Sáng chế còn đề cập đến lần lượt các đối tượng dưới đây.

[2] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục [1], trong đó gốc peptit của L^P là gốc peptit bao gồm axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic.

[3] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo [1] hoặc [2], trong đó L^P là gốc peptit được chọn từ nhóm dưới đây:

-GGF-,

-DGGF-,

-(D-)D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,

-SGGF-,

-KGGF-,

-DGGFG-,

-GGFGG-,

-DDGGFG-,

-KDGGFG-, và

-GGFGGGF-;

trong đó "(D-)D" là D-axit aspartic.

[4] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo [1] hoặc [2], trong đó L^P là gốc peptit gồm có 4 axit amin.

[5] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó L^P là gốc tetrapeptit -GGFG-.

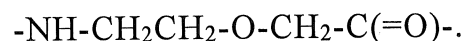
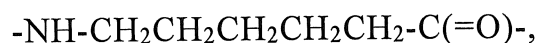
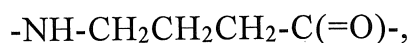
[6] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó n^3 là số nguyên từ 2 đến 5, và L^2 là liên kết đơn.

[7] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó n^3 là số nguyên từ 2 đến 5, L^2 là $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, và n^4 là 2 hoặc 4.

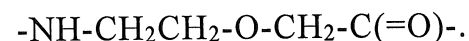
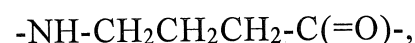
[8] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ là cấu trúc bán phần có độ dài mạch từ 4 đến 7 nguyên tử.

[9] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ là cấu trúc bán phần có độ dài mạch 5 hoặc 6 nguyên tử.

[10] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ là



[11] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ là



[12] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được nối với $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ là cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

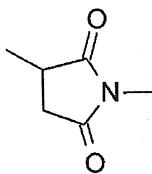
$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX).$

Trong đó -(succinimit-3-yl-N)- có công thức cấu tạo:

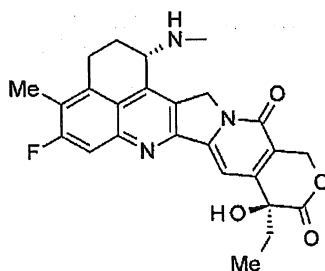
[Công thức 4]



nhóm này được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

-(NH-DX) là nhóm có công thức:

[Công thức 5]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, và

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

[13] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được nối với -L¹-L²-L^P-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- là một cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

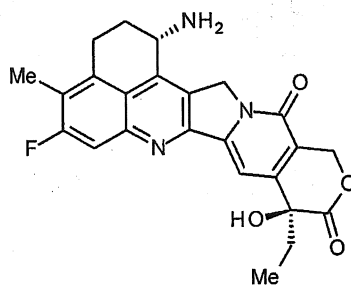
-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

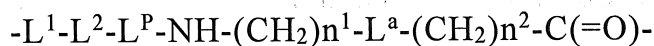
Ở đây, -(succinimit-3-yl-N)-, -(NH-DX), và -GGFG- là như được xác định ở trên.

[14] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể trong đó hợp chất kháng khối u có công thức:

[Công thức 6]



được liên hợp với kháng thể kháng-TROP2 bởi liên kết thioete mà được tạo thành ở nhóm liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2 thông qua liên kết có công thức cấu tạo:



trong đó kháng thể kháng-TROP2 được nối với đầu tận cùng của L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$,

trong đó

n^1 là số nguyên từ 0 đến 6,

n^2 là số nguyên từ 0 đến 5,

L^1 là $-(succinimit-3-yl-N)-(CH_2)_{n^3}-C(=O)-$,

trong đó n^3 là số nguyên từ 2 đến 8,

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

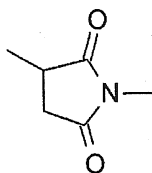
trong đó n^4 là số nguyên từ 1 đến 6,

L^P là gốc tetrapeptit -GGFG-,

L^a là -O- hoặc liên kết đơn, và

$-(succinimit-3-yl-N)-$ có công thức cấu tạo:

[Công thức 7]



nhóm này được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1.

[15] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [14], trong đó

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

n^1 bằng 1, n^2 bằng 1, n^3 bằng 5, L^2 là liên kết đơn, và L^a là $-\text{O}-$, hoặc

n^1 bằng 2, n^2 bằng 1, n^3 bằng 5, L^2 là liên kết đơn, và L^a là $-\text{O}-$.

[16] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [14] hoặc [15], trong đó n^3 bằng 2 hoặc 5, và L^2 là liên kết đơn.

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

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

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

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

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

[19] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [14] đến [18], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được nối với $-L^1-L^2-L^P-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ là cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

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

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

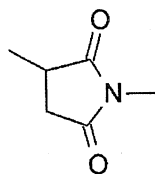
-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-
DX);

trong đó -(succinimit-3-yl-N)- có công thức cấu tạo:

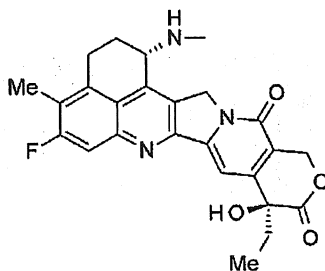
[Công thức 8]



nhóm này được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

-(NH-DX) là nhóm có công thức:

[Công thức 9]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, và

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

[20] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [14] đến [18], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được nối với -L¹-L²-L^P-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-(CH₂)^{n²}-C(=O)- là một cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Trong các nhóm này, -(succinimit-3-yl-N)-, -(NH-DX) và -GGFG- là như được xác định ở trên.

[21] Thễ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [20], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[22] Thễ liên hợp thuốc-kháng thễ theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [20], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thễ nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[23] Thễ liên hợp thuốc-kháng thễ theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [20], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thễ nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

[24] Thuốc có chứa thễ liên hợp thuốc-kháng thễ theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó.

[25] Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư có chứa thễ liên hợp thuốc-kháng thễ theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó.

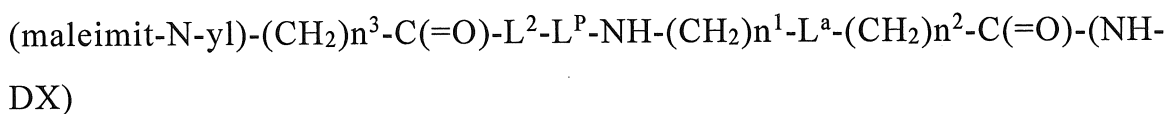
[26] Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư theo mục [25], thuốc này được dùng cho ung thư phổi, ung thư thận, ung thư biểu mô tiết niệu, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xộp đa dạng, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư vú, u mêlanin, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, hoặc ung thư thực quản.

[27] Dược phẩm có chứa thễ liên hợp thuốc-kháng thễ theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó làm thành phần hoạt tính, và thành phần bào chế được dụng.

[28] Dược phẩm theo mục [27], dược phẩm này được dùng cho ung thư phổi, ung thư thận, ung thư biểu mô tiết niệu, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xộp đa dạng, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư vú, u mêlanin, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, hoặc ung thư thực quản.

[29] Phương pháp điều trị khối u và/hoặc bệnh ung thư bao gồm cho dùng thễ liên hợp thuốc-kháng thễ theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó.

[30] Phương pháp sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể bao gồm cho hợp chất có công thức:



phản ứng với kháng thể kháng-TROP2 hoặc dẫn xuất phản ứng của nó và tiếp hợp nhóm liên kết-thuốc với kháng thể này bằng phương pháp để tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể này.

Trong công thức, n^3 là số nguyên từ 2 đến 8,

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

trong đó n^4 là số nguyên từ 1 đến 6,

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

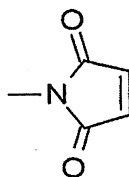
n^1 là số nguyên từ 0 đến 6,

n^2 là số nguyên từ 0 đến 5,

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

(maleimide-N-yl)- là nhóm có công thức:

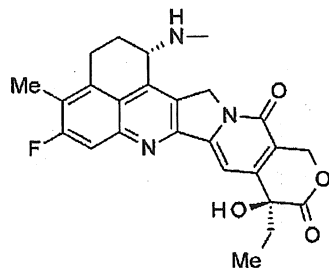
[Công thức 10]



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí kết nối.

$-(\text{NH-DX})$ là nhóm có công thức:

[Công thức 11]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

[31] Phương pháp sản xuất theo mục [30], trong đó phương pháp để liên hợp nhóm liên kết-thuốc với kháng thể kháng-TROP2 là phương pháp khử kháng thể này để chuyển hoá kháng thể này thành dẫn xuất phản ứng.

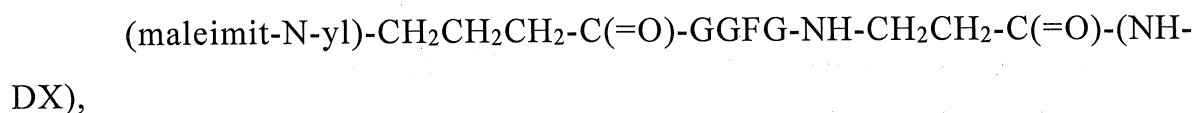
[32] Phương pháp sản xuất theo mục [30] hoặc [31], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể là nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[33] Phương pháp sản xuất theo mục [30] hoặc [31], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[34] Phương pháp sản xuất theo [30] hoặc [31], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

[35] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [30] đến [34].

[36] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể thu được bằng cách tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết sulfua trong phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2, trong đó kháng thể kháng-TROP2 được xử lý trong điều kiện khử và tiếp đó cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm dưới đây:



(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

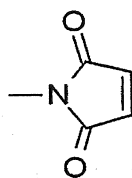
(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), và

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Trong các hợp chất nêu trên, (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức:

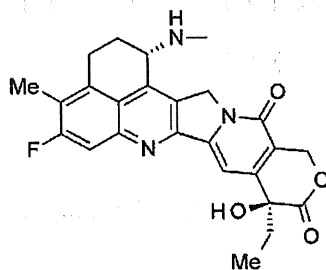
[Công thức 12]



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí kết nối.

-(NH-DX) là nhóm có công thức:

[Công thức 13]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

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

[37] Thử nghiệm hợp thuốc-kháng thể thu được bằng cách tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết sulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2, trong đó kháng thể kháng-TROP2 được xử lý trong điều kiện khử và tiếp đó cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm dưới đây:

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), và

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Trong các hợp chất nêu trên, (maleimit-N-yl)-, -(NH-DX), và -GGFG- là như được xác định ở trên.

[38] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [36] hoặc [37], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể là nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[39] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [36] hoặc [37], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[40] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [36] hoặc [37], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

Lợi ích của sáng chế

Với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 có hợp chất kháng khối u exatecan được liên hợp thông qua một liên kết có cấu trúc cụ thể, có thể đạt được tác dụng kháng khối u và độ an toàn rất tốt.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 7) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 8) của chuỗi nặng kháng thể cTINA1.

FIG. 2 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 9) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 10) của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1.

FIG. 3 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 11) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 12) của chuỗi nặng hTINA1-H1.

FIG. 4 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 13) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 14) của chuỗi nặng hTINA1-H2.

FIG. 5 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 15) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 16) của chuỗi nặng hTINA1-H3.

FIG. 6 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 17) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 18) của chuỗi nhẹ hTINA1-L1.

FIG. 7 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 19) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 20) của chuỗi nhẹ hTINA1-L2.

FIG. 8 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 21) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 22) của chuỗi nhẹ hTINA1-L3.

FIG. 9 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 23) của CDRH1 của kháng thể TINA1, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 24) của CDRH2 của nó, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 25) của CDRH3 của nó, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 26) của CDRL1 của nó, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 27) của CDRL2 của nó, và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 28) của CDRL3 của nó.

FIG. 10 thể hiện khả năng nhập nội tế bào của kháng thể kháng-CD9, kháng thể kháng-CD46, kháng thể kháng-CD55, kháng thể kháng-CD59, kháng thể kháng-CD71, kháng thể kháng-CD73, kháng thể kháng-CD147, kháng thể kháng-CD276, kháng thể kháng-EpCAM, kháng thể kháng-EGFR, và kháng thể kháng-TROP2 (kháng thể TINA1).

FIG. 11 thể hiện khả năng nhập nội tế bào của kháng thể kháng-CD59, kháng thể kháng-CD71, kháng thể kháng-EGFR, kháng thể kháng-EpCAM, và kháng thể kháng-TROP2 (kháng thể TINA1).

FIG. 12 thể hiện khả năng nhập nội tế bào của nhiều loại kháng thể kháng-TROP2.

FIG. 13 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) lên dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 14 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người BxPC-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 15 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người Capan-1 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 16 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), hoặc (10) lên dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 17 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), hoặc (10) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người BxPC-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 18 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 19 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người BxPC-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 20 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư buồng trứng của người NIH:OVCAR-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 21 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư dạ dày của người NCI-N87 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 22 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H292 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 23 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư vòm họng của người FaDu được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 24 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người CFPAC-1 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 25 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người CFPAC-1 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 26 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người HPAC được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 27 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) lên mô ung thư thực quản của người được cấy ghép dưới da ở chuột NOD-scid.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây sẽ mô tả các phương thức ưu tiên để thực hiện sáng chế có tham chiếu đến các hình vẽ. Các phương án được mô tả dưới đây là các ví dụ điển hình của các phương án của sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế là thuốc kháng khối u trong đó kháng thể kháng-TROP2 được liên hợp với hợp chất kháng khối u qua một gốc cấu trúc liên kết và được mô tả chi tiết dưới đây.

Kháng thể

Kháng thể kháng-TROP2 được sử dụng trong thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể thu được từ loài bất kỳ, và các ví dụ ưu tiên của các loài này có thể bao gồm người, chuột cống, chuột nhắt và thỏ. Trong trường hợp khi thu được từ loài khác không phải là người, tốt hơn là được khám hoặc được làm tương thích với người bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Kháng thể này của sáng chế có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng và tốt hơn là kháng thể đơn dòng.

Kháng thể kháng-TROP2 có khả năng nhằm đích các tế bào khối u, nghĩa là, có tính chất có khả năng nhận biết tế bào khối u, tính chất có khả năng gắn kết với tế bào khối u, tính chất nhập nội vào tế bào khối u, hoặc tính chất tương tự, và có thể được chuyển hoá thành thể liên hợp thuốc-kháng thể bằng cách tiếp hợp với hợp chất có hoạt tính kháng khối u thông qua một liên kết.

Hoạt tính gắn kết của kháng thể này kháng lại các tế bào khối u có thể được khẳng định bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Ví dụ về phương pháp để khẳng định sự nhập nội kháng thể này vào các tế bào khối u có thể bao gồm (1) thử nghiệm hiển thị hoá một kháng thể được hợp nhất vào các tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai (được đánh dấu huỳnh quang) gắn kết với kháng thể trị liệu này (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) thử nghiệm đo cường độ huỳnh quang được hợp nhất vào các tế bào bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai (được đánh dấu huỳnh quang) gắn kết với kháng thể trị liệu này (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, December 2004), hoặc (3) thử nghiệm Mab-ZAP sử dụng độc tố miễn dịch gắn kết với kháng thể trị liệu này trong đó độc tố này được giải phóng khi hợp nhất vào các tế bào để ức chế tăng trưởng tế bào (Bio Techniques 28: 162-165, January 2000). Protein phức hợp tái tổ hợp có vùng xúc tác của độc tố bệnh bạch hầu và protein G có thể được sử dụng làm độc tố miễn dịch.

Do thuốc được liên hợp trong thể liên hợp thuốc-kháng thể có tác dụng kháng khối u, tốt hơn là không nhất thiết là bản thân kháng thể này phải có tác dụng kháng khối u. Để có hoạt tính tiêu diệt tế bào đặc hiệu và chọn lọc của hợp

chất kháng khối u lên các tế bào khối u, quan trọng là và cũng ưu tiên là kháng thể này phải có tính chất nhập nội để xâm nhập vào các tế bào khối u.

Kháng thể kháng-TROP2 có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp thường được thực hiện trong lĩnh vực này, phương pháp này bao gồm gây miễn dịch cho động vật bằng một polypeptit kháng nguyên và thu gom và tinh chế các kháng thể được sản sinh *in vivo*. Nguồn gốc của kháng nguyên không giới hạn ở người, và các con vật có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên thu được từ động vật không phải là người như chuột nhắt, chuột cống, và các động vật tương tự. Trong trường hợp, tính phản ứng chéo của các kháng thể gắn kết với kháng nguyên khác loài thu được với các kháng nguyên của người có thể được thử nghiệm để sàng lọc kháng thể có thể áp dụng cho bệnh ở người.

Theo cách khác, các tế bào sản sinh kháng thể mà sản xuất kháng thể kháng kháng nguyên được dung hợp với các tế bào u tủy theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Nature (1975) 256, trang 495-497 của Kohler và Milstein; và Monoclonal Antibodies, trang 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980), Kennet, R. biên tập) để tạo ra các tế bào lai, từ đó có thể thu được các kháng thể đơn dòng.

Kháng nguyên có thể thu được bằng cách chế tạo bằng kỹ thuật di truyền các tế bào chủ để tạo ra gen mã hoá protein kháng nguyên này. Cụ thể là, các vật truyền cho phép biểu hiện gen kháng nguyên được điều chế và chuyển vào các tế bào chủ sao cho biểu hiện gen này. Kháng nguyên được biểu hiện theo cách này có thể được tinh chế. Kháng thể này cũng có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp gây miễn dịch các động vật bằng các tế bào biểu hiện kháng nguyên được chế tạo bằng kỹ thuật di truyền nêu trên hoặc dòng tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Kháng thể kháng-TROP2 có thể thu được bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực này.

Kháng thể kháng-TROP2 mà có thể được sử dụng trong sáng chế không bị hạn chế cụ thể, ví dụ, tốt hơn là có thể sử dụng các kháng thể được xác định

cụ thể bằng các trình tự axit amin đã thể hiện trong Danh mục trình tự của sáng chế. Kháng thể kháng-TROP2 được sử dụng trong sáng chế tốt hơn là có các tính chất như được mô tả dưới đây.

(1) Một kháng thể có các tính chất dưới đây:

(a) gắn kết đặc hiệu với TROP2, và

(b) có hoạt tính nhập nội ở tế bào biểu hiện-TROP2 bằng cách gắn kết với TROP2.

(2) Kháng thể theo mục (1), trong đó TROP2 là TROP2 của người.

(3) Kháng thể theo mục (1) hoặc (2), trong đó kháng thể này có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 23, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 24, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 25 như các vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nặng, và CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 26, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 27, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 28 như các vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ.

(4) Kháng thể theo mục bất kỳ từ (1) đến (3), trong đó vùng ổn định của nó là vùng ổn định thu được từ người.

(5) Kháng thể theo mục bất kỳ từ (1) đến (4), trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.

(6) Kháng thể theo mục (5), trong đó kháng thể này có vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (a) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12, (b) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14, (c) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16, (d) trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (a) đến (c), và (e) trình tự axit amin thu được từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (a) đến (c) bằng cách khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một axit amin, và vùng thay đổi

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (f) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, (g) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, (h) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22, (i) trình tự axit amin có tính mức đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (f) đến (h), và (j) trình tự axit amin thu được từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (f) đến (h) bằng cách khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một axit amin.

(7) Kháng thể theo mục (6), trong đó kháng thể này có vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16

và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, và vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22.

(8) Kháng thể theo mục (7), trong đó kháng thể này có vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, và vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22.

(9) Kháng thể theo mục (6) hoặc (7), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong

SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 20, và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22.

(10) Kháng thể theo mục (6) hoặc (7), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ

ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20, và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 22.

(11) Kháng thể theo (8), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 20, và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22.

(12) Kháng thể theo mục bất kỳ từ (1) đến (11), trong đó kháng thể này không có gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng.

(13) Kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể theo mục bất kỳ từ (1) đến (12), phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ đã biến nạp với vật truyền biểu hiện có chứa polynucleotit mã hoá kháng thể này; và thu gom kháng thể quan tâm này từ các dịch nuôi cấy thu được ở bước nêu trên.

Sau đây, mô tả kháng thể kháng-TROP2 được sử dụng trong sáng chế.

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

Thuật ngữ "gen" như được sử dụng trong bản mô tả này không chỉ bao gồm ADN, mà còn cả ARNtt của nó, ADN bổ trợ của nó, và ARN bổ trợ của nó.

Thuật ngữ "polynucleotit" như được sử dụng trong bản mô tả này được sử dụng cùng nghĩa như axit nucleic và cũng bao gồm ADN, ARN, các đoạn dò, các oligonucleotit, và các đoạn mồi.

Thuật ngữ "polypeptit" và "protein" như được sử dụng trong bản mô tả này được sử dụng không có sự phân biệt.

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

Thuật ngữ "TROP2" như được sử dụng trong bản mô tả này được sử dụng cùng ý nghĩa như protein TROP2.

Thuật ngữ "CDR" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ vùng xác định tính bổ trợ (CDR). Đã biết là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một phân tử kháng thể có ba vùng xác định tính bổ trợ (các CDR). CDR còn được gọi là miền siêu biến, và có mặt trong vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một kháng thể. Đây là vị trí mà có mức độ thay đổi đặc biệt cao về cấu trúc bậc một, và có ba CDR phân biệt trong cấu trúc bậc một của chuỗi polypeptit nặng và nhẹ. Trong bản mô tả này, đối với các CDR của một kháng thể, các CDR của chuỗi nặng được biểu thị bằng CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ bên đầu tận cùng-amino của trình tự axit amin của chuỗi nặng, và các CDR của chuỗi nhẹ được biểu thị bằng CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ bên đầu tận cùng-amino của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ này. Các vị trí này là gần nhau ở cấu trúc bậc ba và xác định tính đặc hiệu đối với kháng nguyên mà kháng thể này gắn kết.

Thuật ngữ "tiến hành lai hoá trong điều kiện nghiêm ngặt" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ quy trình trong đó tiến hành lai hoá trong điều kiện mà có thể nhận dạng được bằng cách lai ở 68°C trong dung dịch lai hoá có bán sẵn trên thị trường ExpressHyb Hybridization Solution (do Clontech, Inc. sản

xuất) hoặc bằng cách tiến hành lai ở 68°C với sự có mặt từ 0,7 đến 1,0 M NaCl có sử dụng màng lọc có ADN được cố định trên đó, tiếp đó rửa ở 68°C bằng cách sử dụng dung dịch từ 0,1 đến 2 x SSC (dung dịch 1 x SSC gồm có 150 mM NaCl và 15 mM natri xitrat) hoặc trong các điều kiện tương đương.

1. TROP2

TROP2 là thành viên của họ TACSTD được biểu hiện ở các dưỡng mạc của người và là protein màng tế bào típ 1 xuyên màng đơn nhất tham gia vào quá trình đề kháng miễn dịch, hay gặp đối với các dưỡng mạc và các tế bào ung thư của người.

Đối với protein TROP2 sẽ sử dụng trong sáng chế, protein TROP2 có thể được tinh chế trực tiếp từ các tế bào biểu hiện-TROP2 của người hoặc động vật có vú không phải là người (như chuột cống hoặc chuột nhắt) và được sử dụng, hoặc phân đoạn màng tế bào của các tế bào nêu trên có thể được điều chế và sử dụng. Ngoài ra, TROP2 có thể thu được bằng cách tổng hợp in vitro hoặc sản xuất ở tế bào chủ bằng cách xử lý bằng công nghệ di truyền. Trong xử lý bằng công nghệ di truyền, cụ thể là sau khi ADN bổ trợ của TROP2 được tích hợp vào vật truyền có khả năng biểu hiện ADN bổ trợ của TROP2, protein TROP2 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch có chứa enzym, cơ chất và chất cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện TROP2 ở tế bào chủ đã biến nạp chưa có nhân điển hình hoặc đã có nhân điển hình khác. Theo cách khác, các tế bào biểu hiện-TROP2 đã xử lý bằng công nghệ di truyền nêu trên hoặc dòng tế bào biểu hiện TROP2 có thể được sử dụng làm protein TROP2.

Trình tự ADN và trình tự axit amin của TROP2 là có sẵn trong các cơ sở dữ liệu công bố rộng rãi và có thể tham khảo, ví dụ theo số truy cập NM_002353 và NP_002344 (NCBI).

Ngoài ra, protein mà gồm có trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được thay thế, khuyết đoạn và/hoặc bổ sung trong trình tự bất kỳ trong

số các trình tự axit amin nêu trên của TROP2 và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của protein cũng bao gồm trong TROP2.

Protein TROP2 của người được cấu thành bởi trình tự tín hiệu gồm có đầu tận cùng-N gồm có 26 gốc axit amin, miền ngoại bào gồm có 248 gốc axit amin, miền xuyên màng gồm có 23 gốc axit amin, và miền nội bào gồm có 26 gốc axit amin.

2. Sản xuất kháng thể kháng-TROP2

Kháng thể kháng TROP2 của sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp thường thực hiện trong lĩnh vực này, phương pháp này bao gồm gây miễn dịch cho động vật bằng TROP2 hoặc polypeptit tùy ý được chọn từ trình tự axit amin của TROP2, và thu gom và tinh chế kháng thể được sản xuất in vivo này. Các loại sinh học của TROP2 sẽ được sử dụng làm kháng nguyên không giới hạn ở là của người, và động vật có thể được gây miễn dịch bằng TROP2 thu được từ một động vật khác không phải là người, như chuột nhắt hoặc chuột cống. Trong trường hợp này, bằng cách xét nghiệm tính phản ứng chéo giữa một kháng thể gắn kết với TROP2 khác loài thu được và TROP2 của người, một kháng thể có thể dùng cho bệnh ở người có thể được chọn.

Ngoài ra, kháng thể đơn dòng có thể thu được từ tế bào lai tạo ra bằng các dung hợp các tế bào sản sinh kháng thể mà sản xuất một kháng thể kháng TROP2 với các tế bào u tủy theo phương pháp đã biết (ví dụ, Nature, (1975) 256, các trang 495-497 của Kohler và Milstein; Monoclonal Antibodies, các trang 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980) của Kennet, R. biên tập).

TROP2 sẽ được sử dụng làm kháng nguyên có thể thu được bằng biểu hiện gen TROP2 ở tế bào chủ bằng cách xử lý bằng công nghệ di truyền.

Cụ thể là, vật truyền có khả năng biểu hiện gen TROP2 được tạo ra, và vật truyền thu được được chuyển nhiễm vào tế bào chủ để biểu hiện gen này, và tiếp đó, tinh chế TROP2 đã biểu hiện.

Theo cách khác, tế bào biểu hiện TROP2 được xử lý bằng công nghệ di truyền nêu trên hoặc dòng tế bào biểu hiện TROP2 có thể được sử dụng làm

protein TROP2. Sau đây, mô tả cụ thể phương pháp thu được một kháng thể kháng TROP2.

(1) Điều chế kháng nguyên

Các ví dụ về kháng nguyên được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng-TROP2 bao gồm TROP2, hoặc polypeptit gồm có trình tự axit amin bán phần bao gồm ít nhất 6 axit amin liền kề của TROP2, hoặc dẫn xuất thu được bằng bổ sung trình tự axit amin xác định hoặc chất mang của nó.

TROP2 có thể được tinh chế trực tiếp từ các mô khối u của người hoặc các tế bào khối u và được sử dụng. Ngoài ra, TROP2 có thể thu được bằng tổng hợp in vitro hoặc bằng cách sản xuất nó trong tế bào chủ bằng công nghệ di truyền.

Đối với công nghệ di truyền, cụ thể là, sau khi ADN bổ trợ của TROP2 được tích hợp vào vật truyền có khả năng biểu hiện ADN bổ trợ của TROP2, kháng nguyên này có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch có chứa enzym, cơ chất và chất cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện TROP2 trong tế bào chủ được biến nạp chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình khác.

Ngoài ra, kháng nguyên này cũng có thể thu được dưới dạng protein bài tiết bằng cách biểu hiện protein dung hợp thu được bằng nối miền ngoại bào của TROP2, đây là protein màng, với vùng ổn định của một kháng thể trong hệ vật truyền-vật chủ thích hợp.

ADN bổ trợ của TROP2 có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp được gọi là PCR trong đó tiến hành phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây được gọi là "PCR"; xem tài liệu: Science, (1988) 239, các trang 487-489 của Saiki, R. K., và các đồng tác giả) bằng cách sử dụng thư viện ADN bổ trợ biểu hiện ADN bổ trợ của TROP2 dưới dạng khuôn mẫu và các đoạn mồi khuếch đại đặc hiệu ADN bổ trợ của TROP2.

Để tổng hợp polypeptit in vitro, ví dụ, hệ thống dịch mã nhanh (Rapid Translation System- RTS) do Roche Diagnostics, Inc. sản xuất là một ví dụ, nhưng không giới hạn ở ví dụ này.

Ví dụ về các tế bào chủ chưa có nhân điển hình bao gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*. Để biến nạp các tế bào chủ với gen đích, các tế bào chủ được biến nạp bởi vật truyền plasmit bao gồm replicon, nghĩa là điểm khởi đầu sao chép thu được từ loài tương hợp với vật chủ, và trình tự điều hoà. Ngoài ra, vật truyền tốt hơn là có trình tự có khả năng áp đặt tính chọn lọc kiểu hình gen lên tế bào được biến nạp.

Các ví dụ về các tế bào chủ có nhân điển hình bao gồm các tế bào động vật có xương sống, các tế bào côn trùng, và các tế bào nấm men. Cho các tế bào động vật có xương sống, ví dụ, tế bào COS của khỉ (Cell, (1981) 23, các trang 175-182, của Gluzman, Y., ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), nguyên bào sợi NIH3T3 của chuột (ATCC No. CRL-1658), và chủng thiếu hụt-dihydrofolat reductaza (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, các trang 4126-4220 của Urlaub, G. và Chasin, L. A.), tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61); và tế bào tương tự thường được sử dụng, tuy nhiên, không chỉ giới hạn ở các tế bào này.

Thể biến nạp thu được như trên có thể được nuôi cấy theo phương pháp thường được thực hiện trong lĩnh vực này, và bằng cách nuôi cấy thể biến nạp này, polypeptit đích được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào.

Môi trường thích hợp để sử dụng cho nuôi cấy có thể được lựa chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này từ các môi trường nuôi cấy thông thường được sử dụng tùy thuộc vào các tế bào chủ đã sử dụng. Nếu sử dụng *Escherichia coli*, ví dụ, có thể sử dụng môi trường LB có bổ sung kháng sinh như ampicillin hoặc IPMG nếu cần.

Protein tái tổ hợp được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào bởi thể biến nạp thông qua nuôi cấy có thể được phân tách và tinh chế theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp phân tách đã biết có sử dụng tính chất vật lý hoặc hoá học của protein này.

Các ví dụ cụ thể của các phương pháp này bao gồm xử lý với chất làm kết tủa protein hay gập, siêu lọc, nhiều loại sắc ký lỏng như sắc ký rây phân tử (lọc

gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, và sắc ký ái lực, thẩm tách, và kết hợp các phương pháp này.

Ngoài ra, bằng cách gắn nhãn 6 gốc histidin cho protein tái tổ hợp cần được biểu hiện, protein này có thể được tinh chế một cách hiệu quả bằng cột sắc ký niken. Theo cách khác, bằng cách gắn vùng Fc IgG vào protein tái tổ hợp có biểu hiện, protein này có thể được tinh chế một cách hiệu quả bằng cột protein A.

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

Thế biến nạp nêu trên cũng có thể được sử dụng như kháng nguyên. Theo cách khác, dòng tế bào biểu hiện TROP2 có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Ví dụ về dòng tế bào này có thể bao gồm các dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H322, PC14, NCIH-H2122, và LCAM1, dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt của người PC3, dòng tế bào ung thư tụy của người BxPC-3, Capan-1, và PK-1, dòng tế bào ung thư buồng trứng của người SKOV3, và dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205, mặc dù không giới hạn ở các dòng tế bào này theo sáng chế miễn là có biểu hiện TROP2.

(2) Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng-TROP2

Ví dụ về kháng thể gắn kết đặc hiệu với TROP2 bao gồm kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu với TROP2, và phương pháp thu được kháng thể này như được mô tả dưới đây.

Việc sản xuất kháng thể đơn dòng nói chung đòi hỏi các bước tiến hành dưới đây:

(a) tinh chế polyme sinh học sẽ sử dụng làm kháng nguyên, hoặc điều chế các tế bào biểu hiện-kháng nguyên;

(b) điều chế các tế bào sản sinh kháng thể bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng cách tiêm kháng nguyên này, lấy máu, định lượng hiệu giá kháng thể để xác định khi cắt lá lách;

- (c) điều chế các tế bào u tuỷ (dưới đây gọi là "u tuỷ");
- (d) dung hợp các tế bào sản sinh kháng thể này với u tuỷ;
- (e) sàng lọc nhóm các tế bào lai sản sinh kháng thể mong muốn;
- (f) chia các tế bào lai thành các dòng tế bào đơn nhất (tách dòng);
- (g) tuỳ ý, nuôi cấy tế bào lai này hoặc nuôi động vật được ghép tế bào lai này để sản xuất lượng lớn kháng thể đơn dòng;
- (h) xét nghiệm kháng thể đơn dòng được sản xuất theo cách này về hoạt tính sinh học và tính đặc hiệu gắn kết, hoặc thử nghiệm tương tự cho các tính chất như chất thử được đánh dấu; và xét nghiệm tương tự.

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

(a) Tinh chế kháng nguyên

Để làm kháng nguyên, có thể sử dụng TROP2 được điều chế bằng phương pháp nêu trên hoặc peptit bán phần của nó.

Ngoài ra, phân đoạn màng được điều chế từ các tế bào tái tổ hợp biểu hiện TROP2 hoặc các tế bào tái tổ hợp biểu hiện chính TROP2, và cả peptit bán phần của protein của sáng chế được tổng hợp bằng phương pháp hoá học đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

Ngoài ra, dòng tế bào biểu hiện TROP2 cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

(b) Điều chế các tế bào sản sinh kháng thể

Kháng nguyên thu được ở bước (a) được trộn với tá dược như tá dược hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh Freund hoặc chất phụ trợ như nhôm kali sulfat và hỗn hợp thu được được sử dụng làm tác nhân miễn dịch để gây miễn dịch cho

động vật thí nghiệm. Theo phương pháp khác, động vật thí nghiệm được gây miễn dịch bằng tế bào biểu hiện-kháng nguyên như là tác nhân gây miễn dịch. Để làm động vật thí nghiệm, động vật bất kỳ được sử dụng trong phương pháp sản xuất lai đã biết có thể được sử dụng mà không có cản trở. Cụ thể là, ví dụ, có thể sử dụng chuột nhắt, chuột cống, dê, cừu, bò, ngựa hoặc động vật tương tự. Tuy nhiên, theo quan điểm sẵn có các tế bào u tuỷ để dung hợp với các tế bào sản sinh kháng thể đã chiết xuất, tốt hơn là sử dụng chuột nhắt hoặc chuột cống làm động vật sẽ được gây miễn dịch.

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

Các con chuột nhắt và chuột cống này có thể thu được từ cơ sở gây giống/phân phối động vật thí nghiệm, ví dụ, CLEA Japan, Inc. và Charles River Laboratories Japan, Inc.

Xét đến tính tương hợp dung hợp với các tế bào u tuỷ nêu dưới đây, trong trường hợp chuột nhắt, đặc biệt ưu tiên giống BALB/c, và trong trường hợp chuột cống, đặc biệt ưu tiên các giống Wistar và Low làm động vật sẽ gây miễn dịch.

Ngoài ra, xét đến tính tương đồng kháng nguyên giữa người và chuột nhắt, cũng ưu tiên sử dụng chuột nhắt có chức năng sinh học giảm thiểu để loại bỏ các tự kháng thể, nghĩa là, chuột mắc bệnh tự miễn.

Lứa tuổi của chuột nhắt hoặc chuột cống này ở thời điểm gây miễn dịch tốt hơn là 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn là từ 6 đến 8 tuần tuổi.

Để gây miễn dịch động vật bằng TROP2 hoặc thể tái tổ hợp của nó, ví dụ, có thể sử dụng phương pháp đã biết được mô tả chi tiết trong, ví dụ, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental

Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) hoặc phương pháp tương tự.

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

Nghĩa là, trước tiên, phân đoạn protein màng đóng vai trò như kháng nguyên hoặc các tế bào gây biểu hiện kháng nguyên này được sử dụng qua đường trong da hoặc trong màng bụng cho động vật. Tuy nhiên, ưu tiên kết hợp cả hai đường dùng để làm gia tăng hiệu quả gây miễn dịch, và khi sử dụng trong da ở nửa đầu và sử dụng trong màng bụng ở nửa còn lại hoặc chỉ ở lần sử dụng cuối cùng, hiệu quả gây miễn dịch có thể được gia tăng đặc biệt.

Phác đồ sử dụng kháng nguyên này thay đổi tùy thuộc vào loại động vật sẽ gây miễn dịch, sự khác biệt giữa các cá thể hoặc yếu tố tương tự. Tuy nhiên, nói chung phác đồ sử dụng, trong đó ưu tiên tần suất sử dụng kháng nguyên là từ 3 đến 6 lần và khoảng cách giữa các lần dùng là từ 2 đến 6 tuần, và ưu tiên hơn phác đồ sử dụng trong đó tần suất sử dụng kháng nguyên là từ 3 đến 4 lần và khoảng cách giữa các lần dùng là từ 2 đến 4 tuần.

Ngoài ra, liều dùng của kháng nguyên thay đổi tùy thuộc vào loại động vật, sự khác biệt giữa các cá thể hoặc yếu tố tương tự, tuy nhiên, nói chung liều dùng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là từ 0,1 đến 0,5 mg.

Tiến hành gây miễn dịch tăng cường từ 1 đến 6 tuần, tốt hơn là từ 1 đến 4 tuần, tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 tuần sau khi sử dụng kháng nguyên như nêu trên. Khi tác nhân gây miễn dịch là các tế bào, sử dụng từ 1×10^6 đến 1×10^7 tế bào.

Liều dùng của kháng nguyên này ở thời điểm tiến hành gây miễn dịch tăng cường thay đổi tùy thuộc vào loại hoặc kích cỡ của động vật hoặc yếu tố tương tự, tuy nhiên, ví dụ, trong trường hợp chuột nhắt, liều dùng nói chung là ấn định trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là từ 0,1 đến 0,5 mg, tốt hơn nữa là khoảng từ 0,1 đến 0,2 mg. Khi tác nhân gây miễn dịch là các tế bào, sử dụng từ 1×10^6 đến 1×10^7 .

Các tế bào lá lách hoặc các lympho bào kể cả các tế bào sản sinh kháng thể được lấy vô khuẩn từ động vật đã gây miễn dịch sau từ 1 đến 10 ngày, tốt hơn là từ 2 đến 5 ngày, tốt hơn nữa là từ 2 đến 3 ngày sau khi gây miễn dịch tăng cường. Ở thời điểm này, xác định đo hiệu giá kháng thể, và nếu động vật có hiệu giá kháng thể gia tăng đủ được sử dụng làm nguồn cung cấp các tế bào sản sinh kháng thể, có thể thực hiện quy trình tiếp đó hiệu quả hơn.

Ví dụ về phương pháp xác định hiệu giá kháng thể sẽ sử dụng trong bản mô tả này bao gồm phương pháp RIA và phương pháp ELISA, nhưng không giới hạn ở phương pháp này. Ví dụ, nếu sử dụng phương pháp ELISA, có thể thực hiện đo hiệu giá kháng thể theo các quy trình như nêu dưới đây.

Đầu tiên, kháng nguyên đã tinh chế hoặc đã tinh chế một phần được hấp phụ vào bề mặt pha rắn như là đĩa 96-giếng cho ELISA, và bề mặt pha rắn không có kháng nguyên hấp phụ được phủ với protein không cùng họ kháng nguyên này như albumin huyết thanh bò (BSA). Sau khi rửa bề mặt, cho bề mặt này tiếp xúc với mẫu thử được pha loãng theo bậc (ví dụ, huyết thanh chuột) dưới dạng kháng thể nguyên phát để kháng thể trong mẫu thử gắn kết với kháng nguyên này.

Ngoài ra, để làm kháng thể thứ hai, một kháng thể được đánh dấu bằng enzym kháng lại kháng thể của chuột được thêm vào và để gắn kết với kháng thể của chuột. Sau khi rửa, bổ sung thêm cơ chất cho enzym và xác định thay đổi về độ hấp thụ do hiện màu được cảm ứng bởi sự phân huỷ cơ chất hoặc chất tương tự và tính hiệu giá kháng thể dựa trên chỉ số đo xác định được này.

Việc tách các tế bào sản sinh kháng thể từ các tế bào lá lách hoặc các lympho bào của động vật đã gây miễn dịch có thể thực hiện theo phương pháp đã biết (ví dụ, Nature (1975), 256, trang 495 của Kohler và các đồng tác giả; Eur. J. Immunol. (1977), 6, trang 511 của Kohler và các đồng tác giả; Nature (1977), 266, trang 550 của Milstein và các đồng tác giả; Nature (1977), 266, trang 495 của Walsh). Ví dụ, trong trường hợp các tế bào lá lách, phương pháp chung trong đó các tế bào sản sinh kháng thể được phân tách bằng cách đồng thể hoá lá lách để thu được các tế bào bằng cách lọc với rây thép không gỉ và tạo

hỗn dịch các tế bào này có thể sử dụng trong môi trường thiết yếu tối thiểu (Minimum Essential Medium-MEM) Eagle.

(c) Điều chế các tế bào u tuỷ (dưới đây gọi là "u tuỷ")

Các tế bào u tuỷ sẽ được sử dụng để dung hợp tế bào không bị giới hạn cụ thể và các tế bào thích hợp có thể được chọn từ các dòng tế bào đã biết. Tuy nhiên, xét đến việc thuận tiện khi tế bào lai được chọn từ các tế bào được dung hợp, tốt hơn là sử dụng giống thiếu hụt HGPRT (hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferaza) mà có quy trình chọn lọc đã được xác định.

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

Các giống tế bào này được nuôi cấy chuyển tiếp trong môi trường thích hợp như môi trường 8-azaguanin (môi trường thu được bằng bổ sung thêm 8-azaguanin vào môi trường RPMI 1640 có bổ sung glutamin, 2-mercaptoethanol, gentamixin, và huyết thanh bào thai bê (dưới đây gọi là "FBS")), môi trường Dulbecco cải biến của Iscove (IMDM), hoặc môi trường Eagle cải biến của Dulbecco (DMEM). Trong trường hợp này, từ 3 đến 4 ngày trước khi tiến hành dung hợp tế bào, các tế bào được nuôi cấy chuyển tiếp trong môi trường bình thường (ví dụ, môi trường ASF104 (do Ajinomoto Co., Ltd. sản xuất) có chứa 10% FCS) để đảm bảo không ít hơn 2×10^7 tế bào vào ngày dung hợp tế bào.

(d) Dung hợp tế bào

Có thể tiến hành một cách thích hợp dung hợp giữa các tế bào sản sinh kháng thể và các tế bào u tuỷ theo phương pháp đã biết (Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987) của Weir, D. M.; Experimental Immunochemistry, Charles C

Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), của Kabat, E. A. và Mayer, M. M., v.v.), trong các điều kiện sao cho tỷ lệ sống sót của các tế bào không bị giảm đi quá mức.

Đối với phương pháp này, ví dụ, có thể sử dụng phương pháp hoá học trong đó các tế bào sản sinh kháng thể và các tế bào u tuỷ được trộn trong dung dịch có chứa polyme như là polyetylen glycol ở nồng độ cao, có thể sử dụng phương pháp vật lý sử dụng kích thích bằng điện, hoặc phương pháp tương tự. Trong số các phương pháp này, ví dụ cụ thể về phương pháp hoá học như được mô tả dưới đây.

Nghĩa là, trong trường hợp sử dụng polyethylene glycol trong dung dịch có chứa polyme ở nồng độ cao, các tế bào sản sinh kháng thể và các tế bào u tuỷ được trộn trong dung dịch polyethylene glycol có phân tử lượng từ 1500 đến 6000, tốt hơn là từ 2000 đến 4000 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C, tốt hơn là từ 35 đến 38°C trong khoảng từ 1 đến 10 phút, tốt hơn là từ 5 đến 8 phút.

(e) Chọn lọc nhóm các tế bào lai

Phương pháp chọn lọc các tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào nêu trên là không bị giới hạn cụ thể. Thông thường, sử dụng phương pháp chọn lọc HAT (hypoxanthin, aminopterin, thymidin) (Nature (1975), 256, trang 495 của Kohler và các đồng tác giả; Nature (1977), 266, trang 550 của Milstein và các đồng tác giả).

Phương pháp này có hiệu quả khi các tế bào lai được thu được bằng cách sử dụng các tế bào u tuỷ của giống thiếu hụt-HGPRT không thể sống sót với sự có mặt của aminopterin. Nghĩa là, bằng cách nuôi cấy các tế bào không được dung hợp và các tế bào lai trong môi trường HAT, chỉ các tế bào lai kháng lại aminopterin được chọn lọc để sống sót và tăng sinh.

(f) Tách dòng thành dòng tế bào đơn nhất (tách dòng)

Đối với phương pháp tách dòng các tế bào lai, có thể sử dụng phương pháp đã biết như phương pháp methylxenuloza, phương pháp agarosa mềm, hoặc phương pháp pha loãng giới hạn (xem, ví dụ: Selected Methods in Cellular

Immunology, W. H. Freeman và Company, San Francisco (1980) của Barbara, B. M. và Stanley, M. S.). Trong số các phương pháp này, cụ thể là, ưu tiên phương pháp nuôi cấy ba chiều như là phương pháp methylxenluloza. Ví dụ, nhóm các tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào được tạo huyền phù trong môi trường methylxenluloza như môi trường chọn lọc ClonaCell-HY D (do StemCell Technologies, Inc., sản xuất #03804) và nuôi cấy. Tiếp đó, thu gom các khuẩn lạc tế bào lai tạo thành, từ đó có thể thu được các tế bào lai đơn dòng. Nuôi cấy các khuẩn lạc tế bào lai tương ứng đã thu gom, và chọn lọc tế bào lai đã được xác nhận có hiệu giá kháng thể ổn định trong dịch nổi nuôi cấy tế bào lai thu được làm giống tế bào lai sản sinh kháng thể đơn dòng- TROP2.

Ví dụ về giống tế bào lai đã được xác định này bao gồm tế bào lai TROP2 TINA1. Trong bản mô tả này, một kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai TROP2 TINA1 được gọi là "kháng thể TINA1" hoặc đơn giản là "TINA1".

Vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 4 trong Danh mục trình tự.

(g) Điều chế kháng thể đơn dòng bằng cách nuôi cấy tế bào lai

Bằng cách nuôi cấy tế bào lai đã chọn lọc này, có thể thu được kháng thể đơn dòng một cách hiệu quả. Tuy nhiên, trước khi nuôi cấy, ưu tiên tiến hành sàng lọc tế bào lai mà sản sinh kháng thể đơn dòng đích.

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

Thực hiện xác định hiệu giá kháng thể theo sáng chế bằng, ví dụ, phương pháp ELISA được giải thích trong mục (b) nêu trên.

Tế bào lai thu được bằng phương pháp nêu trên có thể được bảo quản ở trạng thái đông lạnh trong nitơ lỏng trong tủ đá ở -80°C hoặc thấp hơn.

Sau khi hoàn thành bước tách dòng, thay đổi môi trường từ môi trường HT thành môi trường bình thường, và nuôi cấy tế bào lai.

Tiến hành nuôi cấy quy mô lớn bằng cách nuôi cấy luân phiên bằng cách sử dụng chai nuôi cấy lớn hoặc bằng cách nuôi cấy quay tròn. Từ dịch nổi thu được bằng cách nuôi cấy quy mô lớn, kháng thể đơn dòng mà gắn kết đặc hiệu với protein của sáng chế có thể thu được bằng cách tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này như lọc qua gel.

Ngoài ra, tiêm tế bào lai vào khoang bụng của chuột nhắt cùng giống như tế bào lai (ví dụ, BALB/c nêu trên) hoặc chuột nhắt Nu/Nu để tăng sinh tế bào lai, từ đó có thể thu được dịch cổ trướng có chứa lượng lớn kháng thể đơn dòng của sáng chế.

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

Ví dụ, chất ức chế miễn dịch trước đó được tiêm vào khoang bụng của chuột cùng giống như tế bào lai để làm bất hoạt tế bào T. 20 ngày sau đó, từ 10^6 đến 10^7 tế bào của dòng tế bào lai được tạo huyền phù trong môi trường không có huyết thanh (0,5 ml), và huyền phù này được sử dụng trong khoang bụng của chuột nhắt. Nói chung, khi bụng trướng lên và đầy dịch cổ trướng, thu gom dịch cổ trướng từ chuột này. Bằng phương pháp này, có thể thu được kháng thể đơn dòng ở nồng độ gấp khoảng 100 lần hoặc cao hơn so với nồng độ trong dung dịch nuôi cấy.

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

Kháng thể đơn dòng thu được theo cách này có tính đặc hiệu kháng nguyên cao đối với TROP2.

(h) Thử nghiệm kháng thể đơn dòng

Xác định isotyp và phân nhóm kháng thể đơn dòng thu được theo cách này như sau.

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

Phương pháp Ouchterlony là đơn giản, nhưng khi nồng độ kháng thể đơn dòng thấp, cần phải có quá trình ngưng tụ.

Mặt khác, khi sử dụng phương pháp ELISA hoặc phương pháp RIA, bằng cách cho dịch nổi nuôi cấy phản ứng trực tiếp pha rắn có hấp phụ-kháng nguyên và sử dụng các kháng thể tương ứng với nhiều loại isotyp globulin miễn dịch và các phân nhóm làm kháng thể thứ hai, có thể nhận dạng isotyp và phân nhóm của kháng thể đơn dòng.

Hơn nữa, cho phương pháp đơn giản hơn, bộ kit nhận dạng có bán sẵn trên thị trường (ví dụ, Mouse Typer Kit do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) hoặc kit tương tự cũng có thể được sử dụng.

Ngoài ra, có thể tiến hành xác định định lượng protein bằng phương pháp Folin Lowry và phương pháp tính toán dựa trên độ hấp thụ ở 280 nm ($1,4 (OD\ 280) = 1\text{ mg/ml globulin miễn dịch}$).

Ngoài ra, thậm chí khi thu được kháng thể đơn dòng một cách riêng rẽ và độc lập bằng cách lặp lại các bước từ (a) đến (h) trong (2), có thể thu được một kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính của kháng thể TINA1. Như một ví dụ của kháng thể này, lấy ví dụ một kháng thể mà gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1. Nếu kháng thể đơn dòng mới được sản xuất gắn kết với peptit bán phần hoặc cấu trúc bậc ba bán phần mà kháng thể TINA1 gắn kết với, có thể xác định được là kháng thể đơn dòng gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1. Ngoài ra, bằng cách xác nhận là kháng thể đơn dòng cạnh tranh với kháng thể TINA1 để gắn kết với TROP2 (nghĩa là, kháng thể đơn dòng ức chế gắn kết giữa kháng thể TINA1 và TROP2), có thể xác định là kháng thể đơn dòng gắn kết với cùng epitop như kháng thể kháng-TROP2 thậm chí nếu trình tự epitop hoặc cấu trúc đặc hiệu chưa được xác định. Khi xác

nhận được là kháng thể đơn dòng gắn kết với cùng epitop như kháng thể kháng-TROP2, kháng thể đơn dòng được cho là có ái lực gắn kết-kháng nguyên và hoạt tính sinh học tương đương với các tính chất này của kháng thể TINA1.

(3) Các kháng thể khác

Kháng thể của sáng chế không chỉ bao gồm kháng thể đơn dòng nêu trên kháng lại TROP2 mà còn bao gồm kháng thể tái tổ hợp thu được bằng cách cải biến nhân tạo để làm giảm tính kháng nguyên khác loài đối với người như là kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể của người. Các kháng thể này có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp đã biết.

Đối với kháng thể khảm, có thể lấy ví dụ kháng thể trong đó các vùng thay đổi và ổn định của kháng thể là thu được từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể khảm trong đó các vùng thay đổi của kháng thể thu được từ chuột nhắt hoặc chuột cống được nối với vùng ổn định của kháng thể thu được từ người (xem: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

Đối với kháng thể được làm tương thích với người, có thể lấy ví dụ một kháng thể thu được bằng tích hợp chỉ vùng xác định tính hỗ trợ (CDR) vào kháng thể thu được từ người (xem Nature (1986) 321, các trang 522-525), và kháng thể thu được bằng cách ghép một phần của gốc axit amin của trình tự khung cũng như trình tự CDR với kháng thể của người bằng phương pháp ghép-CDR (công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 90/07861).

Tuy nhiên, kháng thể được làm tương thích với người thu được từ kháng thể TINA1 không giới hạn ở kháng thể được làm tương thích với người đặc hiệu miễn là kháng thể được làm tương thích với người này có tất cả 6 loại trình tự CDR của kháng thể TINA1. Vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 có CDRH1 (TAGMQ) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 23 trong Danh mục trình tự, CDRH2 (WINTHSGVPKYAEDFKG) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 24 trong Danh mục trình tự, và CDRH3 (SGFGSSYWYFDV) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ

ID NO: 25 trong Danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 có CDRL1 (KASQDVSTAVA) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 26 trong Danh mục trình tự, CDRL2 (SASYRYT) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 27 trong Danh mục trình tự, và CDRL3 (QQHYITPLT) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 28 trong Danh mục trình tự.

Đối với ví dụ về kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể chuỗi TINA1, có thể lấy ví dụ tổ hợp tùy ý của chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng gồm có trình tự bất kỳ trong số (1) trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:14, hoặc SEQ ID NO:16 trong Danh mục trình tự, (2) trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (1) nêu trên, và (3) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin (1) nêu trên được khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự bất kỳ trong số (4) trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:20, hoặc SEQ ID NO:22 trong Danh mục trình tự, (5) trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (4) nêu trên, và (6) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin (4) nêu trên được khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung.

Thuật ngữ "một vài" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ từ 1 đến 10, từ 1 đến 9, từ 1 đến 8, từ 1 đến 7, từ 1 đến 6, từ 1 đến 5, từ 1 đến 4, từ 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2.

Đối với thay thế axit amin trong bản mô tả này, ưu tiên thay thế axit amin bảo toàn. Thay thế axit amin bảo toàn chỉ thay thế ở nhóm các axit amin có liên quan đến các mạch bên axit amin. Các nhóm axit amin được ưu tiên là như sau: nhóm axit (axit aspartic và axit glutamic); nhóm bazơ (lysin, arginin, và histidin); nhóm không phân cực (alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, phenylalanin, methionin, và tryptophan); và nhóm phân cực không tích điện (glyxin, asparagin, glutamin, cystein, serin, threonin, và tyrosin). Các nhóm axit

amin được ưu tiên hơn là như sau: nhóm hydroxy béo (serin và threonin); nhóm có chứa-amit (asparagin và glutamin); nhóm béo (alanin, valin, loxin, và isoloxin); và nhóm thơm (phenylalanin, tryptophan, và tyrosin). Thay thế axit amin này tốt hơn là trong khoảng trình tự mà không ảnh hưởng đến các tính chất của chất có trình tự axit amin ban đầu.

Đối với kháng thể có tổ hợp được ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của

SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22.

Ngoài ra, đối với kháng thể có tổ hợp được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có

các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

Đối với kháng thể có tổ hợp được ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22.

Ngoài ra, đối với một kháng thể có một tổ hợp được ưu tiên hơn khác của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có

trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22.

Đối với một kháng thể có tổ hợp được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

Ngoài ra, đối với một kháng thể có tổ hợp được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình

tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

Bằng cách kết hợp một trình tự có mức tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nặng được mô tả ở trên với trình tự có mức tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nhẹ được mô tả ở trên, có thể chọn lọc một kháng thể có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của từng kháng thể trong số các kháng thể nêu trên. Mức tương đồng này nói chung là 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là mức tương đồng 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là mức tương đồng 95% hoặc cao hơn, tốt nhất là mức tương đồng 99% hoặc cao hơn. Ngoài ra, bằng cách kết hợp trình tự axit amin trong đó từ một đến một vài gốc axit amin được thay thế, khuyết đoạn hoặc bổ sung trong trình tự axit amin chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, cũng có thể chọn lọc một kháng thể có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của từng kháng thể trong số các kháng thể nêu trên.

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

Trong trình tự axit amin chuỗi nặng được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 hoặc SEQ ID NO: 16 trong Danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 là vùng thay đổi, và trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 141 đến 470 là vùng ổn định. Trình tự của SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 và SEQ ID NO:16 tương ứng được thể hiện trên Fig. 3, Fig. 4 và Fig. 5.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO: 22 trong Danh mục trình tự, trình tự

axit amin gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 là vùng thay đổi, và trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 là vùng ổn định. Trình tự của SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 22 tương ứng được thể hiện trên Fig. 6, Fig.7 và Fig.8.

Ngoài ra, kháng thể của sáng chế bao gồm kháng thể của người mà gắn kết với TROP2. Kháng thể kháng-TROP2 của người chỉ kháng thể của người chỉ có trình tự của một kháng thể thu được từ nhiễm sắc thể của người. Kháng thể kháng-TROP2 của người có thể thu được bằng phương pháp sử dụng chuột sản sinh-kháng thể của người có mảnh nhiễm sắc thể của người bao gồm các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của người (xem: Nature Genetics (1997) 16, các trang 133-143 của Tomizuka, K. và các đồng tác giả; Nucl. Acids Res. (1998) 26, các trang 3447-3448 của Kuroiwa, Y. và các đồng tác giả; Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects tập 10, các trang 69-73 của Yoshida, H. và các đồng tác giả, (Kitagawa, Y., Matuda, T. và Iijima, S. biên tập), Kluwer Academic Publishers, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, các trang 722-727 của Tomizuka, K. và các đồng tác giả, v.v.).

Chuột sản sinh-kháng thể của người có thể được tạo ra cụ thể như sau. Động vật biến đổi gen trong đó locus gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch nội sinh đã bị phá vỡ, và thay vào đó, gen trong đó locus gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của người được đưa vào thông qua vật truyền nhiễm sắc thể nấm men (YAC) hoặc vật truyền tương tự được tạo ra bằng cách tạo ra con khuyết gen và con chuyển gen và cho các con này giao phối với nhau.

Ngoài ra, theo kỹ thuật ADN tái tổ hợp, bằng cách sử dụng ADN hỗ trợ mã hoá lần lượt chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của người, và tốt hơn là vật truyền bao gồm ADN hỗ trợ này, các tế bào có nhân điển hình được biến nạp, và tế bào biến nạp sản sinh kháng thể đơn dòng của người tái tổ hợp được nuôi cấy, từ đó cũng có thể thu được kháng thể này từ dịch nổi nuôi cấy.

Ở đây, để làm vật chủ, ví dụ, có thể sử dụng các tế bào có nhân điển hình, tốt hơn là các tế bào động vật có vú như các tế bào CHO, các lympho bào, hoặc các tế bào u tủy.

Ngoài ra, phương pháp thu được kháng thể của người thu được từ bộ lọc thực khuẩn thể được chọn từ thư viện kháng thể của người (xem: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), các trang 2301-2308 của Wormstone, I. M. và các đồng tác giả; *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), các trang 189-203 của Carmen, S. và các đồng tác giả; *Ophthalmology* (2002) 109 (3), các trang 427-431 của Siriwardena, D. và các đồng tác giả, v.v.) cũng là đã biết.

Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp bộ lọc thực khuẩn thể trong đó vùng thay đổi kháng thể của người được biểu hiện trên bề mặt của thực khuẩn thể dưới dạng kháng thể đơn-chuỗi (scFv), và thực khuẩn thể mà gắn kết với kháng nguyên được chọn lọc (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), các trang 1105-1116).

Bằng cách phân tích gen của thực khuẩn thể được chọn lọc dựa trên khả năng gắn kết với kháng nguyên, có thể xác định trình tự ADN mã hoá vùng thay đổi của kháng thể của người mà gắn kết với kháng nguyên.

Nếu trình tự ADN của scFv mà gắn kết với kháng nguyên được xác định, kháng thể của người có thể thu được bằng điều chế vật truyền biểu hiện bao gồm trình tự và đưa vật truyền này vào vật chủ thích hợp để biểu hiện nó (các Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12, các trang 433-455; *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), các trang 1105-1116).

Nếu kháng thể của người mới sản sinh gắn kết với peptit bán phần hoặc cấu trúc bậc ba bán phần mà kháng thể TINA1 gắn kết với, có thể xác định được là kháng thể của người này gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1. Ngoài ra, bằng cách xác nhận là kháng thể của người cạnh tranh với kháng thể TINA1

để gắn kết với TROP2 (nghĩa là, kháng thể của người ức chế sự gắn kết giữa kháng thể TINA1 và TROP2), có thể xác định được là kháng thể của người gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1 cho dù trình tự epitop hoặc cấu trúc đặc hiệu chưa xác định được. Khi xác nhận được rằng kháng thể của người gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1, kháng thể của người được cho là có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của kháng thể TINA1.

Các kháng thể khảm, các kháng thể được làm tương thích với người, hoặc các kháng thể của người thu được bằng phương pháp nêu trên được đánh giá về tính chất gắn kết với kháng nguyên bằng phương pháp đã biết hoặc phương pháp tương tự, và có thể chọn lọc kháng thể được ưu tiên.

Cho ví dụ về một chỉ số khác để sử dụng trong việc so sánh các tính chất của các kháng thể, có thể lấy ví dụ độ ổn định của các kháng thể. Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) là thiết bị có khả năng xác định nhanh chóng và chính xác nhiệt độ trung điểm biến tính nhiệt (T_m) sẽ sử dụng làm chỉ số ưu tiên về độ ổn định cấu dạng tương đối của các protein. Bằng cách xác định các giá trị T_m sử dụng DSC và so sánh các giá trị này, có thể so sánh mức chênh lệch độ ổn định nhiệt. Đã biết là độ ổn định bảo quản của các kháng thể thể hiện sự tương quan với độ ổn định nhiệt của các kháng thể (Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, các trang 265-273 của Lori Burton, và các đồng tác giả), và có thể chọn lọc kháng thể được ưu tiên bằng cách sử dụng độ ổn định nhiệt như là một chỉ số. Các ví dụ về các chỉ số khác để chọn lọc các kháng thể bao gồm các dấu hiệu sau: hiệu suất ở tế bào chủ thích hợp là cao; và khả năng kết tụ trong dung dịch nước là thấp. Ví dụ, một kháng thể mà thể hiện hiệu suất cao nhất không phải lúc nào cũng thể hiện độ ổn định nhiệt cao nhất, và do đó, cần thiết chọn lọc một kháng thể thích hợp nhất để sử dụng cho người bằng cách so sánh toàn diện dựa trên các chỉ số nêu trên.

Theo sáng chế, cũng bao gồm biến thể được cải biến của kháng thể này. Biến thể được cải biến chỉ biến thể thu được bằng cách cải biến hoá học hoặc sinh học kháng thể của sáng chế. Các ví dụ về biến thể được cải biến hoá học bao gồm các biến thể được cải biến hoá học bằng cách liên kết nhóm hoá học

với khung axit amin, các biến thể được cải biến hoá học với mạch hydrat cacbon được liên kết qua-N hoặc -O, v.v.. Ví dụ về biến thể được cải biến hoá học bao gồm các biến thể thu được bằng cách cải biến sau dịch mã (như glycosyl hoá liên kết qua-N hoặc -O, xử lý đầu tận cùng-N hoặc -C, khử amit hoá, đồng phân hoá axit aspartic, hoặc oxi hoá methionin), và các biến thể, trong đó gốc methionin đã được thêm vào đầu tận cùng N bằng cách cho biểu hiện ở tế bào chủ chưa có nhân điển hình.

Ngoài ra, một kháng thể được đánh dấu sao cho tạo điều kiện để phát hiện hoặc phân tách kháng thể này hoặc kháng nguyên của sáng chế, ví dụ, kháng thể được đánh dấu bằng-enzym, kháng thể được đánh dấu-huỳnh quang, và kháng thể được đánh dấu-ái lực cũng được bao gồm trong định nghĩa biến thể được cải biến. Biến thể được cải biến của kháng thể của sáng chế là hữu ích để cải thiện độ ổn định và lưu giữ trong máu của kháng thể này, giảm tính kháng nguyên của nó, phát hiện hoặc phân tách một kháng thể hoặc kháng nguyên, và v.v..

Ngoài ra, bằng cách điều hoà cải biến glycan được liên kết với kháng thể của sáng chế (glycosyl hoá, khử fucosyl hoá, v.v.), có thể làm tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Đối với kỹ thuật để điều hoà cải biến glycan của các kháng thể, các công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140, v.v. là đã biết. Tuy nhiên, không giới hạn ở kỹ thuật này. Trong kháng thể của sáng chế, cũng bao gồm một kháng thể trong đó cải biến glycan được điều hoà.

Trong trường hợp, một kháng thể được sản xuất trước tiên bằng cách phân lập một gen kháng thể và tiếp đó đưa gen này vào vật chủ thích hợp, có thể sử dụng tổ hợp vật chủ thích hợp và vật truyền biểu hiện thích hợp. Các ví dụ cụ thể về gen kháng thể này bao gồm tổ hợp của gen mã hoá trình tự chuỗi nặng của một kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và gen mã hoá trình tự chuỗi nhẹ của nó. Khi tế bào chủ được biến nạp, có thể cài xen gen trình tự chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ vào cùng một vật truyền biểu hiện, và cũng có thể cài xen vào các vật truyền biểu hiện khác nhau một cách riêng rẽ.

Trong trường hợp, các tế bào có nhân điển hình được sử dụng làm vật chủ, có thể sử dụng các tế bào động vật, các tế bào thực vật và các vi sinh vật có nhân điển hình. Đối với các tế bào động vật, có thể lấy ví dụ các tế bào động vật có vú, ví dụ, các tế bào COS (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, các trang 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi của chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. và Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, các trang 4126-4220) của tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61).

Trong trường hợp sử dụng các tế bào chưa có nhân điển hình, ví dụ, có thể lấy ví dụ *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*.

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

Đã biết là gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy được loại bỏ (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), và cũng đã biết rằng hai gốc axit amin (glyxin và lysin) ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy được loại bỏ và gốc prolin mới ở vị trí đầu tận cùng carboxyl được amit hoá (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Tuy nhiên, việc khuyết đoạn và cải biến trình tự chuỗi nặng không ảnh hưởng đến ái lực gắn kết-kháng nguyên và chức năng hiệu ứng (hoạt hoá bổ thể, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, v.v.) của kháng thể này. Do đó, kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm một kháng thể

được cải biến và mảnh hoạt động của kháng thể này, và biến thể khuyết đoạn trong đó một hoặc hai axit amin đã được khuyết đoạn ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng, biến thể thu được bằng cách amit hoá biến thể khuyết đoạn (ví dụ, chuỗi nặng trong đó gốc prolin đầu tận cùng carboxyl đã được amit hoá), và biến thể tương tự. Loại biến thể khuyết đoạn có khuyết đoạn ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế không giới hạn ở các biến thể nêu trên miễn là ái lực gắn kết-kháng nguyên và chức năng hiệu ứng được bảo toàn. Hai chuỗi nặng cấu thành kháng thể theo sáng chế có thể thuộc loại được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và biến thể khuyết đoạn nêu trên, hoặc có thể thuộc hai loại kết hợp hai biến thể này được chọn lọc. Tỷ lệ khối lượng của mỗi biến thể khuyết đoạn có thể bị ảnh hưởng bởi loại tế bào động vật có vú được nuôi cấy mà sản xuất kháng thể theo sáng chế và điều kiện nuôi cấy, tuy nhiên, có thể lấy ví dụ trường hợp khi một gốc axit amin ở đầu tận cùng carboxyl đã được khuyết đoạn ở cả hai chuỗi nặng có chứa như là các thành phần chính trong kháng thể theo sáng chế.

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

Đối với hoạt tính sinh học của kháng thể, nói chung có thể lấy ví dụ hoạt tính gắn kết-kháng nguyên, hoạt tính nhập nội ở các tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng cách gắn kết với kháng nguyên này, hoạt tính trung hoà hoạt tính kháng nguyên, hoạt tính làm tăng cường hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và hoạt tính thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP). Chức năng của kháng thể của sáng chế là hoạt tính gắn kết với TROP2, tốt hơn là hoạt tính nhập nội ở các tế bào biểu hiện-TROP2 bằng cách gắn kết với TROP2. Ngoài ra, kháng thể của sáng chế có thể có hoạt tính ADCC, hoạt tính CDC, và/hoặc hoạt tính ADCP ngoài hoạt tính nhập nội tế bào.

Kháng thể thu được có thể được tinh chế đến đồng nhất. Có thể tiến hành phân tách và tinh chế kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp phân tách và tinh chế protein thông thường. Ví dụ, kháng thể có thể được phân tách và tinh

chế bằng cách chọn lọc thích hợp và kết hợp sắc ký cột, lọc, siêu lọc, kết tủa bằng muối, thẩm tách, điện di gel polyacrylamit điều chế, điện di tâm đẳng điện, và phương pháp tương tự (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996) do Daniel R. Marshak và các đồng tác giả biên tập; Antibodies: A Laboratory Manual. của Ed Harlow và David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), nhưng không giới hạn ở phương pháp này.

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

Có thể tiến hành sắc ký này bằng cách sử dụng sắc ký lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Đối với cột sẽ sử dụng trong sắc ký ái lực, có thể lấy ví dụ cột Protein A và cột Protein G. Ví dụ, đối với cột sử dụng cột Protein A, có thể lấy ví dụ Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) và cột tương tự.

Ngoài ra, bằng cách sử dụng chất mang có kháng nguyên được cố định trên đó, cũng có thể tinh chế kháng thể bằng cách sử dụng tính chất gắn kết của kháng thể với kháng nguyên.

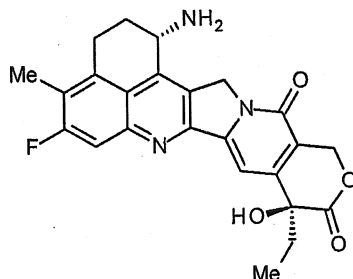
[Hợp chất kháng khối u]

Hợp chất kháng khối u sẽ được liên hợp với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế được mô tả. Hợp chất kháng khối u được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể nếu là hợp chất có tác dụng kháng khối u và nhóm thể hoặc cấu trúc bán phần cho phép kết nối với cấu trúc liên kết. Khi một phần hoặc toàn bộ liên kết được phân giải trong các tế bào khối u, nhóm hợp chất kháng khối u được giải phóng thể hiện tác dụng kháng khối u của hợp chất kháng khối u. Khi liên kết được phân giải ở vị trí kết nối với dược chất hợp chất kháng khối u được giải phóng ở cấu trúc chưa được cải biến của nó thể hiện tác dụng kháng khối u vốn có của nó.

Đối với hợp chất kháng khối u được sử dụng trong sáng chế, tốt hơn là có thể sử dụng exatecan (((1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-

methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dion; được thể hiện trong công thức dưới đây), một trong số các dẫn xuất camptothecin.

[Công thức 14]



Mặc dù có tác dụng kháng khối u tuyệt vời, exatecan chưa được đưa ra thị trường làm thuốc kháng khối u. Hợp chất này có thể dễ dàng thu được bằng phương pháp đã biết và nhóm amino ở vị trí 1 có thể tốt hơn là được sử dụng như vị trí kết nối với cấu trúc liên kết. Ngoài ra, mặc dù exatecan cũng có thể được giải phóng ở các tế bào khối u trong khi một phần của liên kết vẫn được gắn liền với nó, đây là một hợp chất tuyệt vời thể hiện tác dụng kháng khối u tuyệt vời thậm chí ở cấu trúc này.

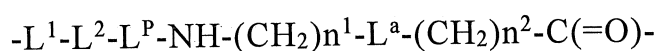
Do exatecan có cấu trúc camptothecin, đã biết là nó dịch chuyển cân bằng sang cấu trúc có vòng lacton đóng (vòng đóng) trong môi trường nước axit (ví dụ, pH 3 hoặc tương tự) nhưng dịch chuyển sang cấu trúc có vòng lacton mở (vòng mở) trong môi trường nước bazơ (ví dụ, pH = 10 hoặc tương tự). Thể liên hợp thuốc được đưa vào gốc exatecan tương ứng với cấu trúc vòng đóng và cấu trúc vòng mở được cho là có cùng tác dụng kháng khối u và không cần phải nói là trạng thái bất kỳ trong số các trạng thái này là thuộc phạm vi của sáng chế.

Các ví dụ khác về hợp chất kháng khối u có thể bao gồm doxorubixin, daunorubixin, mitomycin C, bleomycin, cycloxytidin, vincristin, vinblastin, methotrexat, tác nhân kháng khối u dựa trên-platin (cisplatin hoặc các dẫn xuất của nó), taxol hoặc các dẫn xuất của nó, và camptothecin hoặc các dẫn xuất của nó (tác nhân kháng khối u được mô tả trong Bảng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 6-87746).

Đối với thể liên hợp thuốc-kháng thể, số lượng các phân tử thuốc được liên hợp/phân tử kháng thể là yếu tố then chốt có ảnh hưởng đến hiệu lực và tính an toàn. Tiến hành sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể bằng cách xác định điều kiện phản ứng bao gồm các lượng nguyên liệu và chất thử sử dụng cho phản ứng sao cho có số lượng hằng định các phân tử thuốc được liên hợp, và thể liên hợp thuốc-kháng thể nói chung thu được dưới dạng hỗn hợp có chứa số lượng khác nhau của các phân tử thuốc được liên hợp, khác với phản ứng hoá học của hợp chất có phân tử lượng thấp. Số lượng thuốc được liên hợp trong một phân tử kháng thể được biểu hiện hoặc xác định cụ thể bằng giá trị trung bình, nghĩa là, số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp. Trừ khi được mô tả cụ thể theo cách khác theo nguyên tắc, số lượng của các phân tử thuốc được liên hợp nghĩa là giá trị trung bình trừ trường hợp, trong đó giá trị này biểu thị thể liên hợp thuốc-kháng thể có số lượng cụ thể của các phân tử thuốc được liên hợp mà được bao gồm trong một hỗn hợp thể liên hợp thuốc-kháng thể có số lượng khác nhau của các phân tử thuốc được liên hợp. Số lượng các phân tử exatecan được liên hợp với một phân tử kháng thể là có thể kiểm soát được, và như số lượng trung bình các phân tử thuốc được liên hợp/kháng thể, khoảng từ 1 đến 10 exatecan có thể được kết nối. Tốt hơn là từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa là từ 3 đến 8. Trong khi đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thiết kế phản ứng để liên hợp số lượng cần thiết của các phân tử thuốc với một phân tử kháng thể dựa trên phần mô tả các Ví dụ của sáng chế và có thể thu được thể liên hợp thuốc-kháng thể với số lượng được kiểm soát của các phân tử exatecan.

[Cấu trúc Liên kết]

Đối với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế, cấu trúc liên kết để liên hợp hợp chất kháng khối u với kháng thể kháng-TROP2 được mô tả. Liên kết này có cấu trúc có công thức dưới đây:

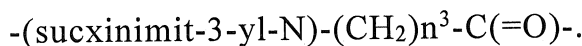


Kháng thể được nối với đầu tận cùng của L^1 (đầu đối diện với đầu tận cùng nối với L^2), và hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

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

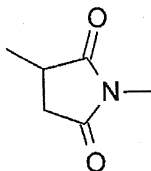
1. L^1

L^1 được biểu thị bằng cấu trúc



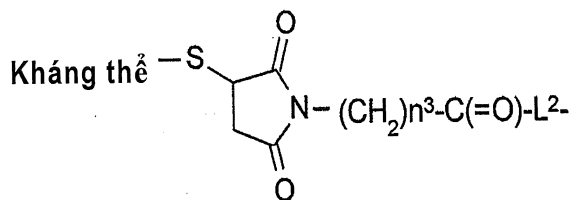
Trong công thức trên, n^3 là số nguyên từ 2 đến 8, và " $-(\text{succinimit-3-yl-N})-$ " có công thức cấu tạo:

[Công thức 15]



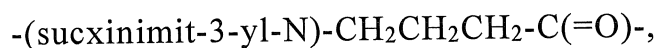
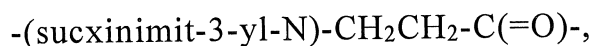
Vị trí 3 của cấu trúc bán phần nêu trên là vị trí kết nối với kháng thể kháng-TROP2. Liên kết với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 đặc trưng ở chỗ tạo liên kết với sự tạo thành thioete. Nguyên tử nitơ ở vị trí 1 của nhóm cấu trúc được nối với nguyên tử cacbon của metylen mà có mặt trong liên kết bao gồm cấu trúc. Cụ thể là, $-(\text{succinimit-3-yl-N})-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-$ là cấu trúc được biểu thị bằng công thức dưới đây (trong bản mô tả này, "kháng thể-S-" có nguồn gốc từ một kháng thể).

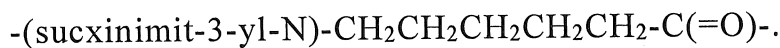
[Công thức 16]



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

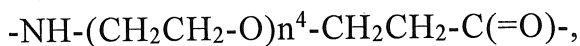
Ví dụ cụ thể của L^1 có thể bao gồm





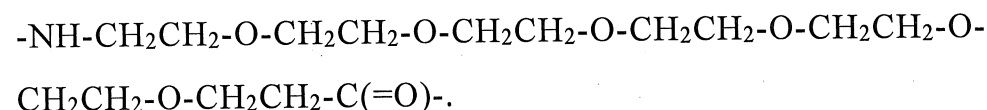
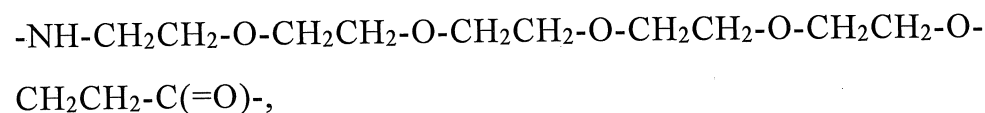
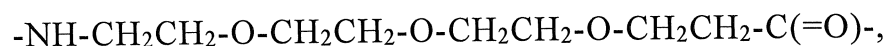
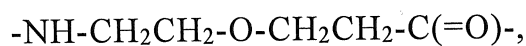
2. L^2

L^2 là liên kết được biểu thị bằng cấu trúc dưới đây:



L^2 có thể không có mặt, và trong trường hợp này, L^2 là liên kết đơn. Trong cấu trúc trên, n^4 là số nguyên từ 1 đến 6, và tốt hơn là từ 2 đến 4. L^2 được nối với L^1 ở nhóm amino đầu tận cùng của nó và được nối với L^P ở nhóm carbonyl của nó ở đầu tận cùng còn lại.

Các ví dụ cụ thể của L^2 có thể bao gồm



3. L^P

L^P là gốc peptit gồm có từ 2 đến 7 axit amin. Cụ thể là, nó gồm có gốc oligopeptit trong đó từ 2 đến 7 axit amin được liên kết với nhau bằng liên kết peptit. L^P được nối với L^2 ở đầu tận cùng N của nó và được nối với nhóm amino của nhóm $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})$ của liên kết ở đầu tận cùng C của nó.

Axit amin cấu thành L^P trong liên kết này là không bị giới hạn cụ thể, tuy nhiên, các ví dụ về các axit amin này bao gồm L- axit amin hoặc D- axit amin, tốt hơn là L-axit amin. Và, có thể là axit amin có cấu trúc như β -alanin, axit ϵ -

aminocaproic, hoặc axit γ -aminobutyric ngoài axit α -amino, ngoài ra, có thể là axit amin loại không có trong tự nhiên như axit amin được N-metyl hoá.

Trình tự axit amin của L^P là không bị giới hạn cụ thể, nhưng các ví dụ về axit amin cấu thành bao gồm phenylalanin (Phe; F), tyrosin (Tyr; Y), leucin (Leu; L), glyxin (Gly; G), alanin (Ala; A), valin (Val; V), lysin (Lys; K), xitrullin (Cit), serin (Ser; S), axit glutamic (Glu; E), và axit aspartic (Asp; D).

Trong số các axit amin này, các ví dụ được ưu tiên bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic. Tùy thuộc vào loại axit amin, kiểu giải phóng thuốc có thể được kiểm soát. Số lượng axit amin có thể nằm trong khoảng từ 2 đến 7.

Các ví dụ cụ thể của L^P có thể bao gồm

-GGF-,
 -DGGF-,
 -(D-)D-GGF-,
 -EGGF-,
 -GGFG-,
 -SGGF-,
 -KGGF-,
 -DGGFG-,
 -GGFGG-,
 -DDGGFG-,
 -KDGGFG-,
 -GGFGGGF-.

Trong công thức trên, "(D-)D" là D-axit aspartic.

Các ví dụ được ưu tiên đặc biệt của L^P cho thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế có thể bao gồm gốc tetrapeptit -GGFG-.

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

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

Các ví dụ về $L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ có thể bao gồm các nhóm có cấu trúc dưới đây:

- $-O-CH_2-C(=O)-$,
- $-O-CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-O-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-O-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-O-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-CH_2-C(=O)-$,
- $-CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$.

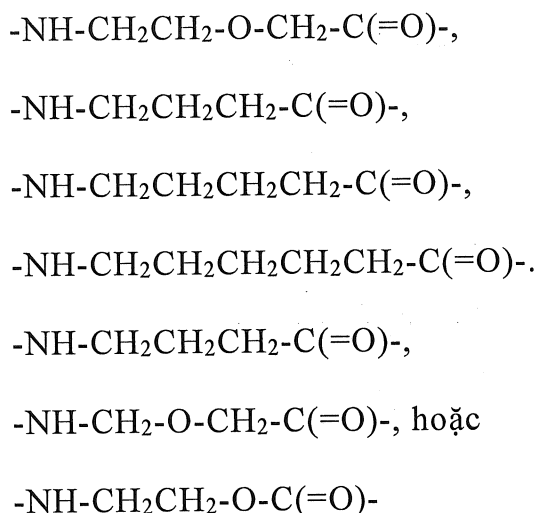
Trong số các nhóm này,

- $-O-CH_2-C(=O)-$,
- $-O-CH_2CH_2-C(=O)-$, hoặc

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

Các ví dụ cụ thể của cấu trúc được biểu thị bằng $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ trong liên kết có thể bao gồm

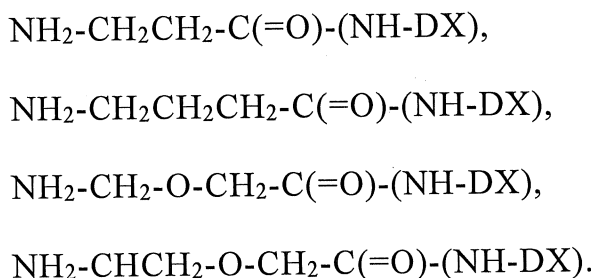
- $-NH-CH_2-C(=O)-$,
- $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$,
- $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$,
- $-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$,



là được ưu tiên hơn.

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

Đối với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế, xét đến là khi thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 được chuyển vào bên trong các tế bào khối u, nhóm liên kết bị phân giải và dẫn xuất thuốc có trúc được biểu thị bằng $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}^{n^2}\text{-C(=O)-(NH-DX)}$ được giải phóng để biểu hiện tác dụng kháng khối u. Các ví dụ về dẫn xuất kháng khối u thể hiện tác dụng kháng khối u bằng cách giải phóng từ thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế bao gồm dẫn xuất kháng khối u có nhóm cấu trúc trong đó cấu trúc này được biểu thị bằng $\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}^{n^2}\text{-C(=O)-}$ của liên kết có nhóm amino đầu tận cùng, và được đặc biệt ưu tiên bao gồm các nhóm dưới đây.



Tuy nhiên, trong trường hợp $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$, đã xác nhận được rằng do cấu trúc amin trong phân tử không bền, cấu trúc này bị tự phân huỷ để giải phóng nhóm dưới đây $\text{HO-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$. Các hợp

chất đó có thể tốt hơn là được sử dụng làm hợp chất trung gian sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế.

Đối với thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế trong đó exatecan được sử dụng làm thuốc, tốt hơn là nhóm cấu trúc liên kết-thuốc $[-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-(NH-DX)]$ có cấu trúc dưới đây được nối với một kháng thể. Số lượng được liên hợp trung bình của nhóm cấu trúc liên kết-thuốc này/phân tử kháng thể có thể từ 1 đến 10. Tốt hơn là, từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa là từ 3 đến 8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Trong số các cấu trúc này, ưu tiên hơn các cấu trúc dưới đây.

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Được đặc biệt ưu tiên là các cấu trúc dưới đây.

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Đối với cấu trúc liên kết để liên hợp kháng thể kháng-TROP2 và thuốc trong thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế, liên kết được ưu tiên có thể được xây dựng cấu trúc bằng cách kết nối các cấu trúc được ưu tiên được thể hiện cho từng phần của liên kết này được mô tả ở trên. Đối với cấu trúc liên kết, các liên kết có cấu trúc dưới đây tốt hơn là được sử dụng. Tuy nhiên, đầu tận

cùng bên trái của cấu trúc này là vị trí kết nối với kháng thể và đầu tận cùng bên phải là vị trí kết nối với thuốc.

- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Trong số chúng, được ưu tiên hơn là các cấu trúc dưới đây.

- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Được đặc biệt ưu tiên là các cấu trúc dưới đây.

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

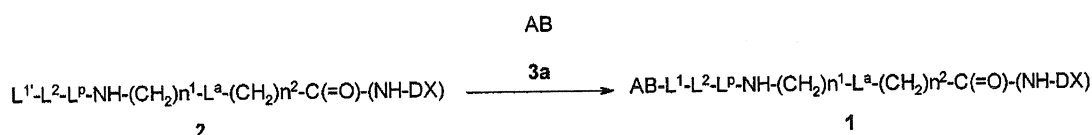
[Phương pháp sản xuất]

Tiếp theo mô tả phương pháp đại diện để sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế hoặc hợp chất trung gian sản xuất của chúng. Các hợp chất được mô tả dưới đây với số hợp chất được thể hiện trong từng công thức phản ứng. Cụ thể là, các hợp chất này được gọi là "hợp chất có công thức (1)", "hợp chất (1)", hoặc hợp chất tương tự. Các hợp chất có số không phải là các hợp chất này cũng được mô tả tương tự.

1. Phương pháp sản xuất 1

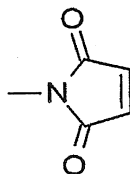
Thể liên hợp thuốc-kháng thể được biểu thị bằng công thức (1) mà được nối với cấu trúc liên kết-thuốc qua thioete ví dụ có thể được sản xuất bằng phương pháp sau đây.

[Công thức 17]



[Trong công thức, AB là một kháng thể có nhóm sulfhydryl, và L¹ là cấu trúc liên kết L¹ trong đó đầu tận cùng liên kết là nhóm maleimetyl (công thức được thể hiện dưới đây)

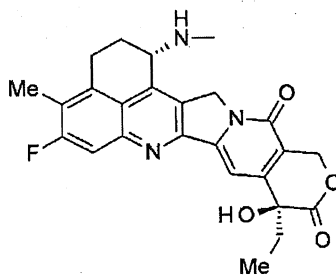
[Công thức 18]



(trong công thức, nguyên tử nitơ là vị trí kết nối),

và cụ thể là nhóm trong đó nhóm -(succinimit-3-yl-N)- trong -(succinimit-3-yl-N)-(CH₂)_n³-C(=O)- của L¹ là nhóm maleimetyl. Ngoài ra, -(NH-DX) là cấu trúc có công thức sau đây:

[Công thức 19]



và là nhóm mà thu được bằng cách tách loại một nguyên tử hydro của nhóm amino ở vị trí 1 của exatecan.]

Ngoài ra, hợp chất có công thức (1) trong công thức phản ứng nêu trên được hiểu là cấu trúc trong đó một nhóm cấu trúc tương ứng từ thuốc kết nối đầu tận cùng liên kết với một kháng thể. Tuy nhiên, chỉ mô tả cho thuận tiện, và thực tế có nhiều trường hợp, trong đó nhiều nhóm cấu trúc được nối với một phân tử kháng thể. Nguyên tắc này cũng áp dụng cho phần mô tả phương pháp sản xuất nêu dưới đây.

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

Kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl có thể thu được bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (Bioconjugate Techniques, các trang 56-136, các trang 456-493, Academic Press (1996) của Hermanson, G.T.). Các ví dụ bao gồm: cho thuốc thử Traut phản ứng với nhóm amino của kháng thể; N-succinimityl S-axetylthioalkanoat được cho phản ứng với nhóm amino của kháng thể, tiếp đó phản ứng với hydroxylamin; sau khi cho phản ứng với N-succinimityl 3-(pyridyldithio)propionat, kháng thể được cho phản ứng với tác nhân khử hoá; kháng thể được cho phản ứng với tác nhân khử hoá như là dithiothreitol, 2-mercaptoetanol, và tris(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua (TCEP) để khử liên kết disulfua ở phần bản lề của kháng thể để tạo thành nhóm sulfhydryl, nhưng không giới hạn ở quy trình này.

Cụ thể là, sử dụng từ 0,3 đến 3 đương lượng mol của TCEP làm tác nhân khử hoá/disulfua trong phần bản lề của kháng thể và cho phản ứng với kháng thể này trong dung dịch đệm có chứa tác nhân chelat hoá, có thể thu được kháng thể có disulfua được khử hoá một phần hoặc toàn phần trong phần bản lề của kháng thể. Các ví dụ về tác nhân chelat hoá bao gồm axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA) và axit dietylentriamin pentaaxetic (DTPA). Tác nhân này có thể được sử dụng ở nồng độ từ 1 mM đến 20 mM. Các ví dụ về dung dịch đệm mà có thể sử dụng bao gồm dung dịch chứa natri phosphat, natri borat, hoặc natri axetat. Cụ thể là, bằng cách cho kháng thể phản ứng với TCEP ở nhiệt độ từ 4°C đến 37°C trong từ 1 đến 4 giờ, có thể thu được kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl được khử hoá một phần hoặc hoàn toàn.

Tuy nhiên, bằng cách tiến hành phản ứng để bổ sung nhóm sulfhydryl vào nhóm liên kết-thuốc, nhóm liên kết-thuốc có thể được liên hợp qua liên kết thioete.

Sử dụng từ 2 đến 20 đương lượng mol của hợp chất (2)/kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl, có thể sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) trong đó từ 2 đến 8 phân tử thuốc được liên hợp/kháng thể. Cụ thể là, thêm dung dịch có chứa hợp chất (2) được hoà tan trong đó vào dung dịch đệm có chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl cho phản ứng, là đủ. Ở đây, các ví dụ về dung dịch đệm mà

có thể sử dụng bao gồm dung dịch natri axetat, natri phosphat, và natri borat. pH cho phản ứng là từ 5 đến 9, và tốt hơn nữa là tiến hành phản ứng ở pH gần 7. Ví dụ về dung môi để hoà tan hợp chất (2) bao gồm dung môi hữu cơ như dimethyl sulfoxit (DMSO), dimethylformamit (DMF), dimethyl axetamit (DMA), và N-metyl-2-pyridon (NMP).

Thêm dung dịch dung môi hữu cơ có chứa hợp chất (2) được hoà tan trong đó ở nồng độ từ 1 đến 20% thể tích/thể tích vào dung dịch đệm có chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl cho phản ứng là đủ. Nhiệt độ phản ứng là từ 0 đến 37°C, tốt hơn nữa là từ 10 đến 25°C, và thời gian phản ứng là từ 0,5 đến 2 giờ. Dừng phản ứng bằng cách làm bất hoạt tính phản ứng của hợp chất (2) chưa phản ứng với thuốc thử có chứa-thiol. Ví dụ về thuốc thử có chứa-thiol bao gồm xystein và N-axetyl-L-xystein (NAC). Cụ thể hơn là, thêm từ 1 đến 2 đương lượng mol của NAC vào hợp chất (2) được sử dụng và, bằng cách ủ ở nhiệt độ trong phòng trong từ 10 đến 30 phút, có thể dừng phản ứng.

Thế liên hợp thuốc-kháng thể (1) được sản xuất, sau khi cô, có thể được tinh chế trao đổi đệm, và xác định nồng độ kháng thể và số lượng trung bình các phân tử thuốc được liên hợp/phân tử kháng thể theo các quy trình chung được mô tả dưới đây, nhận dạng thế liên hợp thuốc-kháng thể (1).

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

Cho vào ống ly tâm Amicon Ultra (50,000 MWCO, Millipore Corporation), dung dịch kháng thể hoặc thế liên hợp thuốc-kháng thể và dung dịch chứa kháng thể này hoặc thế liên hợp thuốc-kháng thể được cô bằng cách ly tâm (ly tâm trong khoảng thời gian từ 5 đến 20 phút ở tốc độ từ 2000 G đến 3800 G) sử dụng máy ly tâm (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Quy trình chung B: Xác định nồng độ kháng thể

Sử dụng bộ phát hiện UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), tiến hành xác định nồng độ kháng thể theo phương pháp do nhà sản xuất xác

định. Đồng thời, sử dụng hệ số hấp thụ ở 280 nm khác biệt cho từng kháng thể (từ $1,3 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ đến $1,8 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

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

Cân bằng cột NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) sử dụng chất mang Sephadex G-25 bằng dịch đệm phosphat (10 mM, pH 6,0; được gọi là PBS6,0/EDTA trong bản mô tả này) có chứa natri clorua (137 mM) và axit etylen diamin tetraaxetic (EDTA, 5 mM) theo phương pháp do nhà sản xuất xác định. Dung dịch nước chứa kháng thể được áp dụng với lượng 2,5 mL một cột NAP-25, và tiếp đó thu gom phân đoạn (3,5 mL) được rửa giải bằng 3,5 mL PBS6,0/EDTA. Cô phân đoạn thu được bằng Quy trình chung A. Sau khi xác định nồng độ của kháng thể bằng cách sử dụng Quy trình chung B, điều chỉnh nồng độ kháng thể đến 10 mg/mL bằng cách sử dụng PBS6,0/EDTA.

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

Cân bằng cột NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) bằng cách sử dụng chất mang Sephadex G-25 bằng dịch đệm phosphat (50 mM, pH 6,5; được gọi là PBS6,5/EDTA trong bản mô tả này) có chứa natri clorua (50 mM) và EDTA (2 mM) theo phương pháp do nhà sản xuất xác định. Dung dịch nước chứa kháng thể này được áp dụng với lượng 2,5 mL vào một cột NAP-25, và tiếp đó thu gom phân đoạn (3,5 mL) được rửa giải bằng 3,5 mL PBS6,5/EDTA. Cô phân đoạn thu được bằng Quy trình chung A. Sau khi xác định nồng độ của kháng thể này bằng cách sử dụng Quy trình chung B, điều chỉnh nồng độ kháng thể đến 20 mg/mL bằng cách sử dụng PBS6,5/EDTA.

Quy trình chung D: Tinh chế thể liên hợp thuốc-kháng thể

Cân bằng cột NAP-25 bằng dịch đệm bất kỳ được chọn từ dịch đệm phosphat có bán trên thị trường (PBS7,4, Cat. No. 10010-023, Invitrogen), dịch đệm natri phosphat (10 mM, pH 6,0; được gọi là PBS6,0) có chứa natri clorua (137 mM), và dịch đệm axetat có chứa sorbitol (5%) (10 mM, pH 5,5; được gọi là ABS trong bản mô tả này). Dung dịch nước chứa hỗn hợp phản ứng thể liên hợp thuốc-kháng thể được áp dụng với lượng khoảng 1,5 mL vào cột NAP-25,

và tiếp đó được rửa giải bằng dịch đệm với lượng do nhà sản xuất xác định để thu gom phân đoạn kháng thể. Phân đoạn đã thu gom lại được áp dụng lại vào cột NAP-25 và, bằng cách lặp lại tổng cộng từ 2 đến 3 lần quá trình tinh chế lọc gel để rửa giải bằng dịch đệm, thể liên hợp thuốc-kháng thể loại trừ liên kết thuốc chưa được liên hợp và thu được hợp chất phân tử lượng thấp (tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua (TCEP), N-acetyl-L-cysteine (NAC), và dimethyl sulfoxide).

Quy trình chung E: Xác định nồng độ kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể (1).

Có thể tính toán nồng độ thuốc được liên hợp trong thể liên hợp thuốc-kháng thể bằng cách đo độ hấp thụ UV của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể ở hai bước sóng 280 nm và 370 nm, tiếp đó tiến hành tính toán như dưới đây.

Do độ hấp thụ tổng cộng ở bước sóng bất kỳ là bằng tổng độ hấp thụ của tất cả các loại hoá chất hấp thụ ánh sáng mà có mặt trong hệ thống (cộng hợp độ hấp thụ), khi hệ số hấp thụ mol của kháng thể và thuốc là không thay đổi trước và sau khi liên hợp giữa kháng thể và thuốc, nồng độ kháng thể và nồng độ thuốc trong thể liên hợp thuốc-kháng thể được biểu thị bằng các phương trình dưới đây.

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

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

Trong phương trình trên, A_{280} là độ hấp thụ của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể ở 280 nm, A_{370} là độ hấp thụ của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể ở 370 nm, $A_{A,280}$ là độ hấp thụ của kháng thể ở 280 nm, $A_{A,370}$ là độ hấp thụ của kháng thể ở 370 nm, $A_{D,280}$ là độ hấp thụ của tiền chất thể liên hợp ở 280 nm, $A_{D,370}$ là độ hấp thụ của tiền chất thể liên hợp ở 370 nm, $\epsilon_{A,280}$ là hệ số hấp thụ mol của kháng thể ở 280 nm, $\epsilon_{A,370}$ là hệ số hấp thụ mol của kháng thể ở 370 nm, $\epsilon_{D,280}$ là hệ số hấp thụ mol của tiền chất thể liên

hợp ở 280 nm, $\epsilon_{D,370}$ là hệ số hấp phụ mol của tiền chất thể liên hợp ở 370 nm, C_A là nồng độ kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể, và C_D thể hiện nồng độ thuốc trong thể liên hợp thuốc-kháng thể.

Đối với $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$, và $\epsilon_{D,370}$ trong phương trình nêu trên, sử dụng các giá trị có được trước đó (giá trị ước tính dựa trên tính toán hoặc giá trị đo được thu được bằng đo hợp chất bằng UV). Ví dụ, $\epsilon_{A,280}$ có thể được ước tính từ trình tự axit amin của một kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp tính toán đã biết (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ nói chung bằng 0. $\epsilon_{D,280}$ và $\epsilon_{D,370}$ có thể thu được dựa trên định luật Lambert-Beer (độ hấp thụ = nồng độ mol $\times$ hệ số hấp phụ mol $\times$ độ dài tế bào) bằng cách đo xác định độ hấp thụ của dung dịch trong đó tiền chất thể liên hợp sẽ sử dụng được hoà tan ở nồng độ mol nhất định. Bằng cách xác định A_{280} và A_{370} của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể và giải đồng thời các phương trình (I) và (II) sử dụng các giá trị, có thể thu được C_A và C_D . Ngoài ra, bằng cách chia C_D cho C_A , có thể thu được số lượng trung bình của thuốc được liên hợp/kháng thể.

Quy trình chung F: Xác định số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể - (2).

Số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể cũng có thể được xác định bằng cách phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng phương pháp được mô tả dưới đây, ngoài Quy trình chung E nêu trên.

[F-1. Điều chế mẫu để phân tích HPLC (khử hoá thể liên hợp thuốc-kháng thể)]

Trộn dung dịch thể liên hợp thuốc-kháng thể (khoảng 1 mg/mL, 60 μ L) với dung dịch dithiothreitol (DTT) trong nước (100 mM, 15 μ L). Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 30 phút để phân giải liên kết disulfua giữa chuỗi L và chuỗi H của thể liên hợp thuốc-kháng thể. Sử dụng mẫu thu được trong phân tích HPLC.

[F-2. Phân tích HPLC]

Tiến hành phân tích HPLC trong các điều kiện đo dưới đây:

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

Bộ phát hiện: Máy đo hấp thụ UV (bước sóng đo: 280 nm)

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

Nhiệt độ cột: 80°C

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

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

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

Thể tích tiêm mẫu: 15 μ L

[F-3. Phân tích dữ liệu]

[F-3-1] So sánh với chuỗi L (L_0) và chuỗi H (H_0) của kháng thể không được liên hợp, chuỗi L được liên hợp thuốc (chuỗi L được nối với một phân tử thuốc: L_1) và các chuỗi H (chuỗi H được nối với một phân tử thuốc: H_1 , chuỗi H được nối với hai phân tử thuốc: H_2 , chuỗi H được nối với ba phân tử thuốc: H_3) thể hiện tính kỵ nước cao hơn tỷ lệ với số lượng các phân tử thuốc được liên hợp và do đó có thời gian lưu lớn hơn. Các chuỗi này do đó được rửa giải theo thứ tự L_0 và L_1 hoặc H_0 , H_1 , H_2 , và H_3 . Pic phát hiện có thể gán cho pic bất kỳ của L_0 , L_1 , H_0 , H_1 , H_2 , và H_3 bằng cách so sánh thời gian lưu với L_0 và H_0 .

[F-3-2] Do liên kết thuốc có hấp thụ UV, hiệu chỉnh các giá trị diện tích pic theo số lượng các phân tử liên kết thuốc được liên hợp theo công thức dưới đây bằng cách sử dụng hệ số hấp phụ mol của chuỗi L, chuỗi H, và liên kết thuốc.

[Công thức 1]

Giá trị được hiệu chỉnh của diện tích pic của chuỗi L (L_i)

= Diện tích pic

$$\times \frac{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi L}}{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi L} + \text{số lượng của các phân tử thuốc được tiếp hợp} \times \text{hệ số dập tắt mol của liên kết thuốc}}$$

[Công thức 2]

Giá trị hiệu chỉnh của diện tích pic của chuỗi H (H_i)

= Diện tích pic

$$\times \frac{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi H}}{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi H} + \text{số lượng các phân tử thuốc được tiếp hợp} \times \text{hệ số dập tắt mol của liên kết thuốc}}$$

Trong công thức này, đối với hệ số dập tắt mol (280 nm) của chuỗi L hoặc chuỗi H của mỗi kháng thể, có thể sử dụng giá trị được ước tính từ trình tự axit amin chuỗi L hoặc chuỗi H của mỗi kháng thể bằng phương pháp tính toán đã biết (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). Trong trường hợp hTINA, hệ số dập tắt mol 34690 và hệ số dập tắt mol 95000 tương ứng đã được sử dụng làm giá trị ước tính đối với chuỗi L và chuỗi H, theo trình tự axit amin của nó. Đối với hệ số dập tắt mol (280 nm) của liên kết thuốc, hệ số dập tắt mol đo được (280 nm) của hợp chất trong đó nhóm maleimide được chuyển đổi thành succinimide thioether bằng cách cho từng liên kết thuốc phản ứng với mercaptoethanol hoặc N-axetylxystein.

[F-3-3] Tỷ lệ diện tích pic (%) của mỗi chuỗi được tính toán cho tổng cộng các giá trị diện tích pic đã hiệu chỉnh theo công thức dưới đây.

[Phương trình 3]

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

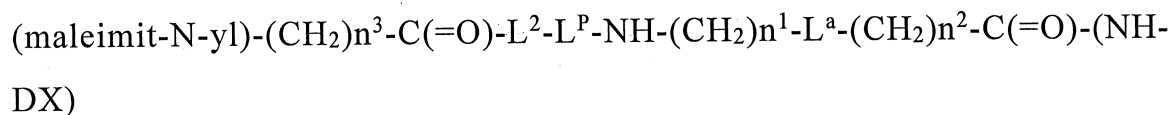
$$\text{Tỷ lệ diện tích pic của chuỗi H} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li} , A_{Hi} : Giá trị diện tích pic tương ứng đã hiệu chỉnh của L_i và H_i

[F-3-4] Số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể được tính toán theo công thức dưới đây.

Số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp = (tỷ lệ diện tích pic $L_0 \times 0$ + tỷ lệ diện tích pic $L_0 \times 1$ + tỷ lệ diện tích pic $H_0 \times 0$ + tỷ lệ diện tích pic $H_1 \times 1$ + tỷ lệ diện tích pic $H_2 \times 2$ + H_3 tỷ lệ diện tích pic $\times 3$) / 100×2

Hợp chất được biểu thị bằng công thức (2) trong phương pháp sản xuất 1 là hợp chất có công thức:



Trong công thức,

n^3 là số nguyên từ 2 đến 8,

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

trong đó n^4 là số nguyên từ 1 đến 6,

L^p là gốc peptit gồm có từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic

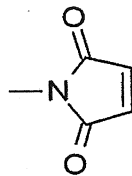
n^1 là số nguyên từ 0 đến 6,

n^2 là số nguyên từ 0 đến 5,

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

(maleimide-N-yl)- là nhóm maleimityl (nhóm 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl) có công thức dưới đây:

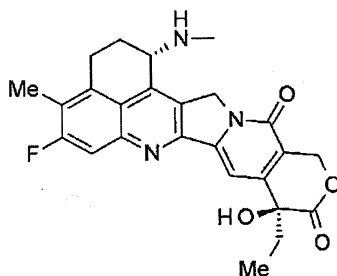
[Công thức 20]



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí kết nối,

-(NH-DX) là nhóm có công thức dưới đây:

[Công thức 21]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

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

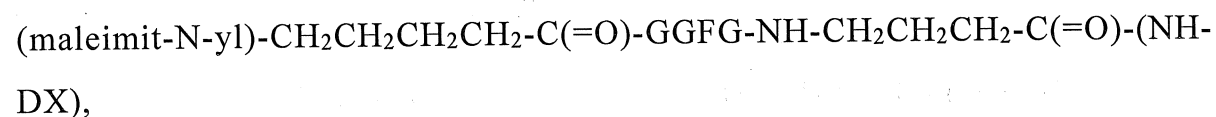
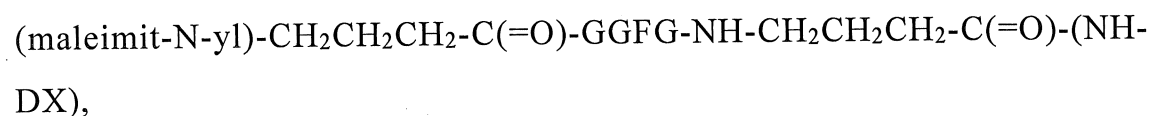
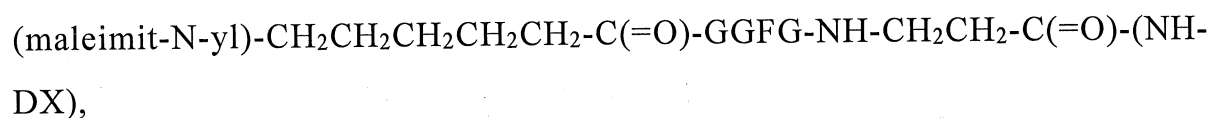
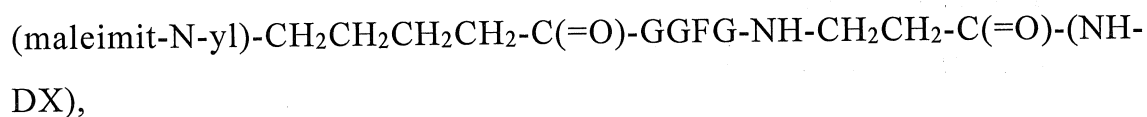
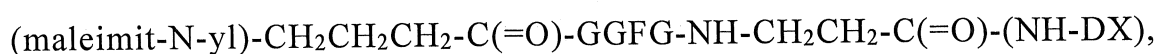
Đối với gốc peptit của L^P , ưu tiên hợp chất có gốc peptit bao gồm axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic làm chất trung gian sản xuất. Trong số các gốc peptit này, ưu tiên hợp chất trong đó L^P là gốc peptit gồm có 4 axit amin làm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

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

Ngoài ra, trong hợp chất được biểu thị bằng công thức (2), ưu tiên hợp chất trong đó n^3 là số nguyên từ 2 đến 5, L^2 là liên kết đơn, và $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ là $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, hoặc $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ làm chất trung gian sản xuất. Ưu tiên hơn hợp chất trong đó $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ là $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, hoặc $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$. Ưu tiên hơn nữa hợp chất trong đó n^3 là số nguyên bằng 2 hoặc 5.

Ngoài ra, trong hợp chất được biểu thị bằng công thức (2), ưu tiên hợp chất trong đó n^3 là số nguyên từ 2 đến 5, L^2 là $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, n^4 là số nguyên từ 2 đến 4, và $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ là $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, hoặc $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ làm chất trung gian sản xuất. Ưu tiên hơn hợp chất trong đó n^4 là số nguyên bằng 2 hoặc 4. Ưu tiên hơn nữa hợp chất trong đó $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$ là $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, hoặc $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$.

Cho hợp chất trung gian được ưu tiên hữu ích để sản xuất hợp chất của sáng chế, có thể lấy ví dụ dưới đây.



(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Có thể sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế bằng cách cho hợp chất liên kết-thuốc được chọn từ nhóm nêu trên của các hợp chất trung gian sản xuất phản ứng với kháng thể kháng-TROP2 hoặc dẫn xuất phản ứng của nó và tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2. Trong trường hợp này, tốt hơn là sử dụng dẫn xuất phản ứng của kháng thể kháng-TROP2. Cụ thể là, điều chế dẫn xuất phản ứng thu được bằng cách khử kháng thể kháng-TROP2.

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

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-
DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-
CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Trong số nhóm nêu trên của các hợp chất trung gian, hợp chất có công thức:

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX), hoặc

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX),

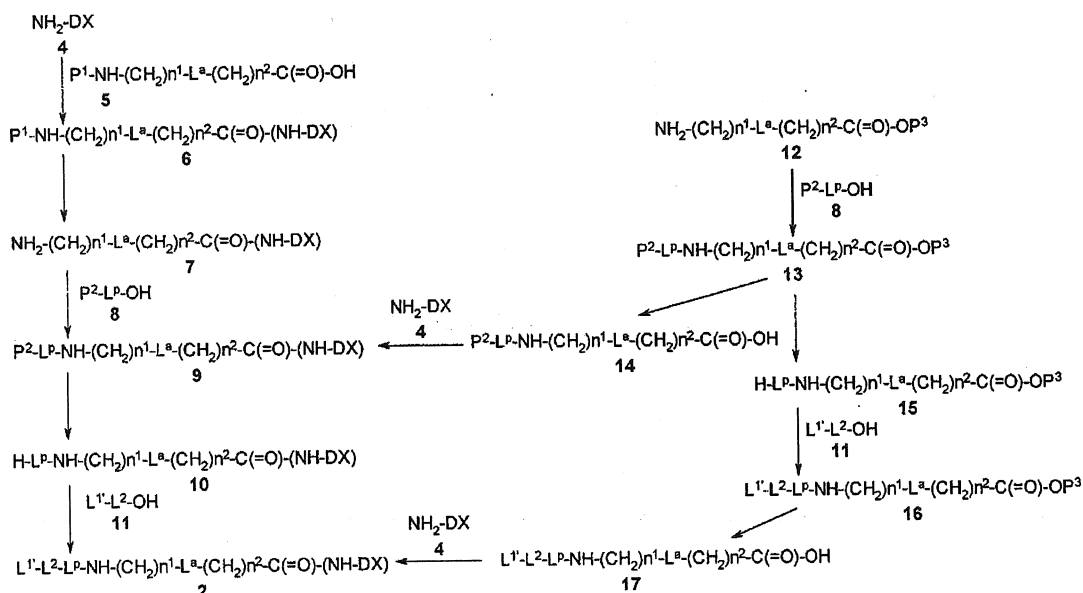
là hợp chất được ưu tiên hơn.

Để đảm bảo lượng thể liên hợp, có thể trộn nhiều thể liên hợp thu được trong các điều kiện sản xuất tương tự để có số lượng tương đương các thuốc (ví dụ, khoảng ± 1) để điều chế các lô mẻ mới. Trong trường hợp này, số lượng trung bình của thuốc nằm trong khoảng các số lượng trung bình của thuốc trong các thể liên hợp trước khi trộn.

2. Phương pháp sản xuất 2

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

[Công thức 22]



Trong công thức, $L^{1'}$ là nhóm maleimetyl, và P^1 , P^2 , và P^3 lần lượt là nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (6) bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (5) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc hợp chất tương tự và cho phản ứng với NH_2-DX (4) hoặc muối được dùng của nó với sự có mặt của bazơ. NH_2-DX (4) là exatecan (tên hoá học: (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-metyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dion).

Các chất thử và điều kiện phản ứng thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit cho phản ứng này. Có nhiều loại este hoạt tính. Ví dụ, có thể sản xuất chất này bằng cách cho các phenol như p-nitrophenol, N-hydroxy benzotriazol, N-hydroxy succinimit, hoặc phenol tương tự, phản ứng với axit carboxylic (5) bằng cách sử dụng tác nhân gây ngưng tụ như N,N'-dicyclohexylcarbodiimit hoặc 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua. Ngoài ra, cũng có thể sản xuất este hoạt tính bằng cách cho axit carboxylic (5) phản ứng với

pentafluorophenyl trifluoroacetate hoặc chất tương tự; cho axit carboxylic (5) phản ứng với 1-benzotriazolyl oxytripyrrolidinophosphoni hexafluorophosphit; cho axit carboxylic (5) phản ứng với diethyl xyanophosphonat (phương pháp khử muối); cho axit carboxylic (5) phản ứng với triphenylphosphin và 2,2'-dipyridyl disulfua (phương pháp Mukaiyama); cho axit carboxylic (5) phản ứng với dẫn xuất triazin như 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholini clorua (DMTMM); hoặc dẫn xuất tương tự. Ngoài ra, cũng có thể tiến hành phản ứng bằng cách, ví dụ phương pháp halogenua axit theo đó xử lý axit carboxylic (5) với halogenua axit như thionyl clorua và oxalyl clorua với sự có mặt của bazơ.

Bằng cách cho este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc halogenua axit của axit carboxylic (5) thu được như ở trên phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ thích hợp trong môi trường trơ ở nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ -78°C đến 150°C , có thể sản xuất hợp chất (6). Trong đó, "dung môi trơ" chỉ dung môi không ức chế phản ứng đích mà sử dụng dung môi đó.

Các ví dụ cụ thể của bazơ được sử dụng cho từng bước nêu trên có thể bao gồm cacbonat, alkoxit, hydroxit, hoặc hydrua của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ bao gồm natri cacbonat, kali cacbonat, natri etoxit, kali butoxit, natri hydroxit, kali hydroxit, natri hydrua, và kali hydrua, bazơ kim loại hữu cơ được biểu thị bằng alkyl lithi bao gồm n-butyl lithi, dialkylamino lithi kể cả lithi diisopropylamit; bazơ kim loại hữu cơ của bisilylamin kể cả lithi bis(trimethylsilyl)amit; và bazơ hữu cơ kể cả amin bậc ba hoặc hợp chất dị vòng có chứa-nitơ như pyridin, 2,6-lutidin, collidin, 4-dimethylaminopyridin, triethylamin, N-methylmorpholin, diisopropyletylamin, và diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU).

Ví dụ về dung môi trơ được sử dụng cho phản ứng của sáng chế bao gồm dung môi hydrocacbon được halogen hoá như diclometan, clorofom, và cacbon tetraclorea; dung môi ete như tetrahydrofuran, 1,2-dimethoxyetan, và dioxan; dung môi hydrocacbon thơm như benzen và toluen; và dung môi amit như N,N-dimethylformamit, N,N-dimethylacetamit, và N-methylpyrrolidin-2-on. Ngoài các dung môi này, dung môi sulfoxit như dimethyl sulfoxit và sulfolan; dung môi

keton như axeton và methyl ethyl keton; và dung môi rượu như metanol và etanol có thể được sử dụng trong một vài trường hợp. Ngoài ra, có thể trộn lẫn các dung môi này để sử dụng.

Đối với nhóm bảo vệ P¹ cho nhóm đầu tận cùng amino của hợp chất (6), có thể sử dụng nhóm bảo vệ cho nhóm amino nói chung được sử dụng để tổng hợp peptit, ví dụ, nhóm carbonyl tert-butyloxy, nhóm carbonyl 9-florenylmetyloxy, và nhóm carbonyl benzyloxy. Ví dụ về nhóm bảo vệ khác cho nhóm amino có thể bao gồm nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm alkoxy carbonyl như nhóm metoxy carbonyl và nhóm etoxycarbonyl; nhóm arylmetoxy carbonyl như nhóm parametoxibenzyloxycarbonyl, và nhóm para (hoặc ortho)nitrobenzyloxycarbonyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl và nhóm triphenyl methyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm aryl sulfonyl như nhóm 2,4-dinitrobenzen sulfonyl và nhóm orthonitrobenzen sulfonyl. Nhóm bảo vệ P¹ có thể được chọn lọc tùy thuộc vào, ví dụ các tính chất của hợp chất có nhóm amino sẽ được bảo vệ.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P¹ cho nhóm đầu tận cùng amino của hợp chất (6) thu được, có thể sản xuất hợp chất (7). Cho phản ứng khử bảo vệ này, có thể lựa chọn các chất thử và điều kiện phản ứng tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Hợp chất (9) có thể được sản xuất bằng cách tạo dẫn xuất axit peptit carboxylic (8) có đầu tận cùng N được bảo vệ bằng P² thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (7) thu được. Có thể lựa chọn các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo thành liên kết peptit giữa axit peptit carboxylic (8) và hợp chất (7) một cách thích hợp và sử dụng từ các chất được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ P² có thể được lựa chọn thích hợp và sử dụng từ các chất được mô tả cho nhóm bảo vệ của hợp chất (6), và việc lựa chọn có thể dựa trên, ví dụ các tính chất của hợp chất có nhóm amino sẽ được bảo vệ. Như thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit, bằng cách lặp lại lần lượt phản ứng và

quá trình khử bảo vệ axit amin hoặc peptit cấu thành axit peptit carboxylic (8) để kéo dài mạch, cũng có thể sản xuất hợp chất (9).

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P² cho nhóm amino của hợp chất (9) thu được, có thể sản xuất hợp chất (10). Cho phản ứng khử bảo vệ này, có thể lựa chọn các chất thử và điều kiện dựa trên nhóm bảo vệ này.

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

Hợp chất (9) ví dụ cũng có thể được sản xuất bằng phương pháp dưới đây.

Hợp chất (13) có thể được sản xuất bằng cách tạo dẫn xuất axit peptit carboxylic (8) có đầu tận cùng N được bảo vệ bằng P² thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với sự có mặt của bazơ với hợp chất amin (12) có nhóm carboxy được bảo vệ bằng P³. Các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo thành liên kết peptit giữa axit peptit carboxylic (8) và hợp chất (12) có thể được lựa chọn thích hợp và sử dụng từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

Nhóm bảo vệ P² cho nhóm amino của hợp chất (13) có thể được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ mà thông thường được sử dụng.

Cụ thể là, ví dụ về nhóm bảo vệ cho nhóm hydroxyl bao gồm nhóm alkoxymetyl như metoxymetyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl, nhóm 4-metoxybenzyl, và nhóm triphenylmetyl; nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm silyl như nhóm tert-butyl diphenylsilyl. Nhóm carboxy có thể được bảo vệ, ví dụ este bằng nhóm alkyl như nhóm metyl, nhóm etyl, và nhóm tert-butyl, nhóm allyl, hoặc nhóm arylmetyl như nhóm benzyl. Các ví dụ về nhóm bảo vệ cho nhóm amino bao gồm, ví dụ, nhóm alkyloxy carbonyl như nhóm tert-butyloxy carbonyl, nhóm metoxycarbonyl, và nhóm

etoxycarbonyl; nhóm allyloxycarbonyl, hoặc nhóm arylmetoxy carbonyl như nhóm 9-florenylmetyloxy carbonyl, nhóm benzyloxycarbonyl, nhóm parametoxibenzyloxycarbonyl, và nhóm para (hoặc ortho)nitroybenzyloxycarbonyl; nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl và nhóm triphenyl metyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm aryl sulfonyl như nhóm 2,4-dinitrobenzen sulfonyl hoặc nhóm orthonitrobenzen sulfonyl.

Đối với nhóm bảo vệ P^3 cho nhóm carboxy, có thể sử dụng nhóm bảo vệ thông thường được sử dụng làm nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy trong hoá học tổng hợp hữu cơ, cụ thể là, tổng hợp peptit. Các ví dụ cụ thể bao gồm các este có nhóm alkyl như nhóm metyl, nhóm etyl, hoặc tert-butyl, allyl este, và benzyl este, và nhóm bảo vệ có thể được chọn thích hợp từ các nhóm bảo vệ nêu trên. Trong trường hợp này, ưu tiên nhóm bảo vệ cho nhóm amino và nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy có thể tốt hơn được loại bỏ bằng phương pháp khác hoặc các điều kiện khác nhau. Ví dụ, ví dụ đại diện bao gồm kết hợp, trong đó P^2 là nhóm tert-butyloxy carbonyl và P^3 là nhóm benzyl. Các nhóm bảo vệ có thể được chọn từ các nhóm nêu trên tùy thuộc vào, ví dụ các tính chất của hợp chất có nhóm amino và nhóm carboxy sẽ được bảo vệ. Để loại bỏ các nhóm bảo vệ, có thể lựa chọn các chất thử và các điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P^3 cho nhóm carboxy của hợp chất (13) thu được, có thể sản xuất hợp chất (14). Cho phản ứng khử bảo vệ này, lựa chọn các chất thử và các điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (9) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (14) thu được thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ. Cho phản ứng này, cũng có thể sử dụng các chất và điều kiện phản ứng thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit, và lựa chọn các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng một cách thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

Cũng có thể tổng hợp hợp chất (2) ví dụ bằng phương pháp dưới đây.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P² cho nhóm amino của hợp chất (13), có thể sản xuất hợp chất (15). Cho phản ứng khử bảo vệ này, có thể lựa chọn các chất thử và điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (16) bằng cách tạo dẫn xuất dẫn xuất axit carboxylic (11) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (15) thu được với sự có mặt của bazơ. Các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo thành liên kết amit giữa axit peptit carboxylic (11) và hợp chất (15) có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả ở trên để tổng hợp hợp chất (6).

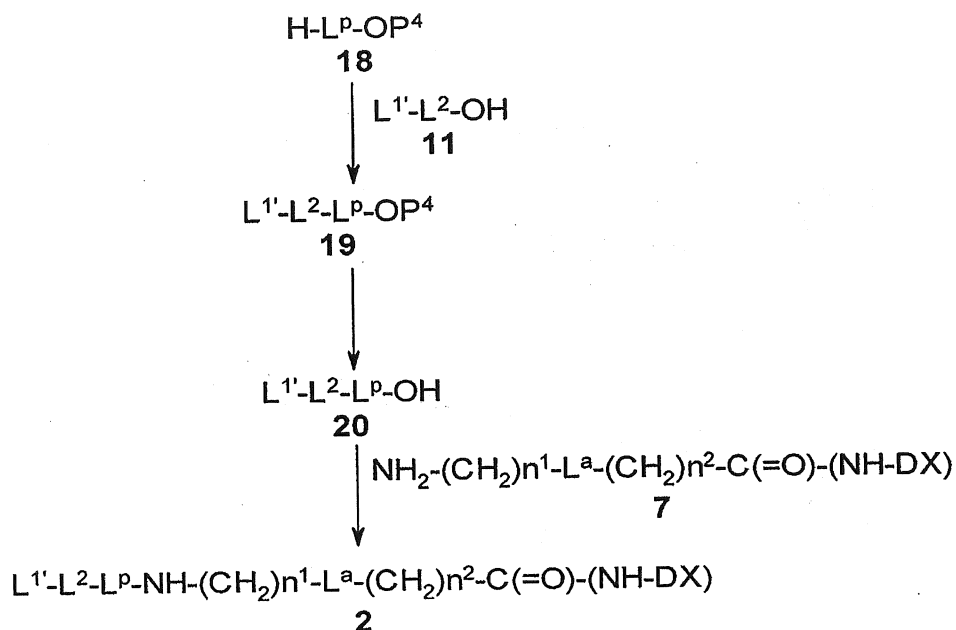
Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy của hợp chất (16) thu được, có thể sản xuất hợp chất (17). Có thể thực hiện phản ứng khử bảo vệ này tương tự phản ứng khử bảo vệ ở nhóm carboxy để sản xuất hợp chất (14).

Có thể sản xuất hợp chất (2) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (17) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ. Cho phản ứng này, cũng có thể sử dụng các chất và điều kiện phản ứng mà thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit, và các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng này có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp của hợp chất (6).

3. Phương pháp sản xuất 3

Hợp chất được biểu thị bằng công thức (2) của hợp chất trung gian cũng có thể được sản xuất bằng phương pháp dưới đây.

[Công thức 23]



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

Có thể sản xuất hợp chất (19) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (11) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này với sự có mặt của bazơ phản ứng với axit peptit carboxylic (18) có đầu tận cùng C được bảo vệ bởi P^4 . Các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi tro được sử dụng để tạo thành liên kết peptit giữa axit peptit carboxylic (18) và hợp chất (11) có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ P^4 cho nhóm carboxy của hợp chất (18) có thể được lựa chọn thích hợp từ nhóm bảo vệ nêu trên.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy của hợp chất (19) thu được, có thể sản xuất hợp chất (20). Có thể tiến hành phản ứng khử bảo vệ này tương tự như phản ứng khử bảo vệ nhóm carboxy để sản xuất hợp chất (14).

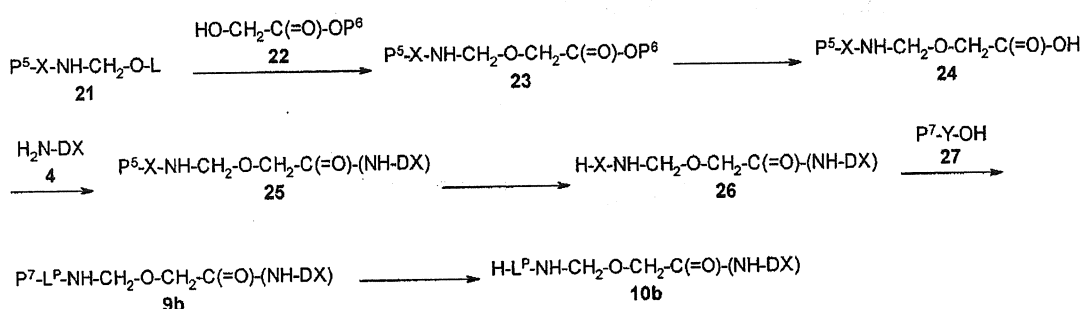
Có thể sản xuất hợp chất (2) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (20) thu được thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (7). Cho phản ứng này, các chất và điều kiện phản ứng mà thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi tro được sử dụng cho

phản ứng này có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

4. Phương pháp sản xuất 4

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

[Công thức 24]



Trong công thức, L^p là như được xác định ở trên, L là nhóm axyl mà là nhóm alkanoyl như nhóm axetyl hoặc nhóm alloy như nhóm benzoyl, nguyên tử hydro, hoặc nhóm tương tự, X và Y lần lượt biểu thị oligopeptit gồm có từ 1 đến 3 nhóm axit amin, P^5 và P^7 lần lượt biểu thị nhóm bảo vệ cho nhóm amino, và P^6 là nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy.

Hợp chất được biểu thị bằng công thức (21) có thể sản xuất bằng cách sử dụng hoặc áp dụng phương pháp được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 2002-60351 hoặc tài liệu tham khảo (J. Org. Chem., Vol. 51, page 3196, 1986), và, bằng cách tiến hành loại bỏ các nhóm bảo vệ hoặc cải biến các nhóm chức, nếu cần. Theo cách khác, hợp chất này cũng có thể thu được bằng cách xử lý axit amin với nhóm đầu tận cùng amino được bảo vệ hoặc amit của axit oligopeptit với nhóm amino được bảo vệ bằng aldehyt hoặc keton.

Bằng cách cho hợp chất (21) phản ứng với hợp chất (22) có nhóm hydroxyl ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ điều kiện nhiệt độ làm mát đến nhiệt độ trong phòng trong môi trường trơ với sự có mặt của axit hoặc bazơ, có thể sản xuất hợp chất (23).

Ví dụ về axit mà có thể sử dụng ở đây có thể bao gồm axit vô cơ như axit flohydric, axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và axit boric; axit hữu cơ như axit axetic, axit xitric, axit paratoluen sulfonic, và axit metansulfonic; và axit Lewis như tetrafloroborat, kẽm clorua, thiếc clorua, nhôm clorua, và sắt clorua. Trong số các axit này, các axit sulfonic, cụ thể là, axit paratoluen sulfonic là được ưu tiên. Đối với bazơ, bazơ bất kỳ trong số bazơ nêu trên có thể được lựa chọn thích hợp và được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên của các chất này bao gồm alkoxit kim loại kiềm như kali tert-butoxit; hydroxit kim loại kiềm như natri hydroxit và kali hydroxit; hydrua kim loại kiềm như natri hydrua và kali hydrua; bazơ kim loại hữu cơ được biểu thị bằng dialkylamino lithi như lithi diisopropylamit; và bazơ kim loại hữu cơ của bissilylamin như lithi bis(trimetylsilyl)amit. Các ví dụ về dung môi sẽ sử dụng cho phản ứng này bao gồm dung môi ete như tetrahydrofuran và 1,4-dioxan; và dung môi hydrocacbon thơm như benzen và toluen. Các dung môi này có thể được điều chế dưới dạng hỗn hợp với nước. Ngoài ra, nhóm bảo vệ cho nhóm amino, ví dụ bằng P⁵ là không bị giới hạn cụ thể nếu nhóm này là nhóm thông thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ tiêu biểu bao gồm các nhóm bảo vệ cho nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Tuy nhiên, trong phản ứng của sáng chế, có thể có trường hợp trong đó nhóm bảo vệ cho nhóm amino ví dụ bằng P⁵ bị phân giải. Trong trường hợp này, cần thiết tiến hành phản ứng với chất thử thích hợp để bảo vệ nhóm amino nếu cần thiết phải đưa nhóm bảo vệ vào lại.

Có thể sản xuất hợp chất (24) bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P⁶ của hợp chất (23). Trong bản mô tả này, các ví dụ tiêu biểu về nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy ví dụ bởi P⁶ được mô tả trong phương pháp sản xuất 2, và có thể lựa chọn nhóm thích hợp trong số các nhóm đó. Trong hợp chất (23), mong muốn là nhóm bảo vệ P⁵ cho nhóm amino và nhóm bảo vệ P⁶ cho nhóm carboxy là các nhóm bảo vệ mà có thể bị loại bỏ bằng một phương pháp khác hoặc các điều kiện khác. Ví dụ, ví dụ tiêu biểu bao gồm kết hợp trong đó P⁵ là nhóm 9-florenylmetyloxy carbonyl và P⁶ là nhóm benzyl. Có thể lựa chọn các nhóm bảo

vệ tùy thuộc vào, ví dụ, các tính chất của hợp chất có nhóm amino và nhóm carboxy cần được bảo vệ. Để loại bỏ các nhóm bảo vệ, lựa chọn các chất thử và điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (26) bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (24) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (4) hoặc muối được dụng của nó để sản xuất hợp chất (25) tiếp đó loại bỏ nhóm bảo vệ P⁵ của hợp chất (25) thu được. Cho phản ứng giữa hợp chất (4) và axit carboxylic (24) và phản ứng để loại bỏ nhóm bảo vệ P⁶, có thể sử dụng cùng các chất thử và các điều kiện phản ứng như phần được mô tả cho Phương pháp sản xuất 2.

Có thể sản xuất hợp chất (10b) bằng cách cho hợp chất (26) phản ứng với axit amin có nhóm amino đầu tận cùng được bảo vệ hoặc oligopeptit (27) có nhóm amino được bảo vệ để sản xuất hợp chất (9b) và loại bỏ nhóm bảo vệ P⁷ của hợp chất (9b) thu được. Nhóm bảo vệ cho nhóm amino như được biểu thị bằng P⁷ là không bị giới hạn cụ thể nếu nhóm này thông thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ tiêu biểu cho các nhóm này bao gồm các nhóm bảo vệ cho nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Để loại bỏ nhóm bảo vệ, các chất thử và điều kiện được lựa chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ. Cho phản ứng giữa hợp chất (26) và hợp chất (27), có thể sử dụng các chất và điều kiện phản ứng thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit. Hợp chất (10b) được sản xuất theo phương pháp nêu trên có thể được tạo dẫn xuất thành hợp chất (1) của sáng chế theo phương pháp nêu trên.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế, khi để ngoài không khí hoặc được kết tinh lại, ví dụ, để tinh chế, có thể hấp thụ hơi ẩm để có nước hấp thụ hoặc chuyển thành hydrat, và hợp chất và muối này có chứa nước cũng được bao gồm trong sáng chế.

Hợp chất được đánh dấu bằng nhiều loại đồng vị phóng xạ hoặc không có tính phóng xạ cũng được bao gồm trong sáng chế. Một hoặc nhiều nguyên tử cấu thành thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế có thể có chứa đồng vị nguyên tử ở tỷ lệ phi tự nhiên. Các ví dụ về đồng vị nguyên tử bao gồm đơteri (²H), triti

(^3H), iốt-125 (^{125}I), và cacbon-14 (^{14}C). Ngoài ra, hợp chất của sáng chế có thể được đánh dấu phóng xạ bằng đồng vị phóng xạ như triti (^3H), iốt-125 (^{125}I), cacbon-14 (^{14}C), đồng-64 (^{64}Cu), zirconi-89 (^{89}Zr), iốt-124 (^{124}I), flo-18 (^{18}F), indi-111 (^{111}I), cacbon-11 (^{11}C) và iốt-131 (^{131}I). Hợp chất được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ hữu ích làm tác nhân điều trị hoặc phòng bệnh, chất thử cho nghiên cứu như chất thử cho thử nghiệm và chất thử chẩn đoán như chất chụp ảnh chẩn đoán in vivo. Không liên quan đến hoạt tính phóng xạ, loại biến thể đồng vị bất kỳ của thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế là thuộc phạm vi của sáng chế.

[Thuốc]

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế thể hiện hoạt tính gây độc tế bào kháng lại các tế bào ung thư, và do đó, có thể sử dụng làm thuốc, cụ thể là làm chất điều trị và/hoặc chất phòng bệnh ung thư.

Nghĩa là, thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được sử dụng chọn lọc làm thuốc để hoá trị liệu, đây là phương pháp chính để điều trị ung thư, và do đó, có thể trì hoãn sự phát triển của các tế bào ung thư, ức chế tăng trưởng các tế bào này, và ngoài ra tiêu diệt các tế bào ung thư. Việc này có thể cho phép các bệnh nhân ung thư không còn các triệu chứng do bệnh ung thư hoặc đạt được sự cải thiện chất lượng cuộc sống (QOL) của các bệnh nhân ung thư và đạt được tác dụng trị liệu bằng cách duy trì cuộc sống của các bệnh nhân ung thư. Thậm chí nếu thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế không đạt được việc tiêu diệt các tế bào ung thư, nó có thể đạt được QOL cao hơn cho các bệnh nhân ung thư đồng thời có tỷ lệ sống sót kéo dài hơn, bằng cách ức chế hoặc kiểm soát sự tăng trưởng của các tế bào ung thư.

Trong liệu pháp thuốc này, thể liên hợp này có thể được sử dụng làm thuốc một mình cũng như làm thuốc kết hợp với liệu pháp bổ sung trong liệu pháp phụ trợ và có thể kết hợp với phẫu thuật, trị liệu phóng xạ, trị liệu hormon, hoặc trị liệu tương tự. Ngoài ra, thể liên hợp này cũng có thể được sử dụng làm thuốc cho liệu pháp trong liệu pháp phụ trợ mới.

Ngoài ứng dụng điều trị nêu trên, có thể hy vọng có tác dụng ức chế tăng trưởng các tế bào ung thư di căn nhỏ và ngoài ra tiêu diệt các tế bào này bằng cách gắn kết với các tế bào ung thư này do tính chất gắn kết của kháng thể này với kháng nguyên. Cụ thể là, khi xác nhận có biểu hiện TROP2 ở các tế bào ung thư nguyên phát, có thể hy vọng có ức chế di căn ung thư hoặc tác dụng phòng bệnh bằng cách cho dùng thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế. Ví dụ, có thể hy vọng có tác dụng ức chế và tiêu diệt các tế bào ung thư trong dịch cơ thể trong giai đoạn di căn hoặc tác dụng, ví dụ, ức chế và tiêu diệt các tế bào ung thư nhỏ ở chuột ngay sau khi cấy vào mô bất kỳ. Ngoài ra, có thể hy vọng có ức chế di căn ung thư hoặc tác dụng phòng bệnh, cụ thể là, sau khi phẫu thuật loại bỏ ung thư. Do đó, có thể hy vọng có tác dụng ức chế di căn ung thư.

Có thể hy vọng thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có tác dụng trị liệu bằng cách sử dụng như liệu pháp toàn thân cho các bệnh nhân, và ngoài ra, bằng cách sử dụng tại chỗ vào các mô ung thư.

Ví dụ về loại bệnh ung thư mà ứng dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế bao gồm ung thư phổi, ung thư thận, ung thư biểu mô tiết niệu, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp đa dạng, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư vú, u melanin, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, hoặc ung thư thực quản, tuy nhiên, không giới hạn ở các loại ung thư này miễn là tế bào ung thư có biểu hiện, trong tế bào ung thư như một đối tượng điều trị, protein kháng nguyên mà thể liên hợp thuốc-kháng thể có thể nhận biết.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế tốt hơn là được sử dụng cho động vật có vú, nhưng tốt hơn nữa là sử dụng cho người.

Các chất được sử dụng trong dược phẩm có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được lựa chọn thích hợp và áp dụng từ các chất phụ gia bào chế hoặc các chất tương tự thông thường được sử dụng trong lĩnh vực này, theo liều lượng hoặc nồng độ sử dụng.

Thế liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng dược phẩm có chứa ít nhất một thành phần dược dụng. Ví dụ, dược phẩm nêu trên thông thường có chứa ít nhất một chất mang thuốc (ví dụ, chất lỏng được tiệt khuẩn). Trong bản mô tả này, chất lỏng bao gồm, ví dụ, nước và dầu (dầu mỏ và dầu có nguồn gốc động vật, thực vật, hoặc tổng hợp). Dầu này có thể là, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, hoặc dầu vùng. Nước là chất mang điển hình hơn khi dược phẩm nêu trên được sử dụng qua đường tĩnh mạch. Dung dịch nước muối, dung dịch dextroza trong nước, và dung dịch glyxerol trong nước cũng có thể sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể là, để làm dung dịch tiêm. Chất dẫn được dụng thích hợp là đã biết trong lĩnh vực. Nếu muốn, chế phẩm nêu trên cũng có thể có chứa lượng vết của chất làm ẩm, chất nhũ hoá, hoặc chất đệm pH. Ví dụ về chất mang thuốc thích hợp được đề cập trong "Remington's Pharmaceutical Sciences" của E. W. Martin. Các chế phẩm bào chế tương ứng cách dùng.

Nhiều hệ chuyển vận là đã biết và có thể được sử dụng để dùng thế liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế. Các ví dụ đường dùng bao gồm các đường trong da, trong bắp cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, và dưới da, nhưng không giới hạn ở các đường dùng này. Việc sử dụng có thể tiến hành ví dụ bằng cách tiêm hoặc tiêm liều cao. Theo phương án được ưu tiên cụ thể, việc sử dụng thế liên hợp thuốc-kháng thể là bằng cách tiêm. Sử dụng ngoài đường tiêu hoá là đường dùng được ưu tiên.

Theo phương án đại diện, dược phẩm được kê đơn, làm dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường tĩnh mạch cho người, theo các quy trình thông thường. Chế phẩm để sử dụng qua đường tĩnh mạch thường là dung dịch trong dung dịch đệm trong nước vô khuẩn và đẳng trương. Nếu cần, thuốc có thể chứa tác nhân hoà tan và chất gây tê tại chỗ để giảm đau ở vị trí tiêm (ví dụ, lignocain). Nói chung, thành phần nêu trên được cung cấp riêng rẽ dưới dạng bột đông khô hoặc thể cô khan có chứa trong bao bì có được bằng cách hàn kín ampun hoặc gói nhỏ có một lượng hoạt chất hoặc dưới dạng hỗn hợp ở dạng phân liều đơn vị. Khi thuốc ở dạng sử dụng qua đường tiêm, thuốc có thể được sử dụng từ chai thuốc

tiêm có chứa nước hoặc nước muối loại được dụng vô khuẩn. Khi thuốc được sử dụng qua đường tiêm, ampun chứa nước vô khuẩn hoặc nước muối để tiêm có thể được cung cấp sao cho các thành phần nêu trên được trộn với nhau trước khi sử dụng.

Dược phẩm của sáng chế có thể là dược phẩm chỉ chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế hoặc dược phẩm có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 và ít nhất một chất điều trị ung thư không phải là thể liên hợp. Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được sử dụng với chất điều trị ung thư khác. Tác dụng chống ung thư có thể được tăng cường tương ứng. Một chất chống ung thư khác được sử dụng cho mục đích này có thể được sử dụng cho một cá thể đồng thời với, riêng rẽ với, hoặc sau khi dùng thể liên hợp thuốc-kháng thể, và có thể được sử dụng đồng thời thay đổi khoảng cách dùng liều cho từng chất. Ví dụ về các chất điều trị ung thư bao gồm abraxan, paclitaxel, xisplatin, gemxitabin, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinorelbin, các thuốc được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2003/038043, các chất tương tự LH-RH (leuprorelin, goserelin, hoặc các chất tương tự), estramustin phosphat, chất đối kháng estrogen (tamoxifen, raloxifen, hoặc các chất tương tự), và chất ức chế aromataza (anastrozol, letrozol, exemestan, hoặc các chất tương tự), nhưng không giới hạn ở các chất này miễn là thuốc có hoạt tính kháng khối u.

Dược phẩm có thể được bào chế thành dạng chế phẩm đông khô hoặc chế phẩm lỏng dưới dạng chế phẩm có thành phần mong muốn và độ tinh khiết cần thiết. Khi được bào chế dưới dạng chế phẩm đông khô, có thể là chế phẩm có chứa chất phụ gia bào chế thích hợp mà được sử dụng trong lĩnh vực này. Cũng cho chế phẩm dạng lỏng, chế phẩm này có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm lỏng có chứa nhiều loại chất phụ gia bào chế mà được sử dụng trong lĩnh vực này.

Thành phần và nồng độ của dược phẩm có thể thay đổi tùy thuộc vào phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 có chứa trong trong dược phẩm của sáng chế có thể thể hiện tác dụng dược tính

ở liều lượng nhỏ khi thể liên hợp thuốc-kháng thể có ái lực cao hơn đối với kháng nguyên, nghĩa là, ái lực cao (= giá trị K_d thấp) theo hằng số phân ly (nghĩa là, giá trị K_d) đối với kháng nguyên này. Do đó, để xác định liều lượng của thể liên hợp thuốc-kháng thể, có thể xác định liều lượng tùy từng trường hợp liên quan đến ái lực giữa thể liên hợp thuốc-kháng thể và kháng nguyên. Khi thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế được sử dụng cho người, ví dụ, khoảng từ 0,001 đến 100 mg/kg có thể được sử dụng làm một lần hoặc được sử dụng vài lần với khoảng cách giữa các lần dùng là từ 1 đến 180 ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

[Ví dụ 1: Gây miễn dịch cho chuột và thu được tế bào lai]

1-1) Điều chế tế bào sẽ sử dụng để gây miễn dịch cho chuột

Nuôi cấy 5×10^6 tế bào NCI-H322 (dòng tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ của người, ATCC CRL-5806; ATCC: American Type Culture Collection) trong môi trường RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) (10 ml) trong 5 ngày, tiếp đó thu hồi, rửa bằng PBS (nước muối đệm-phosphat) hai lần, và tái tạo huyền phù trong PBS (500 μ l).

1-2) Gây miễn dịch cho chuột

Để gây miễn dịch lần đầu tiên, mỗi con chuột BALB/c (6 tuần tuổi) được gây miễn dịch trong màng bụng bằng các tế bào NCI-H322 (1×10^7 tế bào). Để gây miễn dịch từ lần thứ hai đến lần thứ năm, chuột được gây miễn dịch trong màng bụng bằng 1×10^6 NCI-H322 tế bào cách nhau 1 tuần. Cho gây miễn dịch lần thứ sáu (cuối cùng), gây miễn dịch cho chuột qua tĩnh mạch đuôi và trong màng bụng bằng các tế bào NCI-H322 ở nồng độ 1×10^6 tế bào/200 μ l PBS cho

mỗi đường dùng. Các tế bào lá lách được cắt 3 ngày sau khi gây miễn dịch lần cuối cùng.

1-3) Điều chế tế bào lá lách của chuột được gây miễn dịch

Cắt lấy lá lách của chuột được gây miễn dịch, tiếp đó nghiền, và tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 10% FBS (huyết thanh bào thai bò)(+). Huyền phù tế bào được cho đi qua màng lọc tế bào (100 μ m, BD Falcon) và tiếp đó ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, và loại bỏ dịch nổi. Thêm vào dung dịch Tris-NH₄Cl (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,83% NH₄Cl; 10 mL) vào phần cặn, tiếp đó được xử lý ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Thêm môi trường RPMI 1640 FBS(+) (10 ml) vào huyền phù tế bào này, và hỗn hợp được cho qua màng lọc tế bào và tiếp đó ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, và các tế bào lá lách được tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

1-4) Điều chế tế bào u tủy

Thu hồi các tế bào P3U1 (dòng tế bào u tủy của chuột) và ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Thêm dung dịch EDTA (0,02%) (10 ml) vào các tế bào P3U1, tiếp đó được xử lý ở 37°C trong 5 phút. Ly tâm huyền phù tế bào P3U1 ở tốc độ 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

1-5) Dung hợp tế bào

Trộn các tế bào lá lách và các tế bào u tủy ở tỷ lệ 5:1 và ly tâm (1200 vòng/phút, 5 phút). Các tế bào thu được trong phân đoạn đã kết tủa được phân tán rời, và polyetylen glycol-4000 (PEG-4000; 1 mL) được thêm vào từ từ trong vòng 1 phút kèm theo khuấy. Tiếp đó, môi trường RPMI (1 mL) được thêm vào dịch lỏng có chứa tế bào một vài lần cách nhau 1 phút, và môi trường RPMI tiếp đó được thêm vào để điều chỉnh thể tích tổng cộng đến 50 mL. Huyền phù tế bào được ly tâm (900 vòng/phút, 5 phút), và các tế bào thu được trong phân đoạn đã kết tủa được phân tán rời nhẹ nhàng và tiếp đó được tạo huyền phù nhẹ nhàng

trong môi trường HAT (môi trường RPMI 1640 được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò và bổ sung môi trường HAT; 100 mL). Phân tán huyền phù này ở mức 200 μ L/giếng vào đĩa 96-giếng để nuôi cấy và được nuôi cấy cho đến khi hợp dòng 50% trong tủ ẩm 5% CO₂ 37°C.

1-6) Sàng lọc tế bào lai bằng cách sử dụng adenovirut biến thể FZ33

Gây giống các tế bào NCI-H322 ở mức 5×10^3 tế bào/giếng vào đĩa 96-giếng và được nuôi cấy ở 37°C trong 48 giờ. Rửa các tế bào bằng 150 μ L/giếng PBS hai lần, và mỗi dịch nổi nuôi cấy tế bào lai (50 μ L) lần lượt được thêm vào mỗi giếng và cho phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Rửa các tế bào bằng 150 μ L/giếng PBS hai lần. Adenovirut Ax3CAZ3-FZ33 (adenovirut biểu hiện- β -galactosidaza được cải biến bằng sợi Z33 để gắn kết với một kháng thể (xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2012/0237518)) được pha loãng bằng môi trường RPMI 1640(-) đến nồng độ bằng 3×10^6 vp/100 μ L (1×10^3 vp/tế bào), và thêm dung dịch đã pha loãng này vào 100 μ L/giếng. Sau phản ứng ở 4°C trong 1 giờ, rửa các tế bào bằng 150 μ L/giếng PBS hai lần. Môi trường RPMI 1640 FBS(+) được thêm vào 100 μ L/giếng, và các tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ. Các tế bào NCI-H322 được xử lý bằng thử nghiệm gen báo cáo β -Gal bằng cách sử dụng hệ thống thử nghiệm gen báo cáo Galacto-Light Plus (Applied Biosystems, Inc.) được rửa bằng 200 μ L/giếng PBS. Dung dịch phân giải được thêm vào ở mức 50 μ L/giếng, và hỗn hợp được để ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Dịch phân giải tế bào này (10 μ L) được pha loãng 100 lần bằng dịch pha loãng đệm phản ứng Galacton-Plus Galacto, tiếp đó, thêm vào đĩa 96 giếng SH vi giếng White (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Inc.), và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Chất tăng tốc II được thêm vào 150 μ L/giếng. Đo mức phát quang hoá học trong 5 giây bằng cách sử dụng máy đếm đa nhãn Wallac 1420 ARVOSx (PerkinElmer, Inc.), và liều gây nhiễm của virut trong các tế bào NCI-H322 được chỉ ra bằng giá trị trung bình/giây theo RLU (mức phát quang hoá học). Từ đó tiến hành sàng lọc nhóm tế bào lai, dòng tế bào có giá trị đo (RLU) bằng 5000 RLU hoặc cao hơn được chọn từ toàn bộ nhóm (tối thiểu: 1383 RLU, trung bình: 10914 RLU, tối đa: 78746 RLU). Trước tiên, sàng lọc nguyên phát, 81 giếng dương tính được

chọn từ 960 giếng tế bào lai thu được bằng cách dung hợp một tế bào. Cho sàng lọc kiểm định, tiến hành thử nghiệm lặp lại theo cùng phương pháp như trong sàng lọc nguyên phát. Khi giếng thể hiện giá trị đo bằng 5000 RLU hoặc cao hơn ở cả hai thử nghiệm được xem là dương tính, 52 giếng dương tính được chọn từ 81 giếng thu được trong sàng lọc nguyên phát. Các dòng đã lựa chọn được tách dòng phụ từ 2 đến 4 lần để thiết lập 44 dòng tế bào lai đơn dòng.

[Ví dụ 2: Tinh chế kháng thể từ tế bào lai]

Pristan (2,6,10,14-tetramethylpentadecan; 0.5 ml) được sử dụng trong màng bụng trước đó cho chuột từ 8- đến 10-tuần tuổi hoặc chuột trụi lông, các con chuột này sau đó được nuôi trong 2 tuần. Mỗi tế bào lai sản xuất-kháng thể đơn dòng thu được trong Ví dụ 1 được tiêm trong màng bụng cho chuột. Sau từ 10 đến 21 ngày, tế bào lai được để gây ung thư cổ trướng, và tiếp đó thu gom dịch cổ trướng. Dịch cổ trướng thu được được ly tâm để loại bỏ chất rắn. Tiếp đó, tinh chế các kháng thể bằng cách khử muối bằng từ 40 đến 50% amoni sulfat, phương pháp kết tủa axit caprylic, cột DEAE-Sepharose, và cột protein G, và thu gom các phân đoạn IgG hoặc IgM và sử dụng dưới dạng các kháng thể đơn dòng đã tinh chế.

[Ví dụ 3: Nhận dạng kháng nguyên mà gắn kết với kháng thể do tế bào lai sản xuất]

Nhận dạng kháng nguyên đối với TINA1, kháng thể do tế bào lai sản xuất được điều chế trong Ví dụ 2.

3-1) Kết tủa miễn dịch protein bề mặt tế bào được đánh dấu-biotin bằng cách sử dụng kháng thể TINA1

5×10^6 tế bào NCI-H322 được thu hồi và được rửa bằng PBS ba lần. EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Inc.) được tạo huyền phù trong PBS ở nồng độ 0,1 mg/ml. Các tế bào NCI-H322 được quay tròn ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trong dung dịch biotin/PBS, tiếp đó rửa bằng 100 mM dung dịch glyxin/PBS (25 ml) hai lần, và tiếp đó rửa bằng PBS (25 ml) ba lần. Các tế bào đã rửa này được tái tạo huyền phù trong dịch đệm phân giải

(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1% NP-40 + chất ức chế Proteaza, 1 viên nén/50 ml Complete EDTA tự do (Hoffmann-La Roche Ltd.); 2 ml) và xử lý ở 4°C trong 30 phút. Thêm Protein G Sepharoza/dịch đệm phân giải (huyền phù 50%; 30 µl) thu được bằng thay thế dịch đệm Protein G Sepharoza (Protein G Sepharoza 4 Fast Flow (GE Healthcare Japan Corporation)) bằng dịch đệm phân giải vào dịch phân giải tế bào, và hỗn hợp được quay tròn ở 4°C trong 1 giờ và tiếp đó ly tâm ở 4°C trong 5 phút để thu hồi dịch nổi. Thêm kháng thể TINA1 (3 µg) vào dịch nổi, và hỗn hợp được quay tròn ở 4°C trong 1 giờ. Tiếp đó, thêm vào đó Protein G Sepharoza/dịch đệm phân giải (huyền phù 50%; 60 µl), và hỗn hợp được quay tròn ở 4°C trong 2 giờ. Protein G Sepharoza được rửa bằng dịch đệm phân giải (1 ml) sáu lần và tiếp đó tái tạo huyền phù trong 1 × SDS dịch đệm mẫu/dịch đệm 5% 2-ME (2-mercaptoetanol) (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8 ở 25°C), 2% (trọng lượng/thể tích) SDS, 10% glyxerol, và 0,01% (trọng lượng/thể tích) đỏ phenol). Huyền phù được xử lý ở 100°C trong 5 phút, và tiếp đó thu hồi dung dịch và sử dụng làm mẫu cho thử cho SDS-PAGE (điện di gel polyacrylamit).

3-2) Phương pháp phân tích SDS-PAGE và thẩm tách Western

Mẫu SDS-PAGE được điều chế ở mục 3-1) được điện di ở 20 mA sử dụng Ready Gels J 5-20% (Bio-Rad Laboratories, Inc.) và tiếp đó thẩm tách ở 0,1 mA/cm² từ gel đến màng. Rửa màng bằng PBS-T (PBS(-)-0,05% Tween 20) trong 5 phút và tiếp đó phong bế trong 1 giờ. Rửa màng bằng PBS-T trong 5 phút 3 lần và tiếp đó cho phản ứng với thể liên hợp Streptavidin-củ cải ngựa (Amersham Biosciences Corp.; được pha loãng 2000 lần bằng PBS-T để sử dụng) trong 1 giờ. Rửa màng bằng PBS-T trong 10 phút 4 lần, và tiếp đó phát hiện dải đích bằng cách sử dụng các thuốc thử phát hiện của phương pháp phân tích thẩm tách Western ECL (Amersham Biosciences Corp.) và Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences Corp.). Các tế bào NCI-H322 được đánh dấu-biotin theo các quy trình của Ví dụ 3-1) được kết tủa miễn dịch bằng kháng thể KCI7A3 trong đó kháng nguyên của nó đã được xác định là TROP2 bằng phổ khối, hoặc kháng thể TINA1, và phân tích các sản phẩm đã kết tủa miễn dịch thu được bằng

phương pháp phân tích SDS-PAGE và thẩm tách Western khi có mặt hoặc không có mặt DTT. Trong hai trường hợp này sử dụng kháng thể KCI7A3 hoặc kháng thể TINA1, phát hiện dải ở phân tử lượng 46 kDa khi không có DTT, và phát hiện dải ở phân tử lượng 37 kDa trong các mẫu thử có bổ sung DTT.

3-3) Phân tích FACS

Do kháng nguyên của kháng thể TINA1 được dự đoán là TROP2 từ kiểu mẫu dải, tiến hành phân tích biểu hiện quá mức bằng cách chuyển gen ADN hỗ trợ không cần đo phổ khối. Từ kết quả phân tích FACS, kháng thể TINA1 thể hiện đáp ứng dương tính mạnh ở các tế bào CHOK1 biểu hiện TROP2 của người, điều này chỉ ra là kháng nguyên của kháng thể TINA1 là TROP2. Tiến hành phân tích FACS tương tự bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư phổi PC14, dòng tế bào ung thư phổi NCI-H322, dòng tế bào ung thư phổi NCI-H2122, dòng tế bào ung thư phổi LCAM1, dòng tế bào ung thư phổi LC2/ad, dòng tế bào ung thư tuyến MIAPaCa2, dòng tế bào ung thư tuyến PK-1, dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC3, dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng HCT116, dòng tế bào u melanin A375, dòng tế bào ung thư buồng trứng SKOV3, dòng tế bào khối u tạo máu RPMI8226, dòng tế bào khối u tạo máu K562, PBMC (tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người), và tiểu cầu của người. Tất cả các dòng tế bào ung thư phổi đã xét nghiệm dương tính-TROP2, và PC3, PK1, và SKOV3 là dương tính như các dòng tế bào trừ các dòng tế bào ung thư phổi. Mặt khác, tất cả các tế bào máu bình thường là âm tính.

[Ví dụ 4: Xác định hoạt tính nhập nội của kháng thể]

4-1) Hệ thống đánh giá hoạt tính nhập nội kháng thể

Protein dung hợp tái tổ hợp DT3C được sản xuất để đo xác định hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch của kháng thể. DT3C này là protein có miền xúc tác của độc tố bệnh bạch hầu (DT) và ba vùng gắn kết-kháng thể của protein G. DT3C gắn kết đặc hiệu với nhóm Fc của một kháng thể, là ổn định, và gây cảm ứng chết tế bào bằng cách ức chế tổng hợp protein khi được hấp thụ vào các tế bào. Bằng cách sử dụng hệ thống này, có thể đồng thời nhận thấy tác

dụng nhập nội của kháng thể và tác dụng tiêu diệt tế bào của nó do độc tố miễn dịch (Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603 của Yamaguchi, M., Hamada, H., và các đồng tác giả).

4-2) Đánh giá hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch bằng cách sử dụng DT3C

Thêm 4 $\mu\text{g/mL}$ DT3C 25 $\mu\text{L/giếng}$ vào đĩa 96-giếng, ngoài ra thêm 25 $\mu\text{L/giếng}$ dịch nuôi cấy của 11 các tế bào lai thu được bằng phương pháp của Ví dụ 1 hoặc phương pháp tương đương của nó vào đĩa, và ủ đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Các kháng nguyên được nhận biết bởi các kháng thể được sản xuất bởi các tế bào lai không phải là tế bào lai sản xuất-kháng thể TINA1 được xác nhận từ trước là CD9, CD46, CD55, CD59, CD71, CD73, CD147, CD276, EpCAM, hoặc EGFR. Các tế bào NCI-H322 2×10^4 tế bào/mL (môi trường RPMI1640 có bổ sung 20% Low IgG FBS) được gây giống trong đó ở nồng độ 50 $\mu\text{L/giếng}$. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, nuôi cấy các tế bào trong 3 ngày trong tủ ấm CO_2 ở 37°C . Sau khi nuôi cấy, loại bỏ dịch nổi, và thêm 10% WST-10%FBS-RPMI1640 ở 100 $\mu\text{L/giếng}$ vào đĩa này. Sau khi ủ trong 1 giờ trong tủ ấm CO_2 37°C , xác định số lượng các tế bào sống bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa (từ OD₄₅₀ đến OD₆₄₀, infinite 200, Tecan Trading AG). Trong số các dịch nuôi cấy của các tế bào lai đã đánh giá, các Kháng thể kháng CD59, CD71, EGFR, EpCAM, hoặc TROP2 được xác nhận có hoạt tính nhập nội mạnh và hoạt tính độc tố miễn dịch (FIG. 10).

4-3) Chênh lệch hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch trong số các kháng thể kháng CD59, CD71, EGFR, EpCAM, hoặc TROP2

Thêm lần lượt dung dịch đã pha loãng của DT3C (0, 0,004, 0,04, 0,4, 4, hoặc 40 $\mu\text{g/mL}$) 25 $\mu\text{L/giếng}$ vào đĩa 96-giếng, tiếp đó thêm lần lượt kháng thể (40 $\mu\text{g/mL}$) 25 $\mu\text{L/giếng}$ vào đĩa, và ủ đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Ngoài ra, 2×10^4 tế bào/mL (Môi trường RPMI1640 có bổ sung 20% Low IgG FBS) các tế bào NCI-H322 được gây giống trong đó 50 $\mu\text{L/giếng}$. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, nuôi cấy các tế bào trong 3 ngày trong tủ ấm CO_2 37°C . Sau khi nuôi cấy, loại bỏ dịch nổi, và thêm 10% WST-1-10% FBS-

RPMI1640 100 μ L/giếng vào đĩa. Sau khi ủ trong 1 giờ trong tủ ấm CO₂ 37°C, xác định số lượng các tế bào sống bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa (từ OD₄₅₀ đến OD₆₄₀). Trong số các kháng thể đã đánh giá, TINA1, một kháng thể kháng TROP2, có hoạt tính nhập nội mạnh nhất và hoạt tính độc tố miễn dịch (FIG. 11).

4-4) Chênh lệch mức hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch trong số các dòng kháng thể kháng-TROP2

Các kháng thể kháng-TROP2 TINA1 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư phổi NCI-H322), KCL7A3 và KCL2D6 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư tụy KCL-MOH1), Pr1E11 và Pr8H10 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt Pc-1), và NY16 và NY17 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư tuyến tụy PK-1) thu được bằng phương pháp của Ví dụ 1 hoặc phương pháp tương đương, và 77220 có bán trên thị trường (R&D Systems Inc.) được đánh giá về hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch theo cách tương tự như trong Ví dụ 4-3). Do đó, trong số 8 kháng thể kháng-TROP2, kháng thể TINA1 có hoạt tính mạnh nhất (FIG. 12).

[Ví dụ 5: Xác định trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi của gen kháng thể TINA1 và sản xuất kháng thể TINA1 khảm (sau đây được gọi là cTINA1)]

5-1) Xác định trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi của gen kháng thể TINA1

5-1-1) Điều chế ARNtt từ tế bào lai sản xuất-kháng thể TINA1

Để khuếch đại các ADN bổ trợ mã hoá các vùng thay đổi của kháng thể TINA1, điều chế ARNtt từ tế bào lai sản xuất-kháng thể TINA1 bằng cách sử dụng bộ kit phân lập ARNtt (Roche Applied Science).

5-1-2) Tổng hợp ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready)

ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready) được tổng hợp bằng cách sử dụng ARNtt (100 ng) được điều chế trong mục 5-1-1), và bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.).

5-1-3) Khuếch đại ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 bằng 5'-RACE PCR, và xác định trình tự

UPM (Universal Primer A Mix: được bao gồm trong bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE) và oligonucleotit có trình tự là 5'-AGAGTTCCAGGTCAAGGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 33: đoạn môi mG2aVR2) được sử dụng làm các đoạn môi để khuếch đại vùng thay đổi ADN bổ trợ của gen chuỗi nặng bằng PCR. UPM được bao gồm trong bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) được sử dụng, và mG2aVR2 được thiết kế từ trình tự của một vùng ổn định chuỗi nặng của chuột (IgG2a) trong cơ sở dữ liệu.

ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi này và ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready) được tổng hợp trong Ví dụ 5-1-2) làm khuôn mẫu. Tiến hành PCR theo tài liệu hướng dẫn sử dụng của bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) trên chương trình touchdown PCR bằng cách sử dụng KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.) làm polymeraza.

Tinh chế ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nặng được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR MinElute (QIAGEN N.V.) và tiếp đó tách dòng bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen Corp.). Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nặng đã tách dòng được phân tích bằng cách xác định trình tự. Các đoạn môi xác định trình tự được sử dụng là đoạn môi mG2aVR2 nêu trên được thiết kế từ trình tự của vùng ổn định chuỗi nặng của chuột trên cơ sở dữ liệu, và NUP (Đoạn môi Nested Universal A: được bao gồm trong bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE).

Tiến hành phân tích trình tự bằng cách sử dụng thiết bị phân tích trình tự gen ("ABI PRISM 3700 ADN Analyzer" hoặc "Applied Biosystems 3730xl Analyzer", Applied Biosystems, Inc.), và phản ứng xác định trình tự sử dụng Gene Amp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

Trình tự nucleotit đã được xác định của ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 của Danh mục trình tự, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

5-1-4) Khuếch đại ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 bằng 5'-RACE PCR, và xác định trình tự

UPM (Universal Primer A Mix: được bao gồm trong bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE) và oligonucleotit có trình tự là 5'-AGTCCAACCTGTTTCAGGACGCCATTTTGTCTG-3' (SEQ ID NO: 34: đoạn mồi mKVR2) được sử dụng làm các đoạn mồi để khuếch đại vùng thay đổi ADN bổ trợ của gen chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 bằng PCR. UPM được bao gồm trong bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) được sử dụng, và mKVR2 được thiết kế từ trình tự của vùng ổn định chuỗi nhẹ của chuỗi trên cơ sở dữ liệu.

ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi này và ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready) được tổng hợp trong Ví dụ 5-1-2) làm khuôn mẫu. Tiến hành PCR theo tài liệu hướng dẫn sử dụng của bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) trên chương trình touchdown PCR bằng cách sử dụng KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.) làm polymeraza.

Tinh chế ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR MinElute (QIAGEN N.V.) và tiếp đó tách dòng bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen Corp.). Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ đã tách dòng được phân tích bằng cách xác định trình tự.

Các đoạn mồi xác định trình tự được sử dụng là đoạn mồi mKVR2 nêu trên được thiết kế từ trình tự của vùng ổn định chuỗi nhẹ của chuỗi trên cơ sở dữ liệu, và NUP.

Phân tích trình tự và phản ứng xác định trình tự sử dụng thiết bị nêu trên.

Trình tự nucleotit đã được xác định của ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 của Danh mục trình tự, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

5-2) Sản xuất kháng thể cTINA1

5-2-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK

Mảnh khoảng 5,4 kb thu được bằng phân cắt plasmit pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) bằng các enzym giới hạn XbaI và PmeI, và mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi κ của người và vùng ổn định chuỗi κ của người được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 được nối với nhau bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) để sản xuất pcDNA3.3/LK.

pcDNA3.3/LK được sử dụng làm khuôn mẫu trong PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây. Mảnh thu được khoảng 3,8 kb được phosphoryl hoá và tiếp đó tự nối để tạo cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK có trình tự tín hiệu, vị trí tách dòng, và gen vùng ổn định chuỗi κ của người xuôi dòng phía sau đoạn khởi đầu CMV.

Bộ đoạn mồi

5'-tataccgtcgacctctagctagagcttggc-3' (SEQ ID NO: 35: đoạn mồi 3.3-F1)

5'-gctatggcagggcctgccgccccgacgttg-3' (SEQ ID NO: 36: đoạn mồi 3.3-R1)

5-2-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1

Mảnh ADN của pCMA-LK không có trình tự ADN mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi κ của người và vùng ổn định chuỗi κ của người bằng cách phân cắt bằng XbaI và PmeI, và mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá axit amin của trình

tự tín hiệu chuỗi nặng của người và vùng ổn định IgG1 của người để thể hiện trong SEQ ID NO: 6 được nối với nhau bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1 có trình tự tín hiệu, vị trí tách dòng, và gen vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người xuôi dòng phía sau đoạn khởi đầu CMV.

5-2-3) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể cTINA1

Mảnh ADN có chứa ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nặng thu được trong Ví dụ 5-1-3) làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym giới hạn BlnI của vật truyền biểu hiện chuỗi nặng loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1 bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể cTINA1. Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/cTINA1". Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể cTINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 8. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 7 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 cũng được mô tả trong FIG. 1.

Bộ đoạn mồi cho chuỗi nặng kháng thể cTINA1

5'-

CCAGATGGGTGCTGAGCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAG-
3' (SEQ ID NO: 37: đoạn mồi TINA1H-F)

5'-

CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACGGTGACCGCGGTCCCTGCGCCCCAGAC
-3' (SEQ ID NO: 38: đoạn mồi TINA1H-R)

5-2-4) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

Mảnh ADN có chứa ADN hỗ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN hỗ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ thu được trong Ví dụ 5-1-4) làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym giới hạn BsiWI của vật truyền mục đích-chung biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1. Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/cTINA1". Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 10. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 cũng được mô tả trong FIG. 2.

Bộ đoạn mồi cho chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

5'-

ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC-
3' (SEQ ID NO: 39: đoạn mồi TINA1L-F)

5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGC-3'
(SEQ ID NO: 40: đoạn mồi TINA1L-R)

5-2-5) Sản xuất quy mô nhỏ kháng thể cTINA1

Các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) được nuôi cấy cấp hai và nuôi cấy theo tài liệu hướng dẫn sử dụng.

1×10^7 tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) ở pha tăng trưởng logarit được pha loãng với môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) đến 9,6 mL, tiếp đó gây giống trong chai Square Storage 30 mL (Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Inc.), và tiếp đó lắc-nuôi cấy ở tốc độ 90 vòng/phút trong 1 giờ trong tủ ẩm 8% CO₂ 37°C. Polyetylenimin (Polyscience #24765; 30 µg) được hoà tan trong Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µL). Tiếp đó, vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ (6 µg) và vật truyền biểu hiện chuỗi nặng (4 µg) được điều chế

bằng cách sử dụng bộ kit plasmit PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) được thêm vào Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 μ L). Dung dịch hỗn hợp vật truyền biểu hiện/Opti-Pro SFM (200 μ L) được thêm vào dung dịch hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM (200 μ L), và hỗn hợp được khuấy nhẹ, để tiếp trong 5 phút, và tiếp đó được thêm vào các tế bào FreeStyle 293F. Dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy lắc ở tốc độ 90 vòng/phút trong 7 ngày trong tủ ẩm 8% CO₂ 37°C được lọc qua lọc Minisart-Plus (Sartorius AG) và sử dụng làm mẫu để đánh giá.

Kháng thể khảm TINA1 của người thu được bằng cách kết hợp pCMA-G1/cTINA1 và pCMA-LK/cTINA1 được chỉ định là "kháng thể cTINA1".

[Ví dụ 6: Thiết kế kháng thể được làm tương thích với người kháng thể đơn dòng kháng-TROP2 của chuột]

6-1) Thiết kế phiên bản được làm tương thích với người của TINA1

6-1-1) Xây dựng mô hình phân tử của vùng thay đổi của TINA1

Tiến hành xây dựng mô hình phân tử của các vùng thay đổi của TINA1 bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như xây dựng mô hình tính tương đồng (Methods in Enzymology, 203, 121-153 (1991)). Các vùng thay đổi của TINA1 được xác định ở trên được so sánh với các trình tự nguyên phát (các cấu trúc ba chiều thu được từ các cấu trúc tinh thể tia-X là sẵn có) của các vùng thay đổi globulin miễn dịch của người được đăng ký với Ngân hàng Dữ liệu Protein (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)). Do đó, 1ZEA được lựa chọn là một trình tự có mức tương đồng trình tự cao nhất với vùng thay đổi chuỗi nặng của TINA1 trong số các kháng thể tương tự có khuyết đoạn trong các khung của chúng. 3IU4 cũng được lựa chọn là một trình tự có mức tương đồng trình tự cao nhất với vùng thay đổi chuỗi nhẹ của TINA1. Các cấu trúc ba chiều của các vùng khung được điều chế như "mô hình khung" bằng cách kết hợp các hệ tọa độ của 1ZEA và 3IU4 tương ứng với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của TINA1. Do đó, cấu dạng điển hình của từng CDR được hợp nhất vào mô hình khung.

Cuối cùng, tính toán năng lượng để loại trừ tiếp xúc bất lợi giữa các nguyên tử để thu được các mô hình phân tử có thể có của các vùng thay đổi TINA1 về mặt năng lượng. Tiến hành các quy trình này bằng cách sử dụng chương trình dự đoán cấu trúc ba chiều của protein có bán trên thị trường Discovery Studio (Accelrys, Inc.).

6-1-2) Thiết kế trình tự axit amin cho TINA1 được làm tương thích với người

Xây dựng cấu trúc kháng thể TINA1 được làm tương thích với người bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như ghép nối CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Kháng thể nhận được lựa chọn trên cơ sở tính tương đồng của các axit amin trong các vùng khung. Các trình tự của các vùng khung của TINA1 được so sánh với các trình tự của tất cả các khung của người được đăng ký trong cơ sở dữ liệu Kabat (Nuc. Acid Res., 29, 205-206 (2001)) của các trình tự axit amin kháng thể. Do đó, kháng thể HuPR1A3 được lựa chọn làm chất tiếp nhận do mức tương đồng trình tự 74% của nó đối với các vùng khung. Gốc axit amin của các vùng khung trong HuPR1A3 được sắp thẳng hàng với gốc axit amin của các vùng khung của TINA1 để nhận dạng các vị trí của axit amin không tương ứng giữa chúng. Vị trí của các gốc này được phân tích bằng cách sử dụng mô hình ba chiều của TINA1 được xây dựng cấu trúc ở trên. Tiếp đó, các gốc của chất cho được ghép nối vào chất nhận được lựa chọn theo tiêu chí do Queen và các đồng tác giả quy định (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Một vài gốc cho được chọn này được chuyển sang kháng thể nhận để xây dựng cấu trúc trình tự TINA1 được làm tương thích với người như được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

6-2) Làm tương thích với người của chuỗi nặng TINA1

6-2-1) Chuỗi nặng loại-hTINA1-H1:

Chuỗi nặng TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 21 (isoleuxin) bằng valin, axit amin vị trí 28 (prolin) bằng alanin, axit amin vị trí 30 (loxin) bằng valin, axit amin vị trí 35 (axit glutamic) bằng alanin, axit amin vị trí 36 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí

38 (arginin) bằng lysin, axit amin vị trí 39 (isoleuxin) bằng valin, axit amin vị trí 57 (glutamin) bằng arginin, axit amin vị trí 58 (lysin) bằng glutamin, axit amin vị trí 59 (methionin) bằng alanin, axit amin vị trí 62 (lysin) bằng glutamin, axit amin vị trí 65 (lysin) bằng axit glutamic, axit amin vị trí 67 (isoleuxin) bằng methionin, axit amin vị trí 87 (phenylalanin) bằng valin, axit amin vị trí 88 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 89 (phenylalanin) bằng isoleuxin, axit amin vị trí 91 (loxin) bằng alanin, axit amin vị trí 92 (axit glutamic) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 95 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 102 (isoleuxin) bằng loxin, axit amin vị trí 104 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 107 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 111 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 112 (threonin) bằng valin, axit amin vị trí 114 (phenylalanin) bằng tyrosin, axit amin vị trí 132 (alanin) bằng glutamin, và axit amin vị trí 135 (alanin) bằng loxin đối với chuỗi nặng TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nặng loại-hTINA1-H1".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại-hTINA1-H1 được mô tả trong SEQ ID NO: 12 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19, trình tự gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140, và trình tự gồm có gốc axit amin 141 đến 470 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nặng, và vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 được mô tả trong SEQ ID NO: 11 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 57, trình tự gồm có các nucleotit từ 58 đến 420, và trình tự gồm có các nucleotit từ 421 đến 1410 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 11 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 11 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 cũng được mô tả trong FIG. 3.

6-2-2) Chuỗi nặng loại-hTINA1-H2:

Chuỗi nặng TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 21 (isoleuxin) bằng valin, axit amin vị trí 28 (prolin) bằng alanin, axit amin vị trí 30 (loxin) bằng valin, axit amin vị trí 35 (axit

glutamic) bằng alanin, axit amin vị trí 36 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 38 (arginin) bằng lysin, axit amin vị trí 39 (isoleuxin) bằng valin, axit amin vị trí 57 (glutamin) bằng arginin, axit amin vị trí 58 (lysine) bằng glutamin, axit amin vị trí 59 (methionin) bằng alanin, axit amin vị trí 62 (lysine) bằng glutamin, axit amin vị trí 65 (lysine) bằng axit glutamic, axit amin vị trí 67 (isoleuxin) bằng methionin, axit amin vị trí 87 (phenylalanin) bằng valin, axit amin vị trí 88 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 89 (phenylalanin) bằng isoleuxin, axit amin vị trí 92 (axit glutamic) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 95 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 102 (isoleuxin) bằng loxin, axit amin vị trí 104 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 107 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 111 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 112 (threonin) bằng valin, axit amin vị trí 114 (phenylalanin) bằng tyrosin, axit amin vị trí 132 (alanin) bằng glutamin, và axit amin vị trí 135 (alanin) bằng loxin đối với chuỗi nặng TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nặng loại-hTINA1-H2".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại-hTINA1-H2 được mô tả trong SEQ ID NO: 14 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19, trình tự gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140, và trình tự gồm có gốc axit amin 141 đến 470 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nặng, và vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 được mô tả trong SEQ ID NO: 13 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 57, trình tự gồm có các nucleotit từ 58 đến 420, và trình tự gồm có các nucleotit từ 421 đến 1410 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 cũng được mô tả trong FIG. 4.

6-2-3) Chuỗi nặng loại-hTINA1-H3:

Chuỗi nặng TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 28 (prolin) bằng alanin, axit amin vị trí 30 (loxin)

bằng valin, axit amin vị trí 36 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 38 (arginin) bằng lysin, axit amin vị trí 39 (isoleucine) bằng valin, axit amin vị trí 58 (lysine) bằng glutamine, axit amin vị trí 65 (lysine) bằng axit glutamic, axit amin vị trí 67 (isoleucine) bằng methionine, axit amin vị trí 87 (phenylalanine) bằng valin, axit amin vị trí 88 (alanine) bằng threonine, axit amin vị trí 92 (axit glutamic) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 95 (alanine) bằng threonine, axit amin vị trí 102 (isoleucine) bằng leucine, axit amin vị trí 104 (asparagine) bằng serin, axit amin vị trí 107 (asparagine) bằng serin, axit amin vị trí 111 (threonine) bằng alanine, axit amin vị trí 112 (threonine) bằng valin, axit amin vị trí 114 (phenylalanine) bằng tyrosine, axit amin vị trí 132 (alanine) bằng glutamine, và axit amin vị trí 135 (alanine) bằng leucine đối với chuỗi nặng TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nặng loại-hTINA1-H3".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại-hTINA1-H3 được mô tả trong SEQ ID NO: 16 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19, trình tự gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140, và trình tự gồm có gốc axit amin 141 đến 470 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nặng, và vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 được mô tả trong SEQ ID NO: 15 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 57, trình tự gồm có các nucleotit từ 58 đến 420, và trình tự gồm có các nucleotit từ 421 đến 1410 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 15 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 15 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 cũng được mô tả trong FIG. 5.

6-3) Làm tương thích với người chuỗi nhẹ TINA1

6-3-1) Chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L1:

Chuỗi nhẹ TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 23 (valin) bằng glutamine, axit amin vị trí 28 (histidin) bằng prolin, axit amin vị trí 29 (lysine) bằng serin, axit amin vị trí 30 (phenylalanine) bằng serin, axit amin vị trí 31 (methionine) bằng leucine, axit amin

vị trí 33 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 40 (serin) bằng threonin, axit amin vị trí 62 (glutamin) bằng lysin, axit amin vị trí 63 (serin) bằng alanin, axit amin vị trí 80 (axit aspartic) bằng serin, axit amin vị trí 83 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 90 (alanin) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 93 (phenylalanin) bằng lōxin, axit amin vị trí 98 (valin) bằng lōxin, axit amin vị trí 100 (alanin) bằng prolin, axit amin vị trí 103 (lōxin) bằng phenylalanin, axit amin vị trí 120 (alanin) bằng glutamin, axit amin vị trí 126 (lōxin) bằng isolōxin, và axit amin vị trí 129 (alanin) bằng threonin đối với chuỗi nhẹ TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L1".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L1 được mô tả trong SEQ ID NO: 18 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20, trình tự gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129, và trình tự gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 được mô tả trong SEQ ID NO: 17 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 60, trình tự gồm có các nucleotit từ 61 đến 387, và trình tự gồm có các nucleotit từ 388 đến 702 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 17 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 17 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 cũng được mô tả trong FIG. 6.

6-3-2) Chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L2:

Chuỗi nhẹ TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 28 (histidin) bằng prolin, axit amin vị trí 29 (lysin) bằng serin, axit amin vị trí 30 (phenylalanin) bằng serin, axit amin vị trí 31 (methionin) bằng lōxin, axit amin vị trí 33 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 40 (serin) bằng threonin, axit amin vị trí 62 (glutamin) bằng lysin, axit amin vị trí 63 (serin) bằng alanin, axit amin vị trí 80 (axit aspartic) bằng serin, axit amin vị trí 83 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 90 (alanin) bằng axit aspartic,

axit amin vị trí 93 (phenylalanin) bằng loxin, axit amin vị trí 98 (valin) bằng loxin, axit amin vị trí 100 (alanin) bằng prolin, axit amin vị trí 103 (loxin) bằng phenylalanin, axit amin vị trí 120 (alanin) bằng glutamin, axit amin vị trí 126 (loxin) bằng isoloxin, và axit amin vị trí 129 (alanin) bằng threonin đối với chuỗi nhẹ TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L2".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L2 được mô tả trong SEQ ID NO: 20 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20, trình tự gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129, và trình tự gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 được mô tả trong SEQ ID NO: 19 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 60, trình tự gồm có các nucleotit từ 61 đến 387, và trình tự gồm có các nucleotit từ 388 đến 702 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 19 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 19 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 cũng được mô tả trong FIG. 7.

6-3-3) Chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L3:

Chuỗi nhẹ TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 28 (histidin) bằng prolin, axit amin vị trí 29 (lysin) bằng serin, axit amin vị trí 30 (phenylalanin) bằng serin, axit amin vị trí 31 (methionin) bằng loxin, axit amin vị trí 33 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 40 (serin) bằng threonin, axit amin vị trí 62 (glutamin) bằng lysin, axit amin vị trí 63 (serin) bằng glutamin, axit amin vị trí 80 (axit aspartic) bằng serin, axit amin vị trí 83 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 90 (alanin) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 93 (phenylalanin) bằng loxin, axit amin vị trí 98 (valin) bằng loxin, axit amin vị trí 100 (alanin) bằng prolin, axit amin vị trí 103 (loxin) bằng phenylalanin, axit amin vị trí 120 (alanin) bằng glutamin, axit amin vị trí 126 (loxin) bằng isoloxin, và axit amin vị trí 129 (alanin) bằng threonin đối với chuỗi

nhẹ TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L3".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L3 được mô tả trong SEQ ID NO: 22 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20, trình tự gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129, và trình tự gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 được mô tả trong SEQ ID NO: 21 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 60, trình tự gồm có các nucleotit từ 61 đến 387, và trình tự gồm có các nucleotit từ 388 đến 702 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 21 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 21 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 cũng được mô tả trong FIG. 8.

[Ví dụ 7: Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện kháng thể hTINA1 và sản xuất kháng thể]

7-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng hTINA1

7-1-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-H1

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-H1 được thể hiện trong các nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hTINA1-H1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 11 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt). Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá vùng thay đổi của hTINA1-H1 được khuếch đại bằng cách sử dụng mảnh AND đã tổng hợp làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym giới hạn BlnI của vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1 bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu

hiện hTINA1-H1. Vật truyền biểu hiện thu được được ký hiệu là "pCMA-G1/hTINA1-H1".

Bộ đoạn mỗi

5'-agctcccagatgggtgctgagc-3' (SEQ ID NO: 41: đoạn mỗi EG-Inf-F)

5'-gggcccttggtggaggctgagc-3' (SEQ ID NO: 42: đoạn mỗi EG1-Inf-R)

7-1-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-H2

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-H2 được thể hiện trong các vị trí nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hTINA1-H2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 13 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-H2 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-1-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/hTINA1-H2".

7-1-3) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-H3 được thể hiện trong các vị trí nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hTINA1-H3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 15 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-H3 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-1-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/hTINA1-H3".

7-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ hTINA1

7-2-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L1

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-L1 được thể hiện trong các vị trí nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của hTINA1-L1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 17 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt). Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá vùng thay đổi của hTINA1-L1 được khuếch đại bằng cách sử dụng mảnh AND đã tổng hợp làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn mỗi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym

giới hạn BsiWI của vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR Infusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L1. Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/hTINA1-L1".

Bộ đoạn mỗi

5'-ctgtggatctccggcgctacggc-3' (SEQ ID NO: 43: đoạn mỗi CM-LKF)

5'-ggagggggcgggccaccgtacg-3' (SEQ ID NO: 44: đoạn mỗi KCL-Inf-R)

7-2-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L2

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-L2 được thể hiện trong các vị trí nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của hTINA1-L2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 19 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-L2 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-2-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/hTINA1-L2".

7-2-3) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L3

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi-hTINA1-L3 được thể hiện trong các vị trí nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của hTINA1-L3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 21 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-L3 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-2-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/hTINA1-L3".

7-3) Sản xuất và tinh chế kháng thể hTINA1

7-3-1) Sản xuất quy mô nhỏ kháng thể hTINA1

Kháng thể được sản xuất theo cách tương tự như trong Ví dụ 5-2-5).

Kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H1 và pCMA-LK/hTINA1-L1 được chỉ định là "hTINA1-H1L1"; kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H2 và pCMA-LK/hTINA1-L1 được

chỉ định là "hTINA1-H2L1"; kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H2 và pCMA-LK/hTINA1-L2 được chỉ định là "hTINA1-H2L2"; và kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H3 và pCMA-LK/hTINA1-L3 được chỉ định là "hTINA1-H3L3".

7-3-2) Sản xuất kháng thể hTINA1

hTINA1-H1L1, hTINA1-H2L1, hTINA1-H2L2, và hTINA1-H3L3 được sản xuất bằng phương pháp dưới đây.

Các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) được nuôi cấy cấp hai và được nuôi cấy theo tài liệu hướng dẫn sử dụng. $1,2 \times 10^9$ tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) ở pha tăng trưởng logarit được gây giống trong bình nón Fernbach Erlenmeyer 3 L (Corning Inc.), tiếp đó được pha loãng với môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) đến $1,0 \times 10^6$ tế bào/ml, và tiếp đó lắng-nuôi cấy ở 90 vòng/phút trong 1 giờ trong tủ ẩm 8% CO₂ 37°C. Polyetylenimin (Polyscience #24765; 3,6 mg) được hoà tan trong Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). Tiếp đó, vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ (0,8 mg) và vật truyền biểu hiện chuỗi nặng (0,4 mg) được điều chế bằng cách sử dụng bộ kit plasmit PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) được thêm vào Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). Dung dịch hỗn hợp vật truyền biểu hiện/Opti-Pro SFM (20 ml) được thêm vào dung dịch hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM (20 ml), và hỗn hợp được khuấy nhẹ, để tiếp trong 5 phút, và tiếp đó được thêm vào các tế bào FreeStyle 293F. Dịch nổi nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy lắng ở 90 vòng/phút trong 7 ngày trong tủ ẩm 8% CO₂ 37°C được lọc qua lọc Disposable Capsule (ADVANTEC #CCS-045-E1H).

7-3-3) Tinh chế kháng thể hTINA1

Kháng thể được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy thu được trong mục 7-3-2) ở trên bằng hai bước bằng cách sử dụng sắc ký ái lực rProtein A (từ 4 đến 6°C) và hydroxyapatit gồm (nhiệt độ trong phòng). Tiến hành các bước thay thế dịch đệm sau khi tinh chế bằng sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4 đến 6°C. Trước hết, dịch

nồi nuôi cấy được áp dụng vào MabSelect SuRe (do GE Healthcare Japan Corporation sản xuất, cột HiTrap) được làm cân bằng bằng PBS. Sau khi nhập toàn bộ dịch nuôi cấy vào cột, cột được rửa bằng PBS với lượng ít nhất hai lần thể tích cột. Tiếp theo, các phân đoạn có chứa-kháng thể được thu gom bằng cách rửa giải bằng dung dịch 2 M arginin hydroclorua (pH 4,0). Các phân đoạn được thay thế-dịch đệm bằng PBS bằng cách thẩm tách (Thermo Fisher Scientific, Inc., hộp thẩm tách Slide-A-Lyzer) và tiếp đó được pha loãng 5-lần bằng dịch đệm chứa 5 mM natri phosphat và 50 mM MES (pH 7,0). Dung dịch kháng thể thu được được áp dụng vào cột gồm hydroxyapatit (Bio-Rad Laboratories, Inc., cột hydroxyapatit Bio-Scale CHT Type-I) được cân bằng bằng dịch đệm có chứa 5 mM NaPi, 50 mM MES, và 30 mM NaCl (độ pH 7,0). Các phân đoạn có chứa-kháng thể được thu gom bằng cách rửa giải gradien nồng độ tuyến tính bằng cách sử dụng natri clorua. Các phân đoạn được thay thế dịch đệm bằng HBSor (25 mM histidin/5% sorbitol, pH 6,0) bằng cách thẩm tách (Thermo Fisher Scientific, Inc., hộp thẩm tách Slide-A-Lyzer). Cuối cùng, cô các phân đoạn và điều chỉnh đến nồng độ IgG 20 mg/ml hoặc cao hơn bằng cách sử dụng dụng cụ lọc UF ly tâm VIVASPIN 20 (ngưỡng phân tử lượng: UF10K, Sartorius AG, 4°C), và được sử dụng như mẫu đã tinh chế.

[Ví dụ tham khảo 1: Sản xuất vật truyền biểu hiện kháng thể hRS7 và sản xuất kháng thể hRS7]

Kháng thể hRS7 được sản xuất dựa trên các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2003/074566.

1-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể hRS7

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nặng kháng thể hRS7 được thể hiện trong các nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể hRS7 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 29 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể hRS7 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-1-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là

"pCMA-G1/hRS7". Trình tự axit amin của kháng thể chuỗi nặng hRS7 được thể hiện trong SEQ ID NO: 30 của Danh mục trình tự.

1-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể hRS7

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ kháng thể hRS7 được thể hiện trong các nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể hRS7 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 31 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể hRS7 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-2-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/hRS7". Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể hRS7 được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 của Danh mục trình tự.

1-3) Sản xuất và tinh chế kháng thể hRS7

1-3-1) Sản xuất kháng thể hRS7

Kháng thể hRS7 được sản xuất theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-3-2) bằng cách kết hợp pCMA-G1/hRS7 và pCMA-LK/hRS7.

1-3-2) Tinh chế kháng thể hRS7

Kháng thể này được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy thu được trong mục 1-3-1) theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-3-3).

[Ví dụ 8: Xác định ái lực gắn kết-kháng nguyên của kháng thể hTINA1 và kháng thể hRS7]

8-1) Xác định ái lực gắn kết-kháng nguyên bằng cách sử dụng kháng thể (dịch nổi nuôi cấy) được sản xuất ở quy mô nhỏ

Kháng thể được thử nghiệm về hằng số phân ly của nó đối với kháng nguyên (thể khảm Fc TROP-2 của người tái tổ hợp) bằng cách sử dụng Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) theo phương pháp bắt giữ kháng thể này như một phối tử vào kháng thể kháng-IgG (Fab) của người được cố định và thử nghiệm kháng nguyên này như một chất phân tích. Khoảng 2000 RU kháng thể kháng-IgG (Fab) của người (bộ kit bắt giữ Fab của người, GE Healthcare

Japan Corporation) được liên kết cộng hoá trị với chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) bằng phương pháp ngẫu hợp amin. Theo cách tương tự, kháng thể này được cố định vào tế bào dòng chảy tham chiếu. Dịch đệm chạy được sử dụng là HBS-EP+ (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20). Dịch nổi nuôi cấy có chứa kháng thể được thêm trong 80 giây vào chip được cố định-kháng thể kháng-IgG (Fab) của người, và tiếp đó, các dịch pha loãng theo bậc (từ 1 đến 1000 nM) kháng nguyên lần lượt được thêm vào đó ở tốc độ dòng chảy 30 μ L/phút trong 300 giây. Do đó, theo dõi pha phân ly trong 600 giây. 10 mM Gly-HCl (pH 1,5) có chứa 20% DMSO được thêm vào đó như dung dịch tái tạo ở tốc độ dòng chảy 10 μ L/phút trong 60 giây. Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng mô hình gắn kết hai hoá trị của phần mềm phân tích (phần mềm đánh giá BIAevaluation, phiên bản 4.1) để tính toán hằng số tốc độ kết hợp k_{on} , hằng số tốc độ phân ly k_{off} , và hằng số phân ly (KD ; $KD = k_{off}/k_{on}$).

[Bảng 1]

	Tên	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	6,3E-08
2	hTINA1-H2L1	6,9E-08
3	hTINA1-H2L2	7,1E-08
4	hTINA1-H3L3	5,8E-08
5	cTINA1	5,6E-08

Hoạt tính gắn kết sử dụng dịch nổi nuôi cấy làm mẫu thử kháng thể

8-2) Xác định ái lực gắn kết-kháng nguyên bằng cách sử dụng kháng thể đã tinh chế

Kháng thể lần lượt được thử nghiệm về hằng số phân ly của nó đối với kháng nguyên (thể khảm Fc TROP-2 của người tái tổ hợp) bằng cách sử dụng Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) theo phương pháp bắt giữ

kháng thể này dưới dạng phối tử vào kháng thể kháng-IgG (Fab) của người được cố định và thử nghiệm kháng nguyên này dưới dạng chất phân tích. Khoảng 2000 RU kháng thể kháng-IgG (Fab) của người (bộ kit bắt giữ Fab của người, GE Healthcare Japan Corporation) được liên kết cộng hoá trị với chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) bằng phương pháp ngẫu hợp amin. Theo cách tương tự, kháng thể này được cố định vào tế bào dòng chảy tham chiếu. Dịch đệm chạy được sử dụng là HBS-EP+ (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20). Kháng thể được thêm trong 1 phút vào chip được cố định-kháng thể kháng-IgG (Fab) của người, và tiếp đó, các dịch pha loãng theo bậc (từ 1 đến 1000 nM) kháng nguyên lần lượt được thêm vào đó ở tốc độ dòng chảy 30 μ L/phút trong 300 giây. Do đó, theo dõi pha phân ly trong 600 giây. 25 mM NaOH được pha loãng bằng dịch đệm chạy được thêm vào 2 lần như dung dịch tái tạo ở tốc độ dòng chảy 100 μ L/phút trong 3 giây. Phân tích dữ liệu theo cách tương tự như trên.

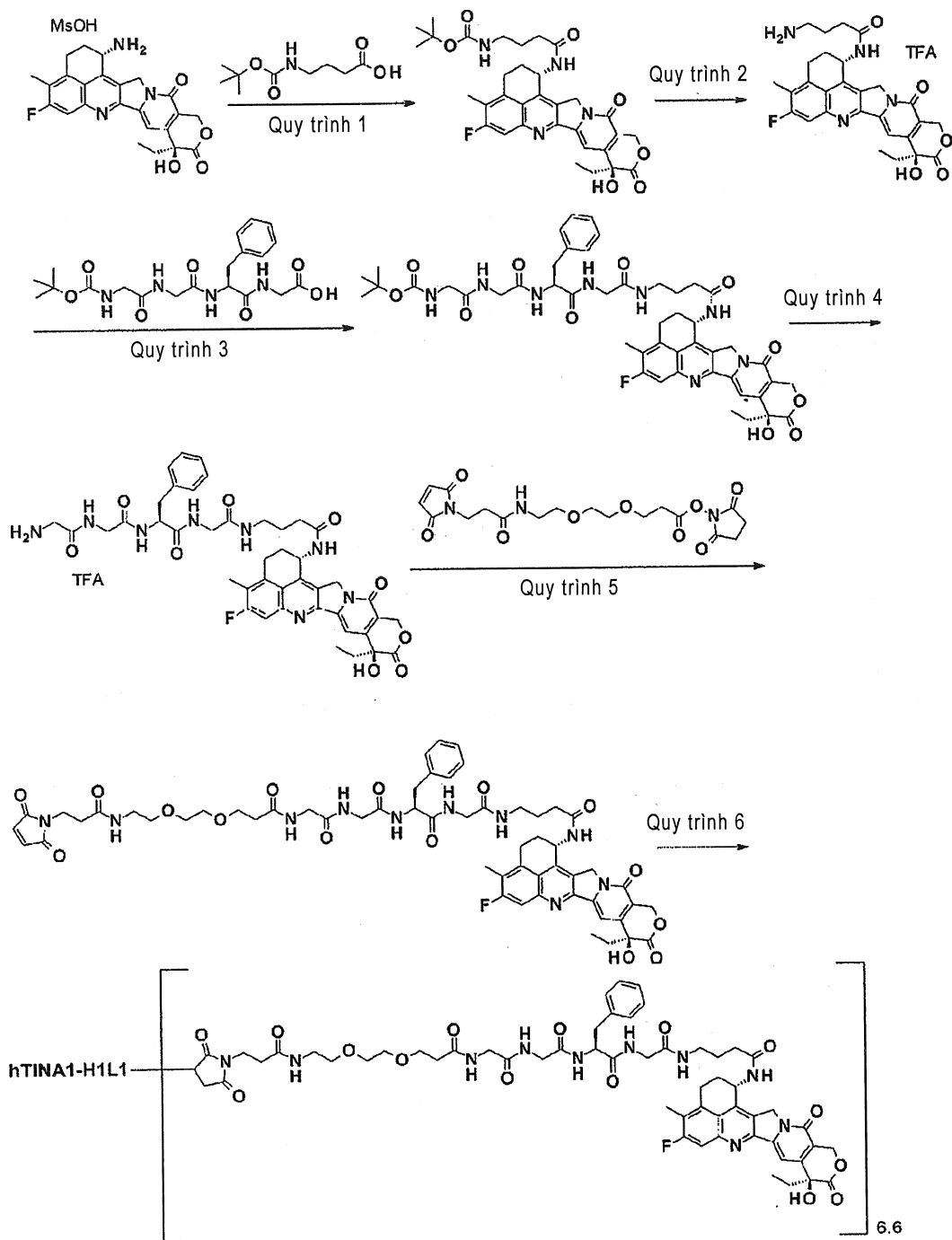
[Bảng 2]

	Tên	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	2,7E-08
2	hTINA1-H2L1	3,0E-08
3	hTINA1-H2L2	2,7E-08
4	hTINA1-H3L3	1,5E-08
5	hRS7	3,0E-10

Xác định hoạt tính gắn kết bằng cách sử dụng kháng thể đã tinh chế làm mẫu thử kháng thể

[Ví dụ 9: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (1)]

[Công thức 25]



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

Axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic (0,237 g, 1,13 mmol) được hoà tan trong diclometan (10 mL), N-hydroxysuccinimide (0,130 g, 1,13 mmol)

và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (0,216 g, 1,13 mmol) được thêm vào, và khuấy trong 1 giờ. Nhỏ giọt dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-dimethylformamide (10 mL) đã có sẵn exatecan mesylate (0,500 g, 0,94 mmol) và triethylamine (0,157 mL, 1,13 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - chloroform : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (0,595 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,2$ Hz), 1,31 (9H, s), 1,58 (1H, t, $J=7,2$ Hz), 1,66 (2H, t, $J=7,2$ Hz), 1,89-1,82 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t, $J=6,5$ Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d, $J=19,2$ Hz), 5,24 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, $J=6,3$ Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 8,40 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (APCI) m/z : 621 ($M+H$) $^+$.

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

Hợp chất (0,388 g, 0,61 mmol) thu được trong Quy trình 1 nêu trên được hoà tan trong dichloromethane (9 mL). Axit trifluoroacetic (9 mL) được thêm vào và khuấy trong 4 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - lớp hữu cơ được phân bố chloroform : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (0,343 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,2$ Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t, $J=7,0$ Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,26 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,72 (3H, brs), 7,82 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 8,54 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (APCI) m/z : 521 ($M+H$) $^+$.

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

N-(tert-butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanylglyxin (0,081 g, 0,19 mmol) được hoà tan trong diclometan (3 mL), N-hydroxysuccinimit (0,021 g, 0,19 mol) và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimitt hydroclorua (0,036 g, 0,19 mmol) được thêm vào và tiếp đó khuấy trong 3,5 giờ. Nhỏ giọt dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-dimetylformamit (1,5 mL) đã có sẵn hợp chất (0,080 g, 0,15 mmol) thu được trong Quy trình 2 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - clorofom : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (0,106 g, 73%).

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

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

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

Hợp chất (1,97 g, 2,10 mmol) thu được trong Quy trình 3 nêu trên được hoà tan trong diclometan (7 mL). Sau khi thêm vào axit trifloaxetic (7 mL), khuấy trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm, và đã có sẵn

toluen để chưng cất đồng sôi. Tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - lớp hữu cơ được phân bố clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (1,97 g, 99%).

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

MS (APCI) m/z : 839 ($M+H$) $^+$.

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

Thêm diisopropyletylamin (20,8 μL , 0,119 mmol) và N-succinimetyl 3-(2-(2-(3-maleinimitpropanamit)etoxy)etoxy)propanoat (50,7 mg, 0,119 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (1,20 mL) chứa hợp chất (100 mg, 0,119 mmol) thu được trong Quy trình 4 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - clorofom : metanol = 5 : 1 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (66,5 mg, 48%).

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

(4H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t, $J = 5,5$ Hz), 7,78 (1H, d, $J = 11,3$ Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,11 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 8,16 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 8,23 (1H, t, $J = 5,9$ Hz), 8,44 (1H, d, $J = 9,0$ Hz),

MS (APCI) m/z : 1149 ($M+H$)⁺.

Quy trình 6: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (10,0 mL) vào ống nghiệm 50 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; 4,6 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,4 \pm 0,1$, liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử hoá bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở nhiệt độ trong phòng, thêm dimethyl sulfoxit (0,567 mL) vào. Do đó, dung dịch dimethyl sulfoxit có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 ở trên (0,635 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy quay dạng ống (MTR-103, do AS ONE Corporation sản xuất) để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,127 mL; 18,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và được khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

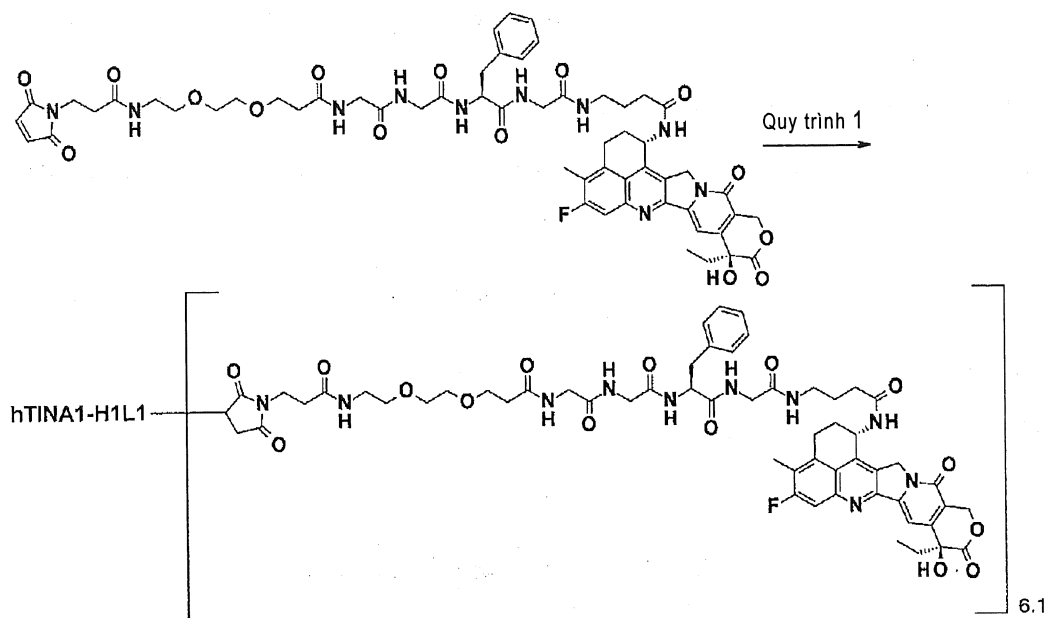
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 để thu được 35,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 (sử dụng $\epsilon_{D,280} = 4964$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (giá trị trung bình đo được)), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,70 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 94,5 mg (95%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,6.

[Ví dụ 10: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (2)]

[Công thức 26]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (2)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (2,00 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,4 \pm 0,1$, khử

liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimethyl sulfoxit (0,127 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được thêm vào và ủ để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy quay dạng ống để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

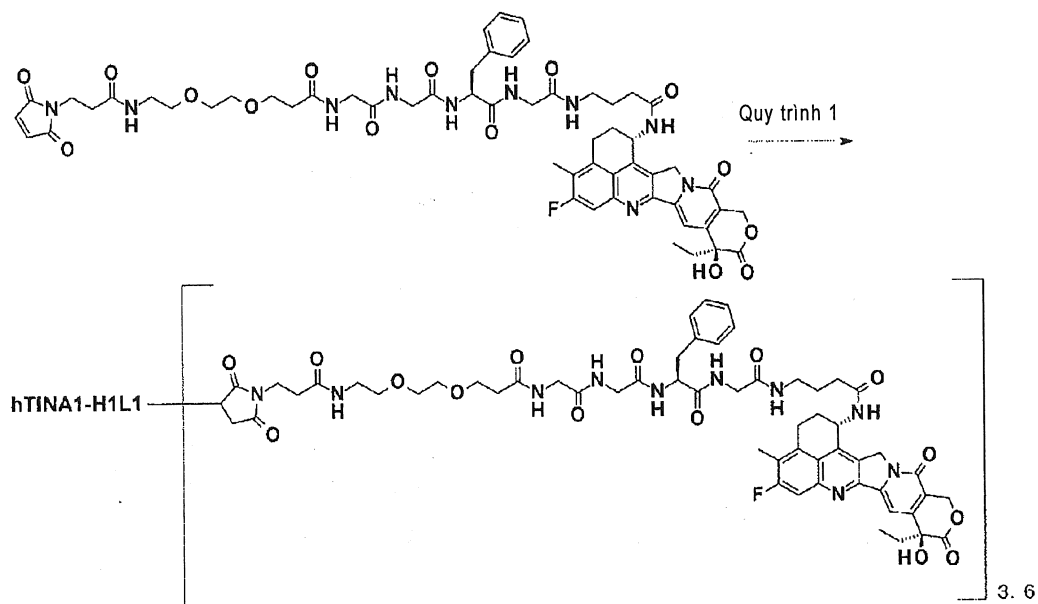
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (giá trị trung bình đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,08 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,7 mg (94%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6.1.

[Ví dụ 11: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (3)]

[Công thức 27]



Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (3)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể là 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (5,0 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0745 mL; 2,3 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimetyl sulfoxit (0,162 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp đó, dung dịch nước (0,0418 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM

NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

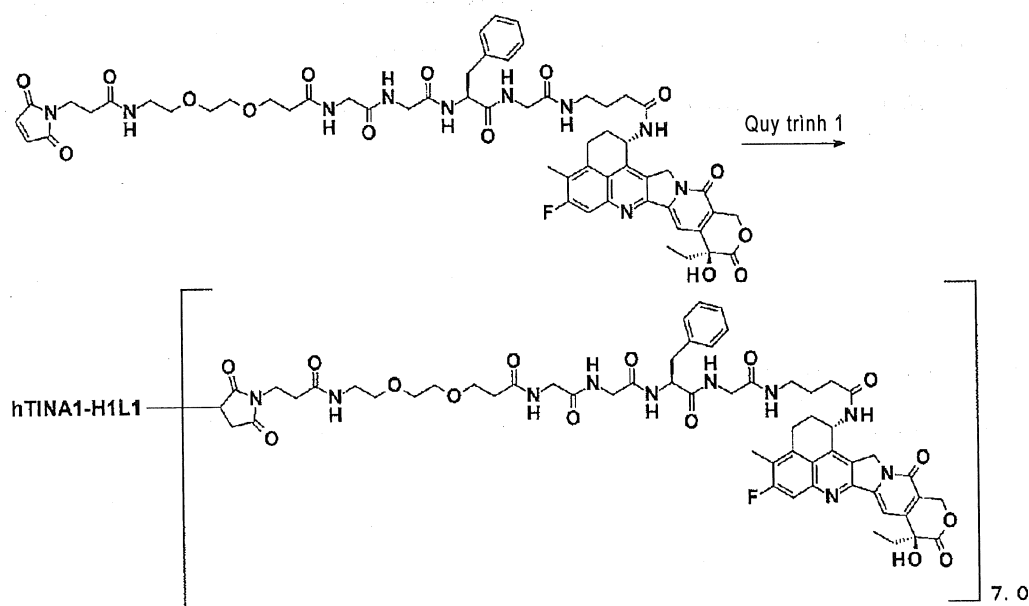
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 21,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (giá trị trung bình đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,19 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 46,0 mg (92%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 3,6, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 3,6.

[Ví dụ 12: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (4)]

[Công thức 28]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (4)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10,0 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (5,00 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,162 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimethyl sulfoxit (0,389 mL; 12,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0418 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 21,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

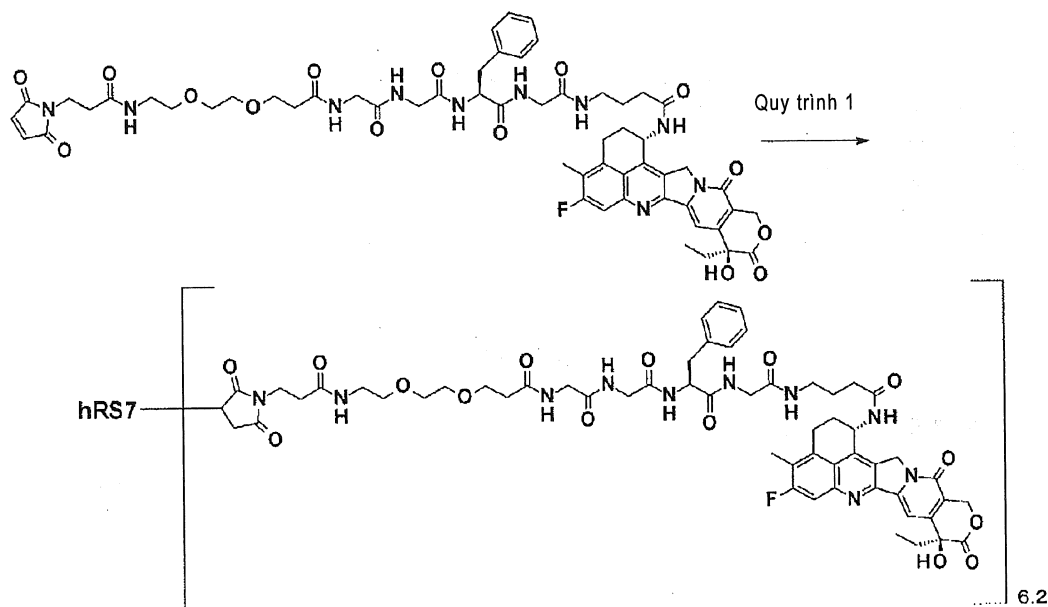
Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,19 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 46,0 mg (92%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 7,0, và số lượng trung bình của các

phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 7,0.

[Ví dụ tham khảo 13: Sản xuất hRS7 ADC (5)]

[Công thức 29]



Quy trình 1: Thử liên hợp thuốc-kháng thể (5)

Khử kháng thể: hRS7 được sản xuất trong Ví dụ tham khảo 1 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,56 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (2,0 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimethyl sulfoxit (0,127 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được

trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được thêm vào và ủ để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy quay dạng ống để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

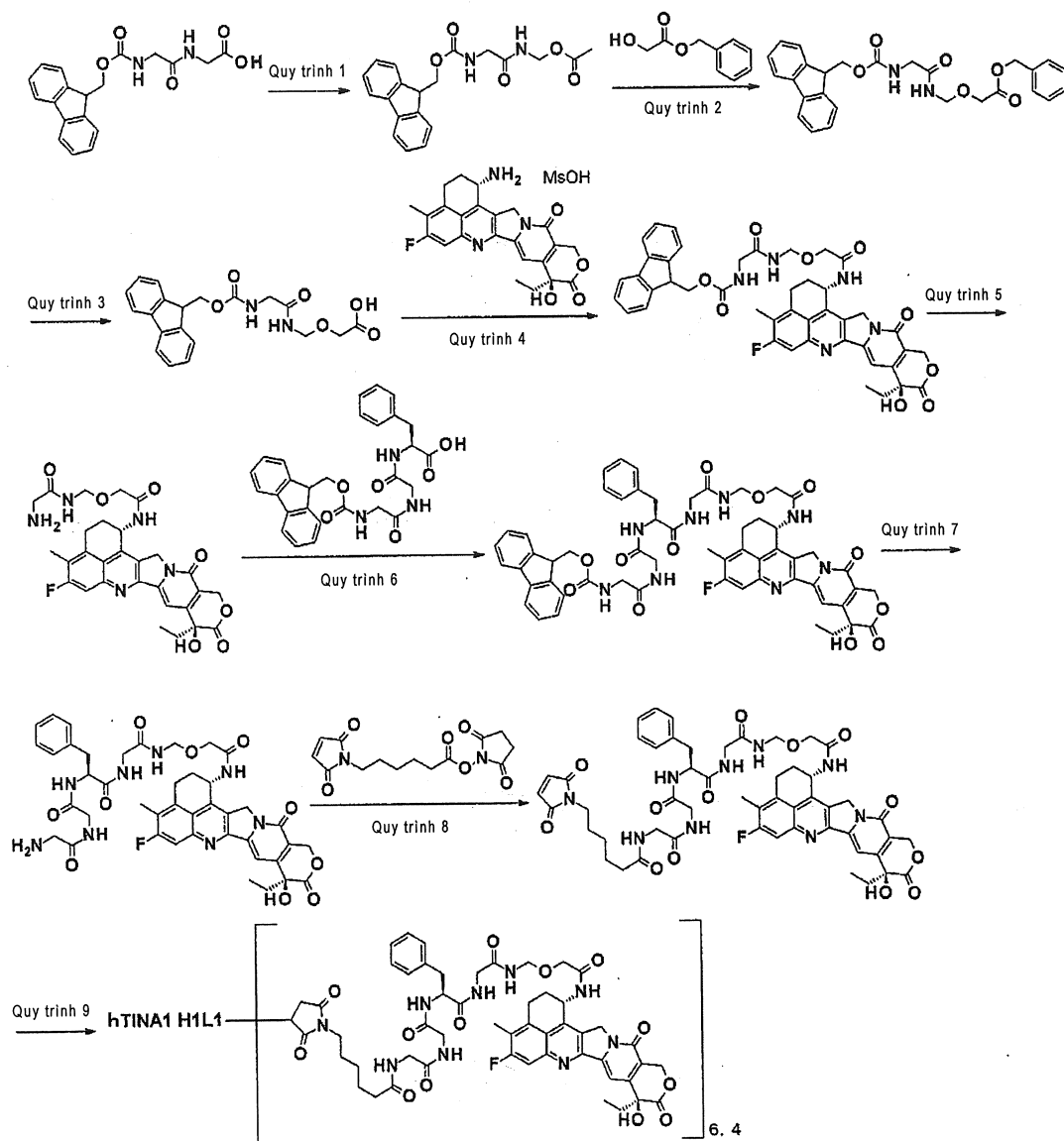
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 4964$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,04 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,4 mg (92%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,2.

[Ví dụ 14: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (6)]

[Công thức 30]



Quy trình 1: ({N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxyl}amino)metyl axetat

Thêm pyridin (1,16 ml, 14,7 mmol) và chì tetraaxetat (6,84 g, 14,7 mmol) vào hỗn hợp có chứa N-9-florenylmetoxycarbonylglyxylglyxin (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahydrofuran (120 ml), và toluen (40,0 ml), và gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu trong 5 giờ. Sau khi làm nguội dung dịch phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Celite, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hoà tan cặn thu được trong etyl axetat và rửa bằng nước và nước muối bão hoà, và tiếp đó làm khô lớp hữu cơ bằng magiê sulfat khan. Sau khi loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm, tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [hexan : etyl axetat = 9 : 1 (thể tích/thể tích) - etyl

axetat] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn không màu (3,00 g, 67%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,07 (3H, s), 3,90 (2H, d, $J=5,1$ Hz), 4,23 (1H, t, $J=7,0$ Hz), 4,46 (2H, d, $J=6,6$ Hz), 5,26 (2H, d, $J=7,0$ Hz), 5,32 (1H, brs), 6,96 (1H, brs), 7,32 (2H, t, $J=7,3$ Hz), 7,41 (2H, t, $J=7,3$ Hz), 7,59 (2H, d, $J=7,3$ Hz), 7,77 (2H, d, $J=7,3$ Hz).

Quy trình 2: Benzyl [(N-[(9H-floren-9-ylmethoxy)carbonyl]glyxyl}amino)metoxy] axetat

Thêm kali tert-butoxit (2,24 g, 20,0 mmol) vào dung dịch tetrahydrofuran (40,0 mL) chứa hợp chất (3,68 g, 10,0 mmol) thu được trong Quy trình 1 nêu trên và benzyl glycolat (4,99 g, 30,0 mmol), ở 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Dung dịch phản ứng đã có sẵn etyl axetat và nước ở 0°C và được chiết bằng etyl axetat và clorofom. Làm khô lớp hữu cơ thu được bằng natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm. Hoà tan cặn thu được trong dioxan (40,0 mL) và nước (10,0 mL), đã có sẵn natri hydro cacbonat (1,01 g, 12,0 mmol) và 9-florenylmetyl clorofomat (2,59 g, 10,0 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng đã có sẵn nước và được chiết bằng etyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ thu được bằng natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [hexan : etyl axetat = 100 : 0 (thể tích/thể tích) - 0 : 100] thu được hợp chất ở đề mục này ở chất dạng dầu không màu (1,88 g, 40%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,84 (2H, d, $J=5,5$ Hz), 4,24 (3H, t, $J=6,5$ Hz), 4,49 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 4,88 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 5,15-5,27 (1H, m), 5,19 (2H, s), 6,74 (1H, brs), 7,31-7,39 (7H, m), 7,43 (2H, t, $J=7,4$ Hz), 7,61 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 7,79 (2H, d, $J=7,4$ Hz).

Quy trình 3: Axit [(N-[(9H-floren-9-ylmethoxy)carbonyl]glyxyl}amino)metoxy]axetic

Hợp chất (1,88 g, 3,96 mmol) thu được trong Quy trình 2 nêu trên được hoà tan trong etanol (40,0 mL) và etyl axetat (20,0 ml). Sau khi thêm vào chất xúc tác paladi cacbon (376 mg), khuấy trong khí quyển hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Celite, và loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn không màu (1,52 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 3,62 (2H, d, $J=6,3$ Hz), 3,97 (2H, s), 4,18-4,32 (3H, m), 4,60 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 7,29-7,46 (4H, m), 7,58 (1H, t, $J=5,9$ Hz), 7,72 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 7,90 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 8,71 (1H, t, $J=6,5$ Hz).

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

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, thêm N,N-diisopropyletylamin (92,9 μL , 0,533 mmol) và N,N'-dixyclohexylcarbodiimít (0,143 g, 0,693 mmol) vào N,N-dimetylformamít (10,0 mL) vào dung dịch có chứa exatecan mesylat (0,283 g, 0,533 mmol), N-hydroxysuccinimít (61,4 mg, 0,533 mmol), và hợp chất (0,205 g, 0,533 mmol) thu được trong Quy trình 3 nêu trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - lớp hữu cơ được phân bố của clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt (0,352 g, 82%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,81 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,73-1,87 (2H, m), 2,06-2,20 (2H, m), 2,34 (3H, s), 3,01-3,23 (2H, m), 3,58 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 3,98 (2H, s), 4,13-4,25 (3H, m), 4,60 (2H, d, $J=6,7$ Hz), 5,09-5,22 (2H, m), 5,32-5,42 (2H, m), 5,50-5,59 (1H, m), 6,49 (1H, s), 7,24-7,30 (3H, m), 7,36 (2H, t, $J=7,4$ Hz), 7,53 (1H, t, $J=6,3$ Hz), 7,66 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 7,75 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 7,84 (2H, d, $J=7,4$ Hz), 8,47 (1H, d, $J=8,6$ Hz), 8,77 (1H, t, $J=6,7$ Hz).

MS (ESI) m/z : 802 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

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

Thêm piperidin (1,1 mL) vào dung dịch N,N-dimethylformamit (11,0 mL) có chứa hợp chất (0,881 g, 1,10 mmol) thu được trong Quy trình 4 nêu trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được hỗn hợp có chứa hợp chất nêu ở đề mục này. Hỗn hợp này được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

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

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, thêm N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (0,181 g, 0,878 mmol) vào dung dịch N,N-dimethylformamit (50,0 mL) có chứa hỗn hợp (0,439 mmol) thu được trong Quy trình 5 ở trên, N-hydroxysuccinimide (0,101 g, 0,878 mmol), và N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanine (Bảng độc quyền sáng chế Nhật số 2002-60351; 0,440 g, 0,878 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - chloroform : methanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu da cam nhạt (0,269 g, 58%).

MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)⁺.

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

Thêm piperidin (0,251 mL, 2,53 mmol) vào dung dịch N,N-dimethylformamit (4,00 mL) có chứa hợp chất (0,269 g, 0,253 mmol) thu được trong Quy trình 6 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ

dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được hỗn hợp có chứa hợp chất nêu ở đề mục này. Hỗn hợp này được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Quy trình 8: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Thêm N-sucxinimetyl 6-maleimit hexanoat (0,156 g, 0,506 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (10,0 mL) có chứa hợp chất (0,253 mmol) thu được trong Quy trình 7 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom – clorofom : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,100 g, 38%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,83 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (8H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,97 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,09 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=6,5 Hz), 8,48 (1H, d, J=9,0 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,5 Hz).

MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)⁺.

Quy trình 9: Thử liên hợp thuốc-kháng thể (6)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (10,0 mL) vào ống nghiệm 50 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP

(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; 4,6 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở nhiệt độ thông thường, dimethyl sulfoxit (0.567 mL) được thêm vào. Do đó, dung dịch dimethyl sulfoxit có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 ở trên (0,635 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy quay dạng ống để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,127 mL; 18,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

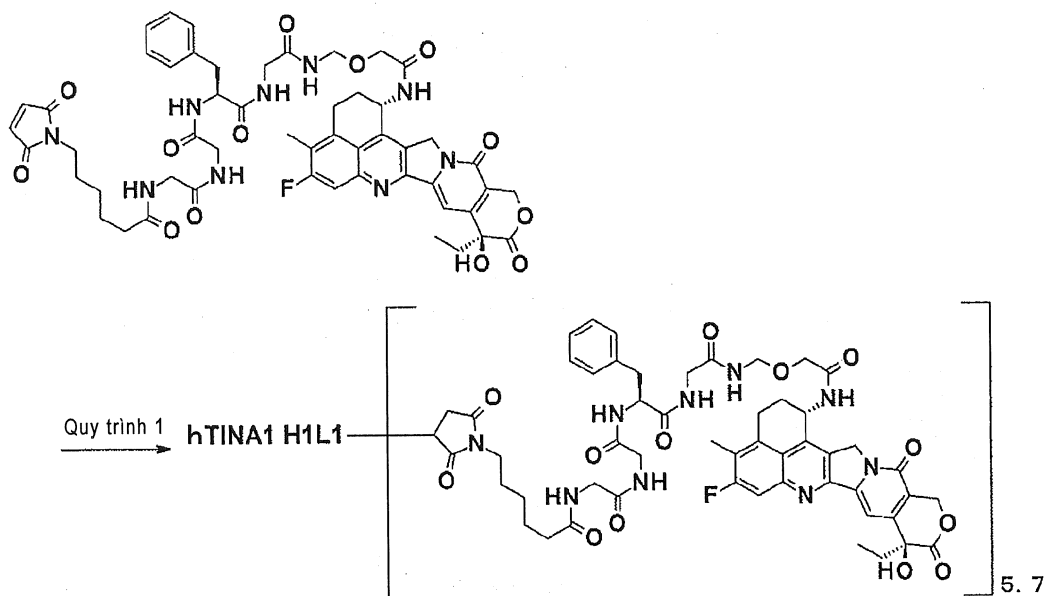
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 35,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,70 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 94,5 mg (95%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,4.

[Ví dụ 15: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (7)]

[Công thức 31]



Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (7)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (2,0 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C , dung dịch dimethyl sulfoxit (0,127 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 củ Ví dụ 14 được thêm vào và ủ để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy quay

dạng ống để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

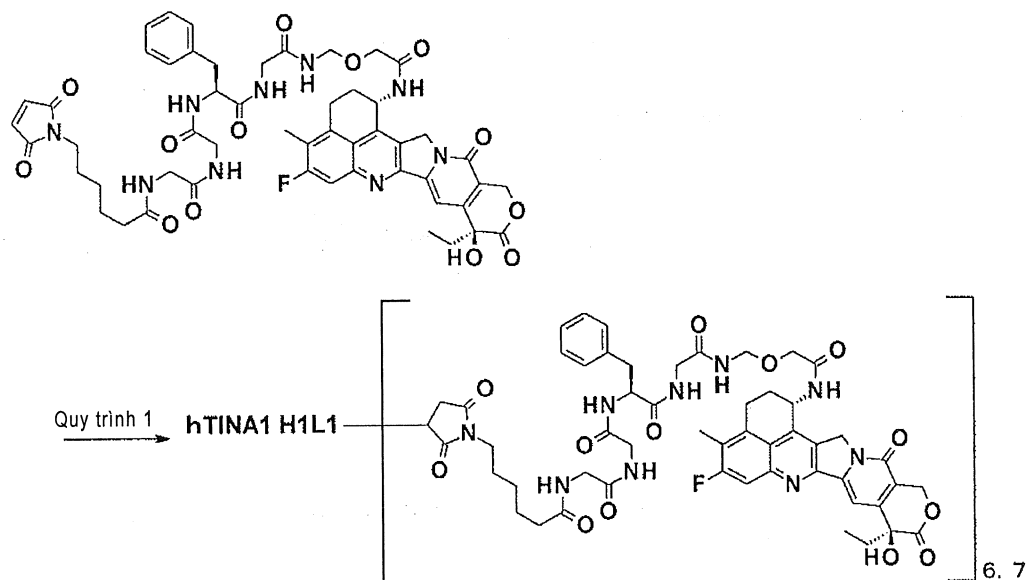
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,04 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,4 mg (92%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 5,7.

[Ví dụ 16: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (8)]

[Công thức 32]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (8)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (30,0

mL) vào bình đựng 100 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,4875 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,9721 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimethyl sulfoxit (2,33 mL; 12,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,251 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

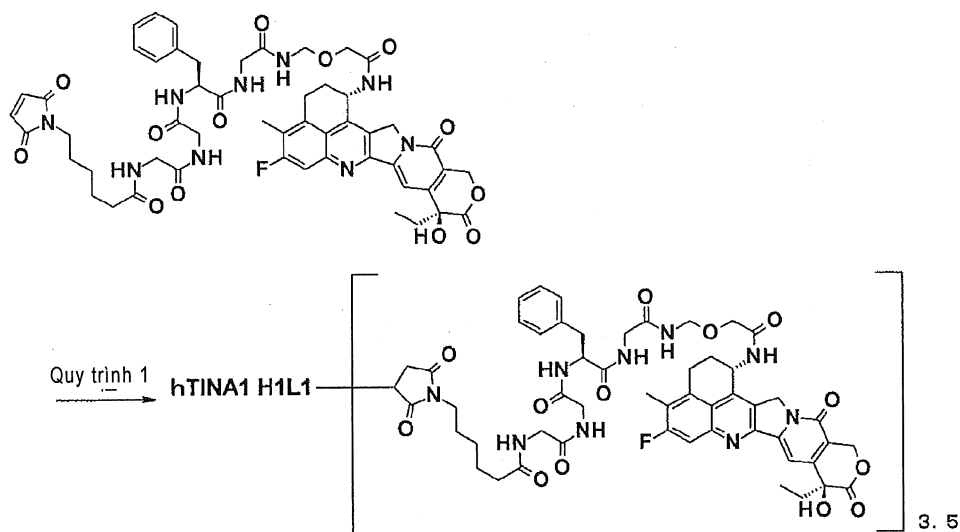
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 98,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này. Tiếp đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 17,5 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 14,6 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 256 mg (85%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,7, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 7,0.

[Ví dụ 17: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (9)]

[Công thức 33]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (9)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (5,0 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0778 mL; 2,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimetyl sulfoxit (0,162 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung

dịch nước (0,0418 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

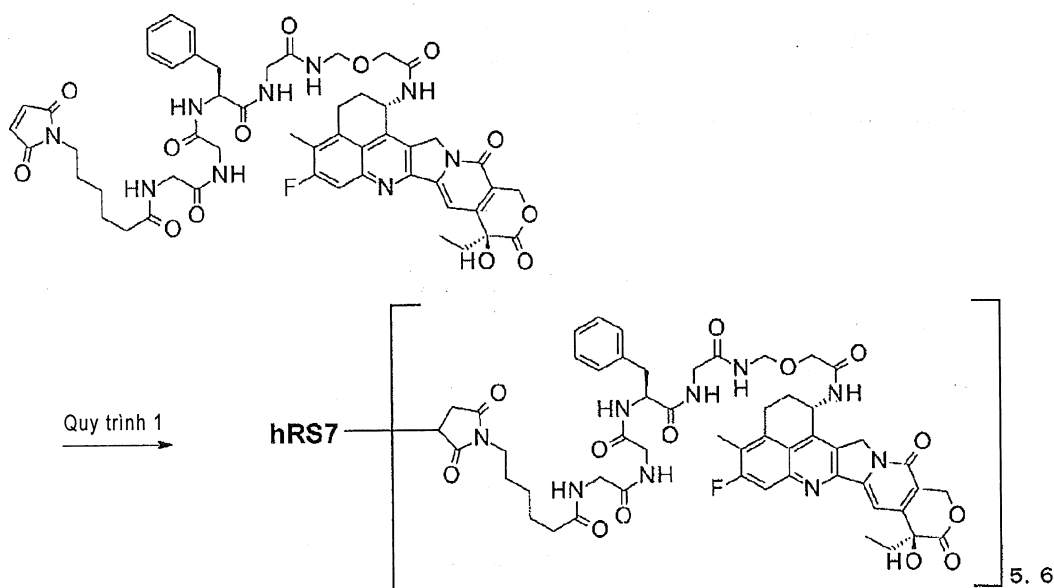
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 21,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,26 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 47,5 mg (95%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 3,5, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 3,6.

[Ví dụ tham khảo 18: Sản xuất hRS7 ADC (10)]

[Công thức 34]



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

Khử kháng thể: hRS7 được sản xuất trong Ví dụ tham khảo 1 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,56 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (2,0 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, thêm dung dịch dimetyl sulfoxit (0,1269 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 vào đó và ủ để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy quay dạng ống để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

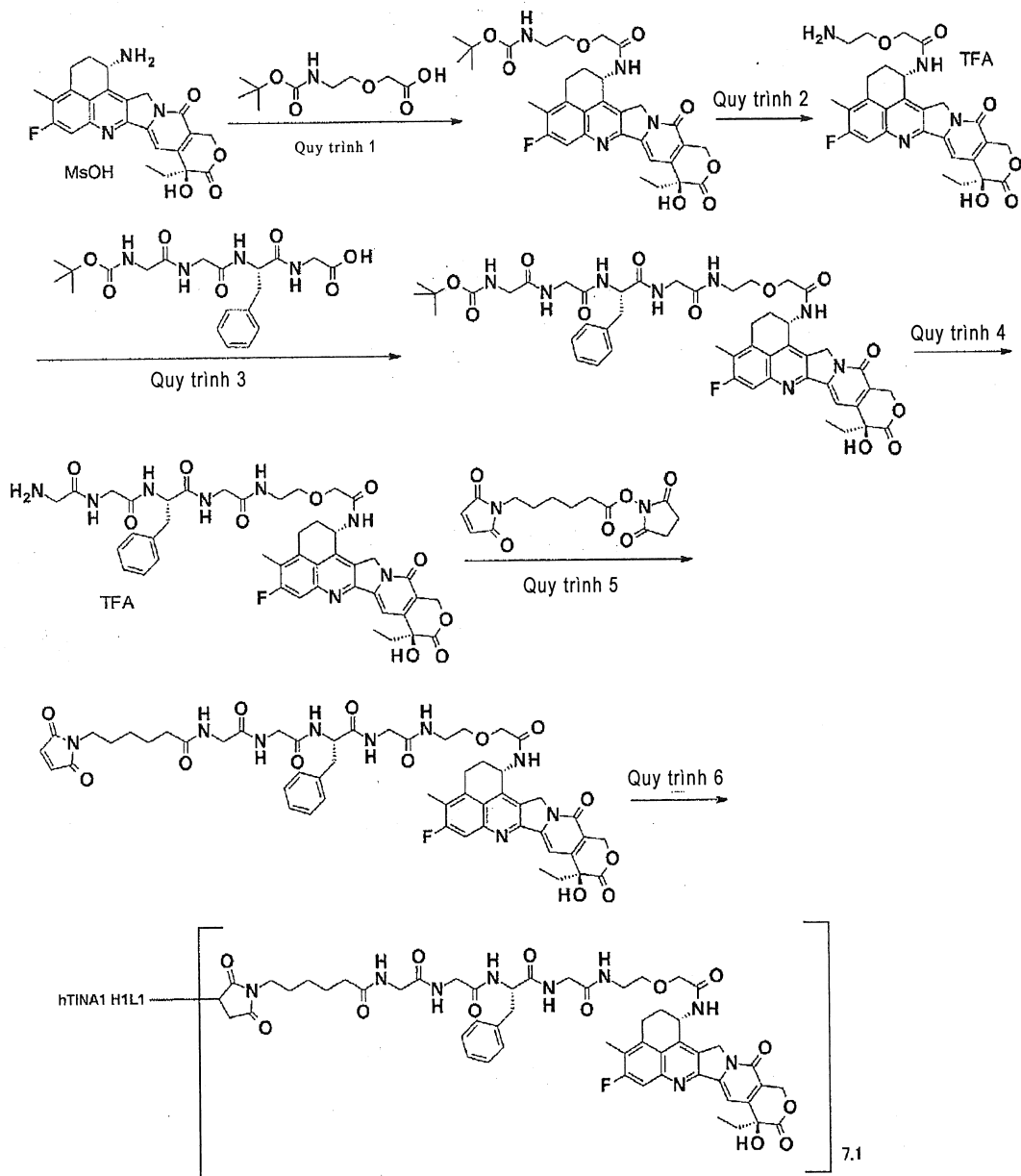
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 5178$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,07 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,6 mg (93%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 5,6.

[Ví dụ 19: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (11)]

[Công thức 35]



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

Exatecan mesylat (3,10 g, 5,47 mol) được cho phản ứng theo cách như Quy trình 1 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit {2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]etoxy}axetic (J. Med. Chem., 1992, Tập 35, trang 2928;

1,55 g, 6,01 mmol) thay vì axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (2,56 g, 73%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 4,05 (1H, d, $J = 15,1$ Hz), 5,14 (1H, d, $J = 18,7$ Hz), 5,22 (1H, d, $J = 18,7$ Hz), 5,40 (1H, d, $J = 16,6$ Hz), 5,44 (1H, d, $J = 16,6$ Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t, $J = 5,4$ Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d, $J = 10,9$ Hz), 8,49 (1H, d, $J = 9,1$ Hz).

MS (APCI) m/z : 637 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

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

Hợp chất (1,50 g, 2,36 mol) thu được trong Quy trình 1 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 2 của Ví dụ 1 thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (1,50 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J = 7,5$ Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,15-2,23 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,05 (2H, t, $J = 5,1$ Hz), 3,15-3,23 (2H, m), 3,71 (2H, t, $J = 5,1$ Hz), 4,10 (2H, s), 5,19 (1H, d, $J = 18,7$ Hz), 5,24 (1H, d, $J = 18,7$ Hz), 5,43 (2H, s), 5,58-5,66 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,73-7,84 (4H, m), 8,55 (1H, d, $J = 9,1$ Hz).

MS (APCI) m/z : 537 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

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

Hợp chất (554 mg, 0,85 mmol) thu được trong Quy trình 2 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 3 của Ví dụ 1 thu được hợp chất ở đề mục này (775 mg, 95%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,85 (3H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,36 (9H, s), 1,78-1,89 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, $J = 13,4, 9,8$ Hz), 2,95 (1H, dd, $J = 13,4, 4,3$ Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,23-3,32 (2H, m), 3,40-3,62 (8H, m), 3,73 (1H, dd, $J = 16,5, 5,5$ Hz), 4,03 (2H, s), 4,39-4,47 (1H, m), 5,17 (1H, d, $J = 18,9$ Hz), 5,25 (1H, d, $J = 18,9$ Hz), 5,41 (1H, d, $J = 16,8$ Hz), 5,45 (1H, d, $J = 16,8$ Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,54 (1H, s), 6,99 (1H, t, $J = 5,8$ Hz), 7,13-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,76-7,82 (2H, m), 7,90 (1H, t, $J = 5,2$ Hz), 8,13 (1H, d, $J = 7,9$ Hz), 8,27 (1H, t, $J = 5,8$ Hz), 8,49 (1H, d, $J = 8,5$ Hz).

MS (APCI) m/z : 955 ($M+H$) $^+$.

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

Hợp chất (630 mg, 0,659 mmol) thu được trong Quy trình 3 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 4 của Ví dụ 1 thu được hợp chất ở đề mục này (588 mg, 92%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,86 (3H, t, $J = 7,3$ Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, $J = 13,4, 10,1$ Hz), 2,99 (1H, dd, $J = 13,4, 4,3$ Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,24-3,32 (3H, m), 3,41-3,71 (7H, m), 3,86 (1H, dd, $J = 16,8, 5,8$ Hz), 4,04 (2H, s), 4,52 (1H, td, $J = 9,0, 4,1$ Hz), 5,17 (1H, d, $J = 18,9$ Hz), 5,25 (1H, d, $J = 18,9$ Hz), 5,41 (1H, d, $J = 16,5$ Hz), 5,45 (1H, d, $J = 16,5$ Hz), 5,56-5,65 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,13-7,26 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, $J = 11,0$ Hz), 7,87-8,01 (4H, m), 8,29-8,36 (2H, m), 8,46-8,55 (2H, m).

MS (APCI) m/z : 855 ($M+H$) $^+$.

Quy trình 5: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-

benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)ethyl]glyxinamit

Hợp chất (240 mg, 0,247 mmol) thu được trong Quy trình 4 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 5 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng triethylamin (31,4 μ L, 0,22 mmol) thay vì diisopropyletylamin và N-succinimityl 6-maleimit hexanoat (95,3 mg, 0,31 mmol) thay vì N-succinimityl 3-(2-(2-(3-maleinimitpropanamit)etoxy) etoxy)propanoat thu được hợp chất ở đề mục này (162 mg, 62%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,86 (3H, t, $J = 7,6$ Hz), 1,13-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,78-1,90 (2H, m), 2,09 (2H, t, $J = 7,6$ Hz), 2,14-2,21 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,74 (1H, dd, $J = 13,6, 9,7$ Hz), 2,96 (1H, dd, $J = 13,6, 4,5$ Hz), 3,08-3,24 (1H, m), 3,24-3,30 (1H, m), 3,33-3,40 (4H, m), 3,47-3,68 (7H, m), 3,72 (1H, dd, $J = 16,6, 5,7$ Hz), 4,03 (2H, s), 4,42 (1H, td, $J = 8,6, 4,2$ Hz), 5,17 (1H, d, $J = 18,7$ Hz), 5,25 (1H, d, $J = 18,7$ Hz), 5,40 (1H, d, $J = 17,2$ Hz), 5,44 (1H, d, $J = 17,2$ Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,25 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,81 (2H, m), 7,99 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 8,03-8,11 (2H, m), 8,22 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 8,47 (1H, d, $J = 9,1$ Hz).

MS (APCI) m/z : 1048 ($M+H$) $^+$.

Quy trình 6: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (11)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (3,0 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0488 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0972 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng 7,0

$\pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C , dung dịch dimethyl sulfoxit (0,2333 mL; 12,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 11 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0251 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

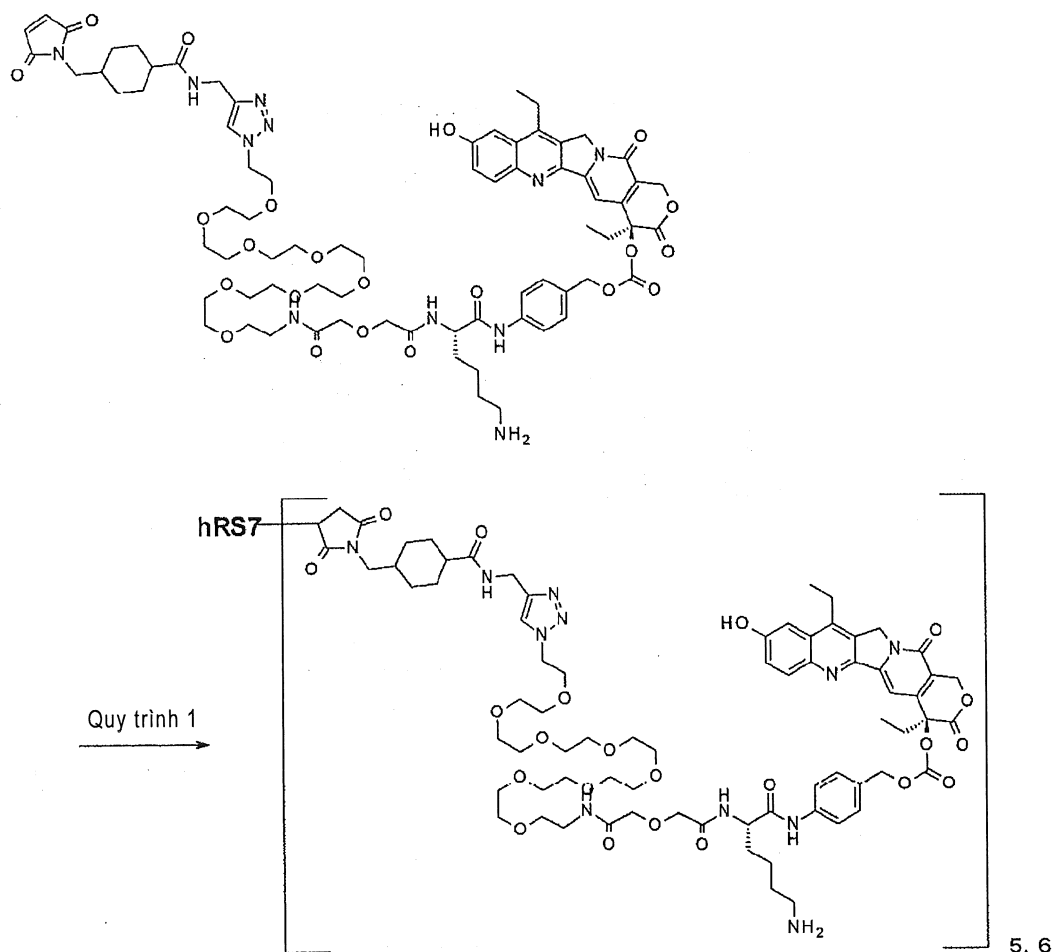
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 14 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ($\epsilon_{D,280} = 5193$ (giá trị trung bình đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20347$ (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 1,93 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 27,0 mg (90%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 7,1, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 7,0.

[Ví dụ tham khảo 2: Sản xuất hRS7-CL2A-SN38 (12)]

[Công thức 36]



Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (12)

Khử kháng thể: hRS7 được sản xuất trong Ví dụ tham khảo 1 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (10,0 mL) vào ống nghiệm 50 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; 4,6 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở nhiệt độ thông thường, dimethyl sulfoxit (0,567

mL) được thêm vào đó. Từ đó, dung dịch dimetyl sulfoxit có chứa 10 mM CL2A-SN38 được tổng hợp theo Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2011/0293513 (0,635 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) được thêm vào đó và khuấy bằng cách sử dụng máy quay dạng ống để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,127 mL; 18,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào đó và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

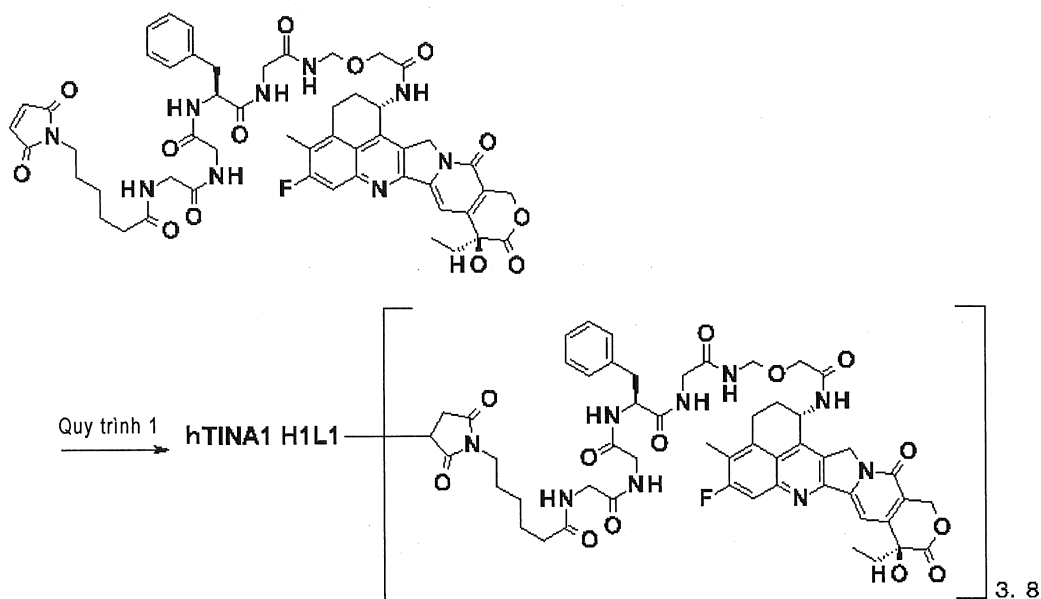
Tinh chế: Dung dịch phản ứng nêu trên được lọc qua gel lặp lại 2 lần và tinh chế được mô tả trong Quy trình chung D của Phương pháp sản xuất và tiếp đó được tinh chế bằng cách lọc gel qua cột NAP-25 sử dụng dung dịch 25 mM trehaloza có chứa polysorbat 80 (0,01%). Tiếp đó, chất rửa giải thu được (35 mL) được làm đông khô.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 cho chất rửa giải này trước khi đông khô, thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,78 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 97,3 mg (97%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể: 5,6.

[Ví dụ 20: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (13)]

[Công thức 37]



Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (13)

Khử kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể bằng 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6,0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (100 mL) được cho vào bình nón Erlenmeyer polycarbonat 250 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydro phosphat (1,4 mL) ở nhiệt độ trong phòng kèm theo khuấy sử dụng khuấy từ tính, và được nạp dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (1,62 mL; 2,5 đương lượng trên một phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng $7,0 \pm 0,1$, ngừng khuấy, và khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 2 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi làm mát dung dịch nêu trên đến 15°C , nhỏ giọt DMSO (3,24 mL) từ từ vào kèm theo khuấy. Từ đó, nhỏ giọt dung dịch DMSO có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 (1,76 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) vào từ từ. Dung dịch này được khuấy để liên hợp liên kết thuốc với kháng thể này ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,324 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC được thêm vào đó kèm theo khuấy và ủ để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc chưa phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

Tinh chế: Dung dịch nước axit axetic 20% (khoảng 0,52 mL) và ABS (100 mL) được thêm từ từ vào dung dịch nêu trên kèm theo khuấy để điều chỉnh pH của dung dịch đến $5,5 \pm 0,1$. Dung dịch này được siêu lọc (0,45 μm , màng PVDF) để loại bỏ chất đục màu trắng và thu được khoảng 200 mL dịch lọc. Dịch lọc này được tinh chế siêu lọc bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc gồm có màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30 KDa), bơm ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, mô-đen đầu Pump Head 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Cụ thể là, trong khi nhỏ giọt ABS (tổng cộng 1600 mL) làm dung dịch đệm để tinh chế vào dung dịch phản ứng, tiến hành tinh chế siêu lọc để loại bỏ các liên kết thuốc chưa được liên hợp và các chất thử phân tử lượng thấp khác, cũng thay thế dung dịch đệm bằng ABS, và cô tiếp dung dịch. Dung dịch đã tinh chế thu được được siêu lọc (0,22 μm , màng PVDF) thu được 88 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E và Quy trình chung F ($\epsilon_{D,280} = 5178$, và $\epsilon_{D,370} = 20217$ đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 9,96 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 876 mg (88%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 3,8, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 3,8.

[Ví dụ 21: Đánh giá tác dụng kháng khối u của ADC]

21-a) Tác dụng kháng khối u của ADC - (1)

Chuột: chuột BALB/c-nu/nu giống cái từ 5 đến 6 tuần tuổi (Charles River Laboratories Japan, Inc.) được để thích nghi với môi trường trong từ 4 đến 7 ngày trong điều kiện không có mầm bệnh cụ thể (SPF) trước khi sử dụng trong thí nghiệm. Các con chuột này được cho ăn thức ăn rắn đã tiệt khuẩn (FR-2,

Funabashi Farms Co., Ltd) và uống nước vôi đã tiệt khuẩn (được pha chế bằng cách bổ sung thêm từ 5 đến 15 ppm dung dịch natri hypochlorua).

Thử nghiệm và phương trình tính toán: Trong tất cả các nghiên cứu, trực chính và trực phụ của khối u được đo xác định 2 lần/tuần bằng cách sử dụng thước điện tử kỹ thuật số (CD-15C, Mitutoyo Corp.), và tính toán thể tích khối u (mm^3). Phương trình tính toán được thể hiện như dưới đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Trục chính (mm)} \times [\text{Trục phụ (mm)}]^2$$

Tất cả thể liên hợp thuốc-kháng thể được pha loãng bằng nước muối sinh lý (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) và được sử dụng với thể tích 10 mL/kg để sử dụng qua đường tĩnh mạch đuôi của từng con chuột. Dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được mua từ ATCC và được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý. 2×10^6 tế bào của huyền phù này được cấy ghép dưới da vào bụng bên phải của từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 7. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 7, 14, và 21. Kháng thể hTINA1-H1L1 chưa được liên hợp và kháng thể hRS7 chưa được liên hợp lần lượt được sử dụng làm đối chứng âm tính ở liều dùng 25 mg/kg qua cùng đường dùng như trên. Việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) hoặc (6) làm giảm rõ rệt thể tích khối u so với việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (12), và cả hai thể liên hợp thuốc-kháng thể đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 13). Trên hình vẽ này, trục hoành chỉ số ngày, và trục tung chỉ thể tích khối u.

21-b) Tác dụng kháng khối u của ADC - (2)

Dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người Bx-PC3 được mua từ ATCC được cấy ghép vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái và được cấy chuyển tiếp dưới dạng khối u rắn. Mảnh ghép khối u này được cấy ghép dưới da vào bụng bên phải của từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 16. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của

từng con chuột vào các Ngày 16, 23, và 30. Kháng thể hTINA1-H1L1 chưa được liên hợp và kháng thể hRS7 chưa được liên hợp lần lượt được sử dụng làm đối chứng âm tính ở liều dùng 25 mg/kg qua cùng đường dùng như trên. Việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) hoặc (6) làm giảm rõ rệt thể tích khối u so với việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (12), và cả hai thể liên hợp thuốc-kháng thể này đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 14).

21-c) Tác dụng kháng khối u của ADC - (3)

Dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người Capan-1 được mua từ ATCC được cấy ghép vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái và được cấy chuyển tiếp dưới dạng khối u rắn. Mảnh ghép khối u này được cấy ghép dưới da vào bụng bên phải của từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 18. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 18, 25, và 32. Kháng thể hTINA1-H1L1 chưa được liên hợp và kháng thể hRS7 chưa được liên hợp lần lượt được sử dụng làm đối chứng âm tính ở liều dùng 25 mg/kg qua cùng đường dùng như trên. Việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) hoặc (6) làm giảm rõ rệt thể tích khối u so với việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (12), và cả hai thể liên hợp thuốc-kháng thể này đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 15).

21-d) Tác dụng kháng khối u của ADC - (4)

COLO205 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-a) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 11. Tiêm tĩnh mạch thể liên hợp thuốc-kháng thể (2) hoặc (5) ở liều dùng 10 mg/kg và thể liên hợp thuốc-kháng thể (7) hoặc (10) ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 11, 18, và 25. Tất cả các thể liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), và (10) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 16).

21-e) Tác dụng kháng khối u của ADC - (5)

Bx-PC3 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-b) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 25. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), hoặc (10) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 25 và 32. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), và (10) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 17).

21-f) Tác dụng kháng khối u của ADC - (6)

COLO205 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-a) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 9. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 9 và 16. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 18).

21-g) Tác dụng kháng khối u của ADC - (7)

Bx-PC3 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-b) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 21. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 21 và 28. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 19).

21-h) Tác dụng kháng khối u của ADC - (8)

8×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư buồng trứng của người NIH:OVCAR-3 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong Matrigel (Becton, Dickinson and Company) và được cấy ghép dưới da vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 25. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 25. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 20).

21-i) Tác dụng kháng khối u của ADC - (9)

1×10^7 tế bào của dòng tế bào ung thư dạ dày của người NCI-N87 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 6. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 6. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 21).

21-j) Tác dụng kháng khối u của ADC - (10)

5×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H292 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 9. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 9. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 22).

21-k) Tác dụng kháng khối u của ADC - (11)

3×10^6 tế bào của dòng tế bào ung thư vòm họng của người FaDu được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 11. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 11. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 23).

21-l) Tác dụng kháng khối u của ADC - (12)

4×10^6 tế bào của dòng tế bào adenocarcinoma tuyến của người CFPAC-1 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 14. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3),

(4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 14. Tất cả các thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 24).

21-m) Tác dụng kháng khối u của ADC - (13)

CFPAC-1 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-l (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 14. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 1 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 14. Tất cả các thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 25).

21-n) Tác dụng kháng khối u của ADC - (14)

3×10^6 tế bào của dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người HPAC được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 12. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 12. Tất cả các thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 26).

21-o) Tác dụng kháng khối u của ADC - (15)

Các mô ung thư thực quản của người thu được từ Japan Health Sciences Foundation được cấy ghép dưới da vào chuột NOG (Central Institute for Experimental Animals) và để phát triển. Mảnh ghép khối u thu được được cấy ghép dưới da tiếp cho chuột NOD-scid giống cái (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 27. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 27. Cả hai thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) và (13) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của khối u (FIG. 27).

[Ví dụ 22: Đánh giá tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào của ADC]

BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, dòng tế bào adenocarcinoma phổi của người Calu-3 (ATCC), và dòng tế bào ung thư buồng trứng của người CaOV3 (ATCC) là các dòng tế bào dương tính-kháng nguyên TROP2, và dòng tế bào ung thư phổi của người Calu-6 (ATCC) và dòng tế bào u melanin da của người A375 (ATCC) là các dòng tế bào âm tính-kháng nguyên TROP2 đã được sử dụng để đánh giá tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào của từng ADC. BxPC3 và NCI-H292 được pha chế với môi trường RPMI1640 (Gibco) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò (Moregate Biotech), NIH:OVCAR-3 được pha chế với môi trường RPMI1640 có chứa 20% huyết thanh bào thai bò và 0,01 mg/mL insulin (Invitrogen Corp.), CFPAC-1 được pha chế với môi trường Dulbecco cải biến Iscove (Gibco) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò, FaDu, Calu-3, và Calu-6 được pha chế với môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle (ATCC) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò, và CaOV3 và A375 được pha chế với môi trường Eagle cải biến Dulbecco (Gibco) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò, cho đến lần lượt có nồng độ $2,2 \times 10^6$ tế bào/mL. Gây giống lần lượt huyền phù tế bào ở mật độ 90 μ L/giếng vào đĩa vi chuẩn độ 96-giếng cho mỗi dịch nuôi cấy tế bào. Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (4) hoặc (8) được pha loãng với môi trường RPMI1640 đến nồng độ 100 nM, 20 nM, 4 nM, 0,8 nM, 0,16 nM, 0,032 nM, hoặc 0,0064 nM, hoặc môi trường RPMI1640 để so sánh được thêm vào 10 μ L/giếng, và nuôi cấy các tế bào trong điều kiện 5% CO₂ ở 37°C trong 6 ngày. Sau khi nuôi cấy, các đĩa vi chuẩn độ được lấy ra khỏi tủ ấm và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng tương đương của Thử nghiệm tính sống còn tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và được khuấy trong 10 phút bằng cách sử dụng thiết bị khuấy đĩa. Sau khi phân giải tế bào, cường độ phát quang được xác định bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa.

Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào sau khi nuôi cấy trong 6 ngày được tính toán theo phương trình dưới đây:

$$\text{Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Giá trị trung bình từ các giếng đã bổ sung mẫu thử sau khi nuôi cấy trong 6 ngày - Giá trị trung bình từ các giếng không bổ sung mẫu thử lúc bắt đầu nuôi cấy

b: Giá trị trung bình từ các giếng đã bổ sung môi trường sau khi nuôi cấy trong 6 ngày - Giá trị trung bình từ các giếng không bổ sung môi trường lúc bắt đầu nuôi cấy

Tính toán giá trị GI_{50} theo phương trình dưới đây:

$$GI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog}((50 - f) \times (\text{LOG}_{10}(d) - \text{LOG}_{10}(c)) / (f - e) + \text{LOG}_{10}(d))$$

c: Nồng độ mẫu thử c

d: Nồng độ mẫu thử d

e: Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào ở nồng độ mẫu thử c

f: Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào ở nồng độ mẫu thử d

Các nồng độ c và d thiết lập mối liên quan $c > d$ 50% tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào.

Các thể liên hợp thuốc-kháng thể (4) và (8) thể hiện tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào của $GI_{50} < 1$ (nM) trên dòng tế bào dương tính kháng nguyên TROP2 BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCA3, CFPAC-1, FaDu, Calu-3, và CaOV3. Mặt khác, các thể liên hợp thuốc-kháng thể này không thể hiện tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào (> 100 (nM)) trên dòng tế bào âm tính-kháng nguyên TROP2 Calu-6 và A375.

Ghi chú danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 2: Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 3: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 4: Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 5: Trình tự nucleotit mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi κ của người và vùng ổn định chuỗi κ của người

SEQ ID NO: 6: Trình tự nucleotit mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi nặng của người và vùng ổn định IgG1 của người

SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể cTINA1

SEQ ID NO: 8: Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể cTINA1

SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể cTINA1

SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể cTINA1

SEQ ID NO: 11: Trình tự nucleotit của hTINA1-H1

SEQ ID NO: 12: Trình tự axit amin của hTINA1-H1

SEQ ID NO: 13: Trình tự nucleotit của hTINA1-H2

SEQ ID NO: 14: Trình tự axit amin của hTINA1-H2

SEQ ID NO: 15: Trình tự nucleotit của hTINA1-H3

SEQ ID NO: 16: Trình tự axit amin của hTINA1-H3

SEQ ID NO: 17: Trình tự nucleotit của hTINA1-L1

SEQ ID NO: 18: Trình tự axit amin của hTINA1-L1

SEQ ID NO: 19: Trình tự nucleotit của hTINA1-L2

SEQ ID NO: 20: Trình tự axit amin của hTINA1-L2

SEQ ID NO: 21: Trình tự nucleotit của hTINA1-L3

SEQ ID NO: 22: Trình tự axit amin của hTINA1-L3

SEQ ID NO: 23: Trình tự axit amin của CDRH1 của kháng thể TINA1

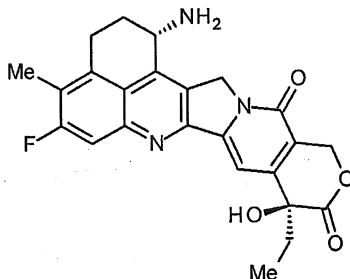
SEQ ID NO: 24: Trình tự axit amin của CDRH2 của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 25: Trình tự axit amin của CDRH3 của kháng thể TINA1

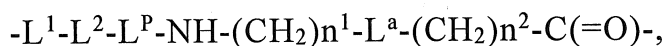
SEQ ID NO: 26: Trình tự axit amin của CDRL1 của kháng thể TINA1
SEQ ID NO: 27: Trình tự axit amin của CDRL2 của kháng thể TINA1
SEQ ID NO: 28: Trình tự axit amin của CDRL3 của kháng thể TINA1
SEQ ID NO: 29: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể hRS7
SEQ ID NO: 30: Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể hRS7
SEQ ID NO: 31: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể hRS7
SEQ ID NO: 32: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể hRS7
SEQ ID NO: 33: Đoạn mồi mG2aVR2
SEQ ID NO: 34: Đoạn mồi mKVR2
SEQ ID NO: 35: Đoạn mồi 3.3-F1
SEQ ID NO: 36: Đoạn mồi 3.3-R1
SEQ ID NO: 37: Đoạn mồi TINA1H-F
SEQ ID NO: 38: Đoạn mồi TINA1H-R
SEQ ID NO: 39: Đoạn mồi TINA1L-F
SEQ ID NO: 40: Đoạn mồi TINA1L-R
SEQ ID NO: 41: Đoạn mồi EG-Inf-F
SEQ ID NO: 42: Đoạn mồi EG1-Inf-R
SEQ ID NO: 43: Đoạn mồi CM-LKF
SEQ ID NO: 44: Đoạn mồi KCL-Inf-R

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thễ liên hợp thuốc - kháng thể, trong đó hợp chất kháng khối u có công thức:



được liên hợp với kháng thể kháng TROP2 bởi liên kết thioete mà được tạo thành ở nhóm liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng TROP2 thông qua liên kết có công thức cấu tạo:



trong đó kháng thể kháng TROP2 được nối với đầu tận cùng của L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$, trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối,

trong đó:

n^1 là số nguyên từ 0 đến 6,

n^2 là số nguyên từ 0 đến 5,

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

trong đó n^3 là số nguyên từ 2 đến 8,

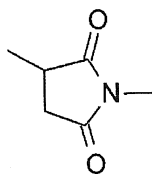
L^2 là $-NH-(CH_2CH_2-O)_{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó n^4 là số nguyên từ 1 đến 6,

L^P là gốc tetrapeptit của $-GGFG-$,

L^a là $-O-$ hoặc liên kết đơn, và

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-$ có công thức cấu tạo:



nhóm này được nối với kháng thể kháng TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa CDRH1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23, CDRH2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và CDRH3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của nó và CDRL1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, CDRL2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và CDRL3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó.

2. Thề liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm 1, trong đó nhóm cấu trúc liên kết - thuốc có thuốc được nối với $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ là một cấu trúc liên kết - thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),$

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

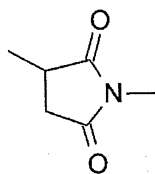
-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
và

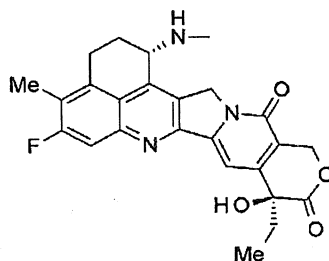
-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX);

trong đó -(suxinimit-3-yl-N)- có công thức cấu tạo:



nhóm này được nối với kháng thể kháng TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

-(NH-DX) là nhóm có công thức:



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, và

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

3. Thử liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm 2, trong đó nhóm cấu trúc liên kết - thuốc là một cấu trúc liên kết - thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), và

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

4. Thử liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm 3, trong đó nhóm cấu trúc liên kết - thuốc là:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

5. Thử liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm 3, trong đó nhóm cấu trúc liên kết - thuốc là:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

6. Thử liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm 3, trong đó nhóm cấu trúc liên kết - thuốc là:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

7. Thử liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm;

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18,

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18,

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20, và

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22.

8. Thẻ liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm;

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18,

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18,

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20, và

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

9. Thẻ liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18.

10. Thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin ở các vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18.
11. Thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể kháng TROP2 thiếu gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng.
12. Thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm 10, trong đó kháng thể kháng TROP2 thiếu gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng.
13. Thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó lượng trung bình của các đơn vị cấu trúc liên kết - thuốc được chọn được liên hợp với mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.
14. Thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó lượng trung bình của các đơn vị cấu trúc liên kết - thuốc được chọn được liên hợp với mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.
15. Thuốc chứa thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, muối của nó, hoặc hydrat của nó.
16. Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư chứa thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, muối của nó, hoặc hydrat của nó.
17. Dược phẩm chứa thở liên hợp thuốc - kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, muối của nó, hoặc hydrat của nó làm thành phần hoạt tính, và thành phần bào chế được dụng.

FIG.1

SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể cTINA1

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccag
 ttggtgcagctctggacctgagctgaagaagcctggagagacagtcaggatctcctgcaaggcttct
 gggatataccttcacaactgctggaatgcagtgggtgcaaaagatgccaggaaaggggttgaagtgg
 attggctggataaacacccactctggagtgccaaaatatgcagaagacttcaagggacggtttgcc
 ttctcttttggaacctctgccagcactgcatatttacagataagcaacctcaaaaatgaggacacg
 actacgtatcttctgtgagatcggggttcggttagtagctactggtacttcgatgtctggggcgca
 gggaccgcggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcc
 tccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaacct
 gtgaccgtgagctggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcag
 tctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacc
 tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaactct
 tgtgacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagttctc
 ctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtg
 gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat
 aatgccaagacaaagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcacc
 gtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcca
 gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctg
 cccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctat
 ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccaccct
 ccgctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtgg
 cagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaag
 agcctctccctgtctcccgcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

SEQ ID NO: 8: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể cTINA 1

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQIQLVQSGPELKKPGETVRISCKASGYTFETAGMQWVQKMPGKGLKWIGWINT
 HSGVPKYAEDFKGRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTTTYFCARSGFGSSYWFYFDVWGAGTAVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTHCTCPPELGGPSVFLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.2

SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatt
 gtgatgacccagtctcacaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagcatcacctgcaag
 gccagtcaggatgtgagtactgctgtagcctggatcaacagaaaccaggacaatctcctaaactg
 ctgatttactcggcatcctaccgctacactggagtccttgatcgcttcactggcagtggtatctggg
 acggctttcactttcaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctggcagtttattactgtcagcaa
 cattatattactccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgggctgtggccgcc
 ccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtgggtgtgc
 ctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtc
 gggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacc
 ctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggc
 ctgagctcccccgctcaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS
 YRYTGVPDRFTGSGSGTAFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYITPLTFGAGTKLELKRAVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)

FIG.3

SEQ ID NO: 11: Trình tự nucleotit của hTINA1-H1

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggtg
 cagtctggcgccgaagtgaagaaaccaggcgccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggctacaccttt
 accaccgcccgcagtgagtggtgcccaggctcctggacagggcctggaatggatgggtggatcaacacc
 cacagcggcgtgcccacatacgcgaggacttcaagggcagagtgaccatcagcgcgcgacaccagcacctcc
 acagcctacctgcagctgagcagcctgaagtccgaggacaccgcccgtgtactactgcccagaagcggcttc
 ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcaccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag
 ggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagcccctgggtgctgctg
 gtcaaggactacttccccgaaccctgacgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacc
 ttccccgtgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttg
 ggcaccagacctaatactgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc
 aaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtcctc
 ctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggtggac
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
 aagccccgggaggagcagtaaacagcacgtacccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg
 ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggc
 cagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag
 ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac
 aaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccgga

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

SEQ ID NO: 12: Trình tự axit amin của hTINA1-H1

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINT
 HSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.4

SEQ ID NO: 13: Trình tự nucleotit của hTINA1-H2

atgaaacacctgtggttcttctctctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggtg
 cagtctggcgccgaagtgaagaaaccaggcgccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggctacaccttt
 accaccgcccgcagtgagtggtgcccaggtcctggacagggcctggaatggatgggctggatcaacacc
 cacagcggcgtgccc aaatacgcgcagggaacttcaagggcagagtgaccatcagcctggacaccagcacctcc
 accgcctacctgcagctgagcagcctgaagtcgaggacaccgcccgtgtactactgcccagaagcggcttc
 ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcacctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag
 ggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctg
 gtcaaggactacttccccgaaccgcgtgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
 tccccgcgtgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttg
 ggcacccagacctaactctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc
 aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagttctc
 ctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggac
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
 aagccccgggaggagcagtagaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg
 ctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggc
 cagcccgagaacaactacaagaccacccctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag
 ctaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac
 aaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccgcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

SEQ ID NO: 14: Trình tự axit amin của hTINA1-H2

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTAGMQWVRQAPQGLEWMGWINT
 HSGVPKYAEDFKGRVTISLDTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQOGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.5

SEQ ID NO: 15: Trình tự nucleotit của hTINA1-H3

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccagctggtg
 cagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcgagagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggctacaccttt
 accaccgcccgcagtgagtggtgcagcagatgcctggcaagggcctggaatggatgggctggatcaacacc
 cacagcggcggtgccccaaatacgccgaggacttcaagggcagagtgaccttcagcctggacaccagcacctcc
 accgcctacctgcagctgagcagcctgaagtccgaggacacccgcgtgtactactgcgccagaagcggcttc
 ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcacccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag
 ggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgcctgggctgctg
 gtcaaggactacttccccgaaccctgacccgtgagctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacc
 tccccgcgtgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttg
 ggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc
 aaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggaccctcagtcttc
 ctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggtggac
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccagaca
 aagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcacgcctcctgcaccaggactgg
 ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtotccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatccccgggaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatggc
 cagccccgagaacaactacaagaccaccctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag
 ctccacgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac
 aaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccgga

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

SEQ ID NO: 16: Trình tự axit amin của hTINA1-H3

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQIQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFTTAGMQWVQQMPGKGLEWMGWINT
 HSGVPKYAEDFKGRVTFSLDTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFVDVWQGTLLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.6

SEQ ID NO: 17: Trình tự nucleotit của hTINA1-L1

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgctacggcgacatccagatg
 acccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggccagccaggac
 gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcctggcaaggcccccaagctgctgatctacagcgccagc
 taccggtacaccggcggtgcccagcagattttctggcagcggtccggcaccgacttcaccctgacaatcagc
 agcctgcagcccagaggacttcgccgtgtactactgccagcagcactacatcacccccctgacctttggccag
 ggcaccaagctggaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcattctccccccctccgaagagcag
 ctgaagtcgggcaccgcctccgtggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg
 aaggtggacaacgccctgcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtg
 acccaccagggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

SEQ ID NO: 18: Trình tự axit amin của hTINA1-L1

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
 YRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)

FIG.7

SEQ ID NO: 19: Trình tự nucleotit của hTINA1-L2

atgggtgctgcagacccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcgtaacggcgacatcgtgatg
 acccagagccctagcagcctgagcgcgcagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggccagccaggac
 gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcctggcaaggccccaagctgctgatctacagcgccagc
 taccggtacaccggcgtgcccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagc
 agcctgcagcccagaggacttcgccgtgtactactgccagcagcaactacatcacccccctgacctttggccag
 ggcaccaagctggaaatcaagcgtaacggtggccgccccctcogtgttcattctccccccctccgacgagcag
 ctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg
 aaggtggacaacgccctgcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtg
 acccaccagggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtggt

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

SEQ ID NO: 20: Trình tự axit amin của hTINA1-L2

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
 YRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)

FIG.8

SEQ ID NO: 21: Trình tự nucleotit của hTINA1-L3

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcgtagcggcgacatcgtgatg
 acccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgaacatcacatgcaaggccagccaggac
 gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcccggaagcagcccaagctgctgatctacagcgccagc
 taccggtacaccggcggtgccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagc
 agcctgcagcccagaggacttcgccgtgtactactgccagcagcaactacatcacccccctgaccttggccag
 ggcaccaagctggaaatcaagcgtacggtggcgccccctccgtgttcattctccccccctccgacgagcag
 ctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg
 aaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtg
 acccaccagggcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

SEQ ID NO: 22: Trình tự axit amin của hTINA1-L3

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKQPKLLIYSAS
 YRYTGVPSSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)

FIG.9

SEQ ID NO: 23: Trình tự axit amin của CDRH1 kháng thể TINA1

TAGMQ

SEQ ID NO: 24: Trình tự axit amin của CDRH2 kháng thể TINA1

WINTHSGVPKYAEDFKG

SEQ ID NO: 25: Trình tự axit amin của CDRH3 kháng thể TINA1

SGFGSSYWYFDV

SEQ ID NO: 26: Trình tự axit amin của CDRL1 kháng thể TINA1

KASQDVSTAVA

SEQ ID NO: 27: Trình tự axit amin của CDRL2 kháng thể TINA1

SASYRYT

SEQ ID NO: 28: Trình tự axit amin của CDRL3 kháng thể TINA1

QQHYITPLT

FIG.10

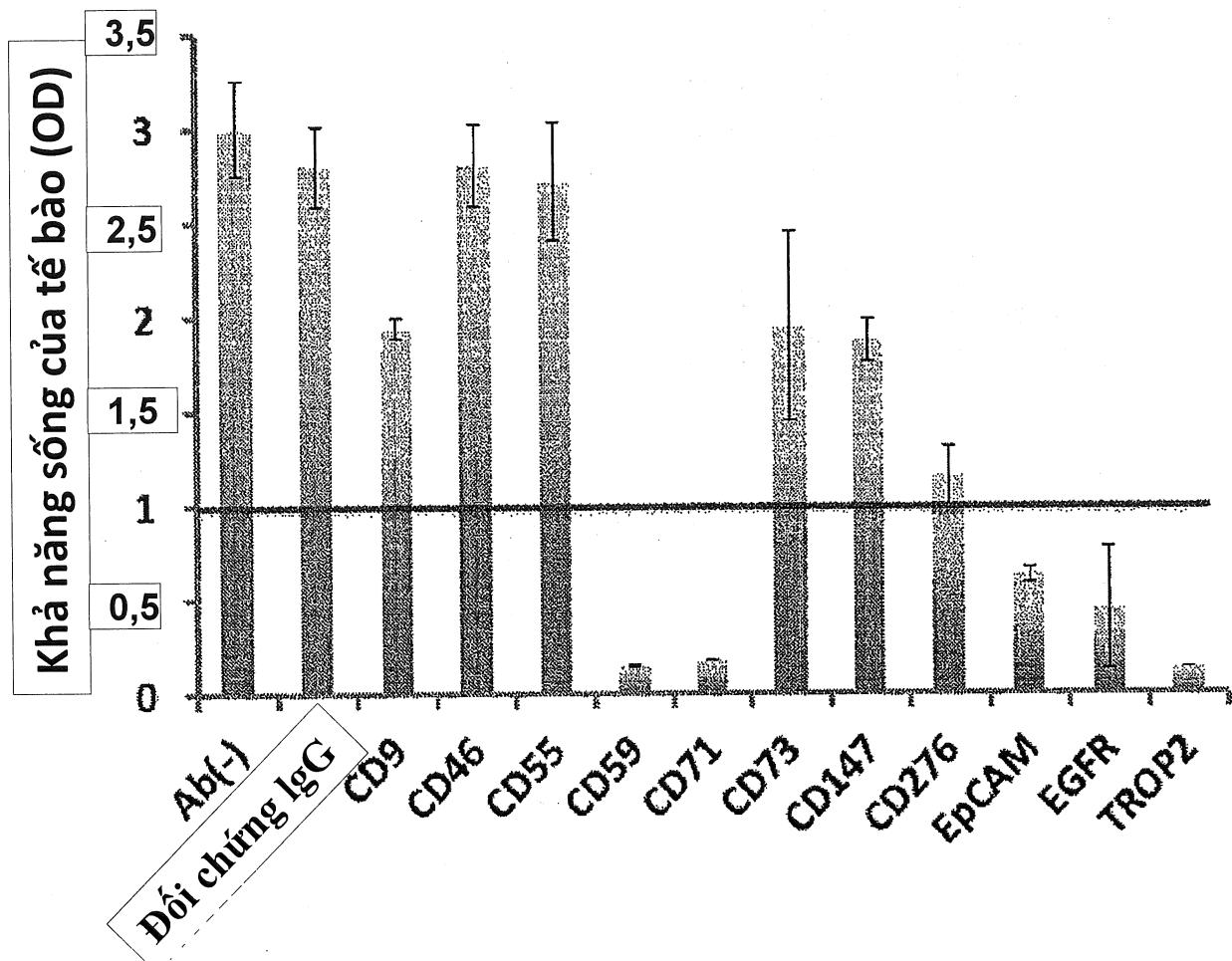


FIG.11

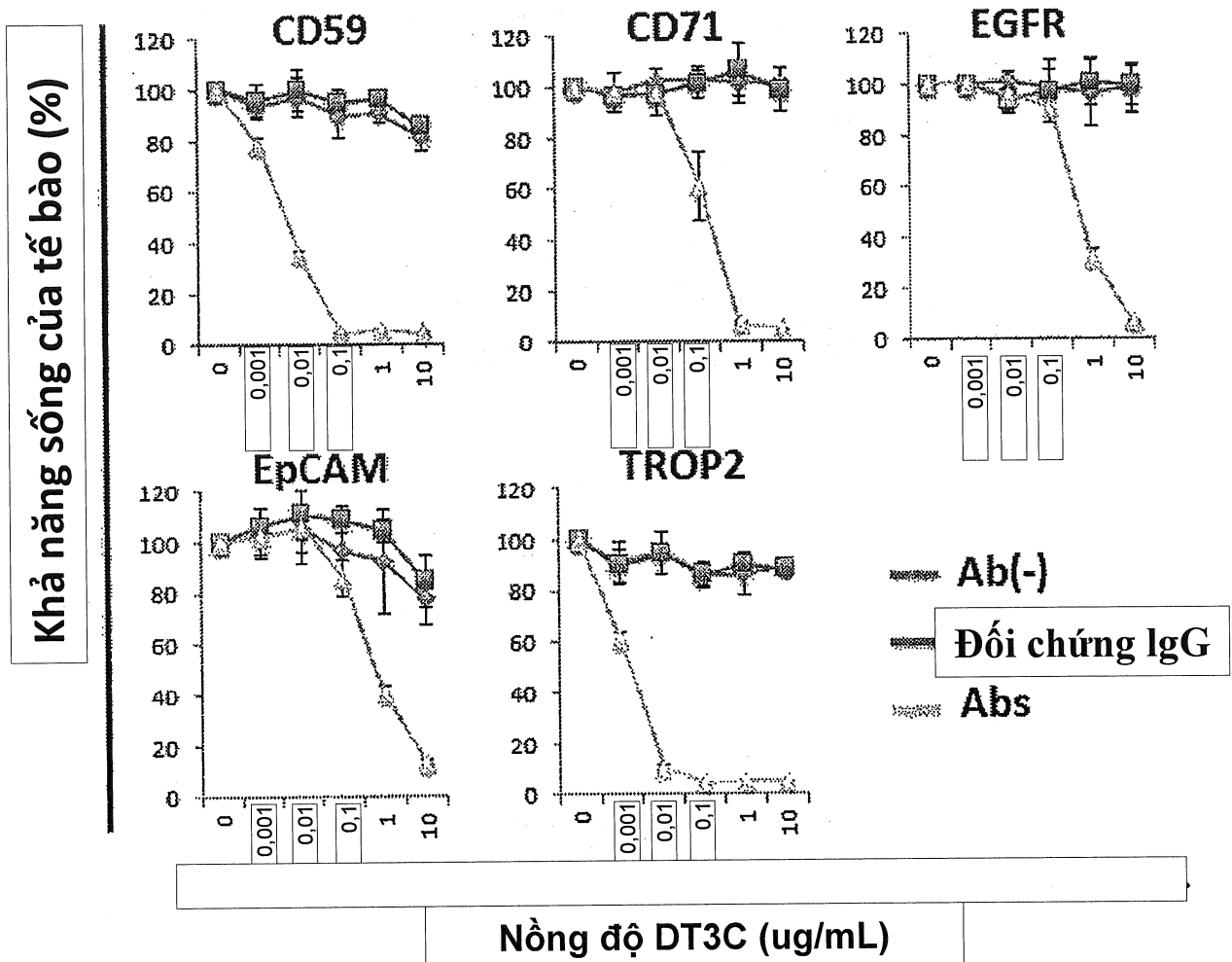


FIG. 12

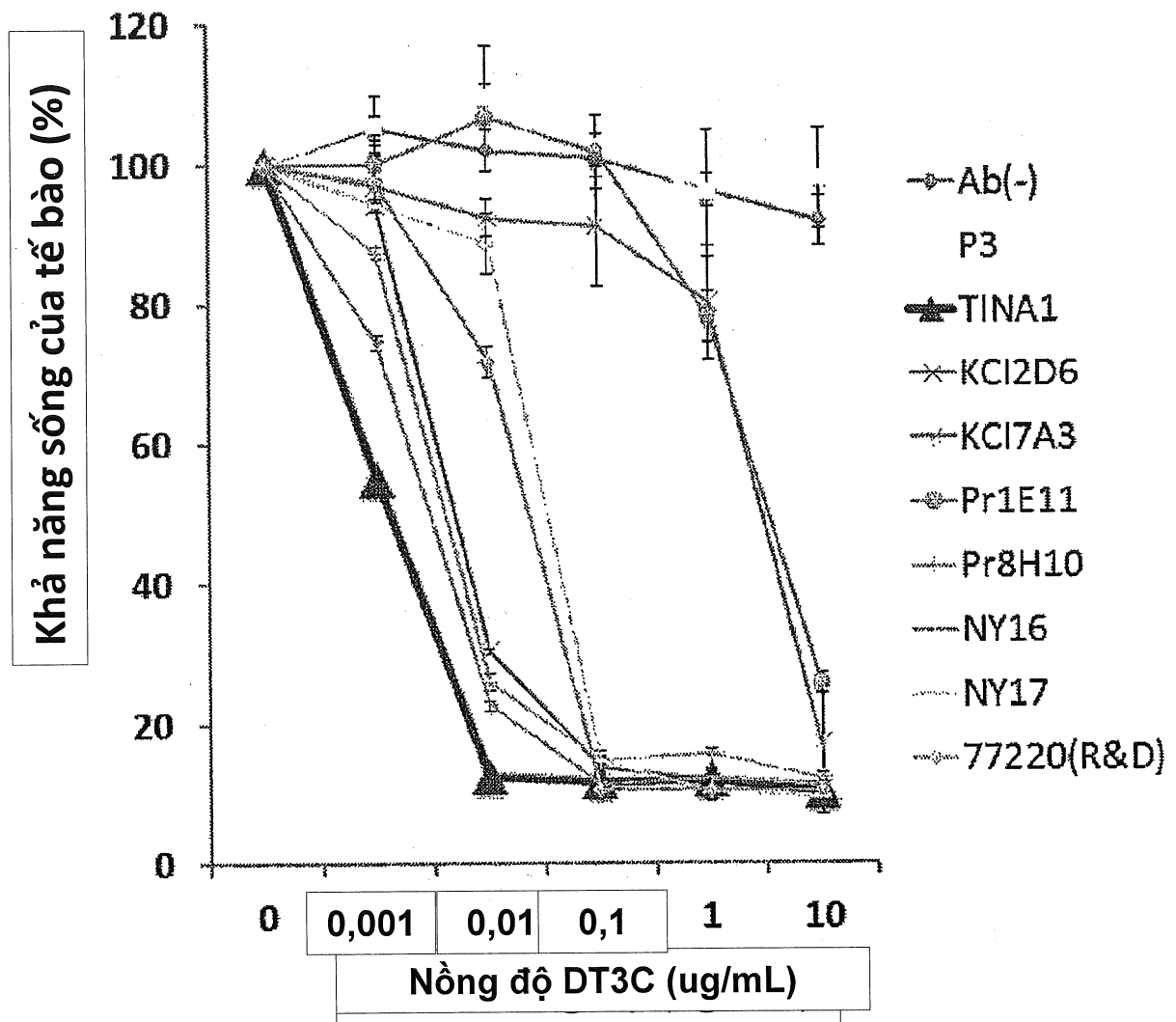


FIG. 13

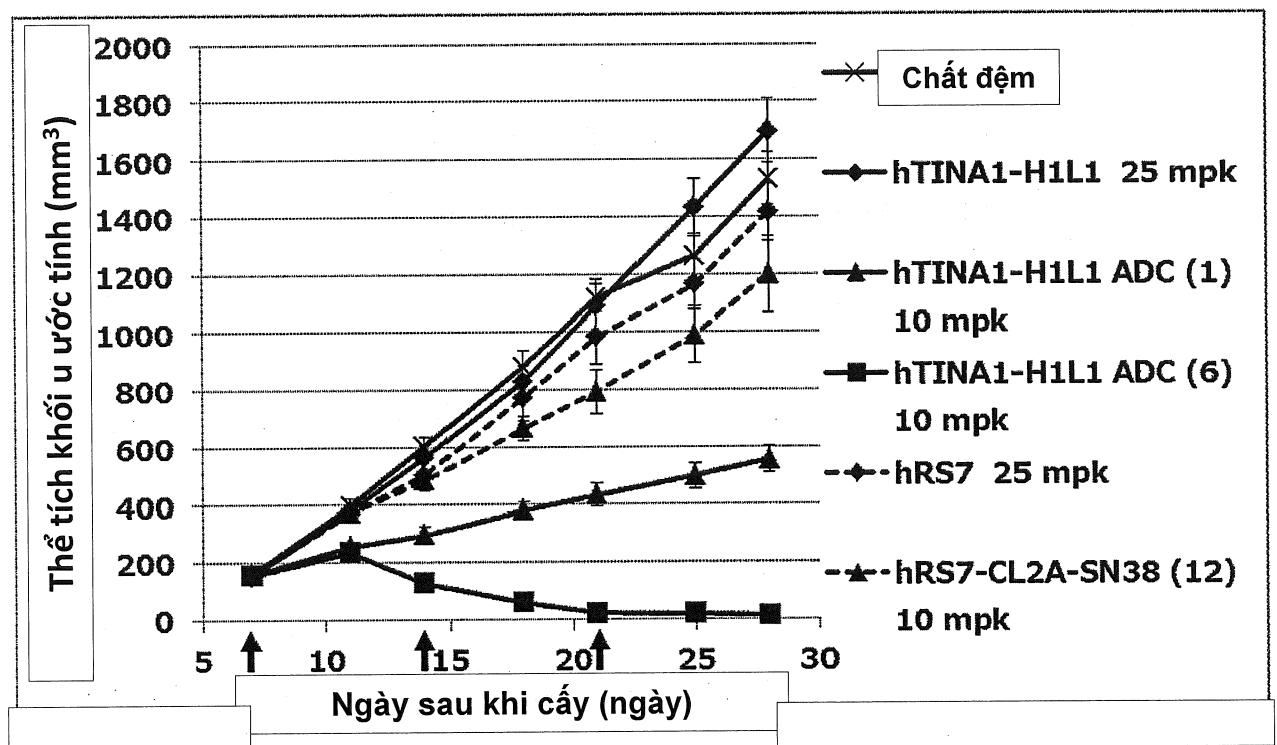


FIG.14

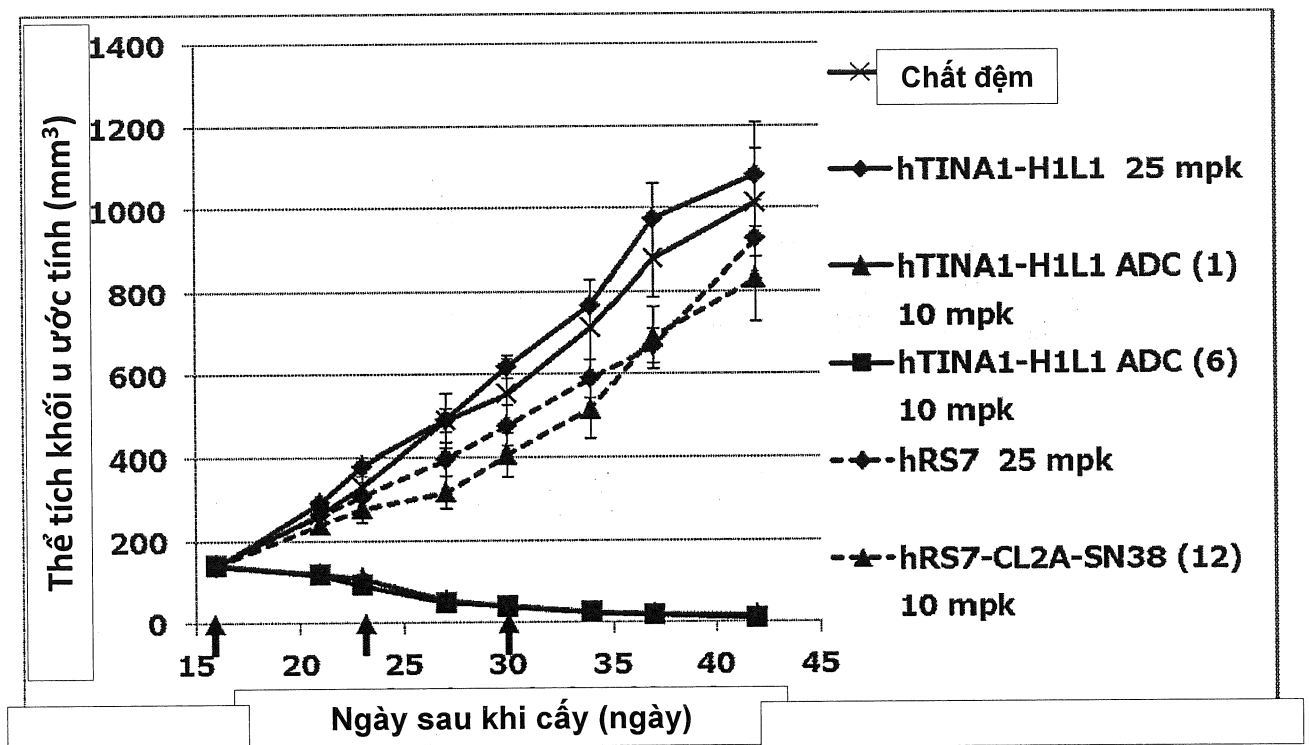


FIG.15

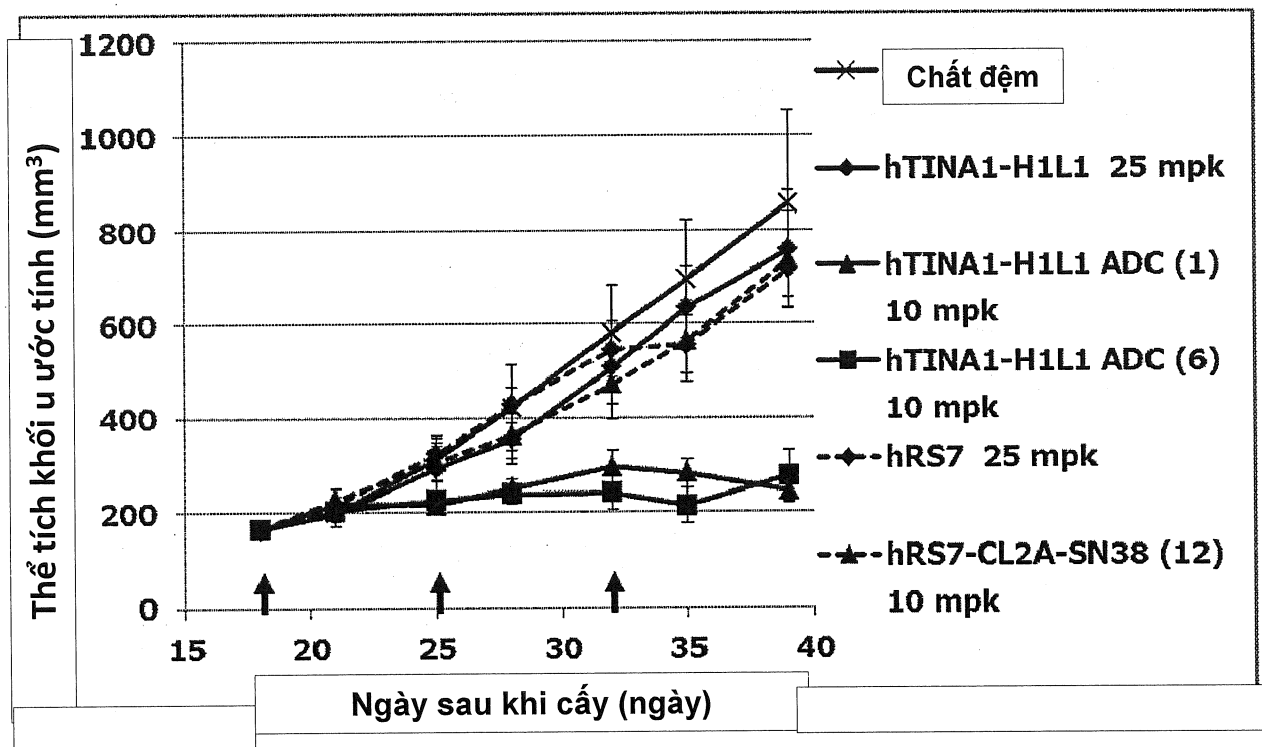


FIG.16

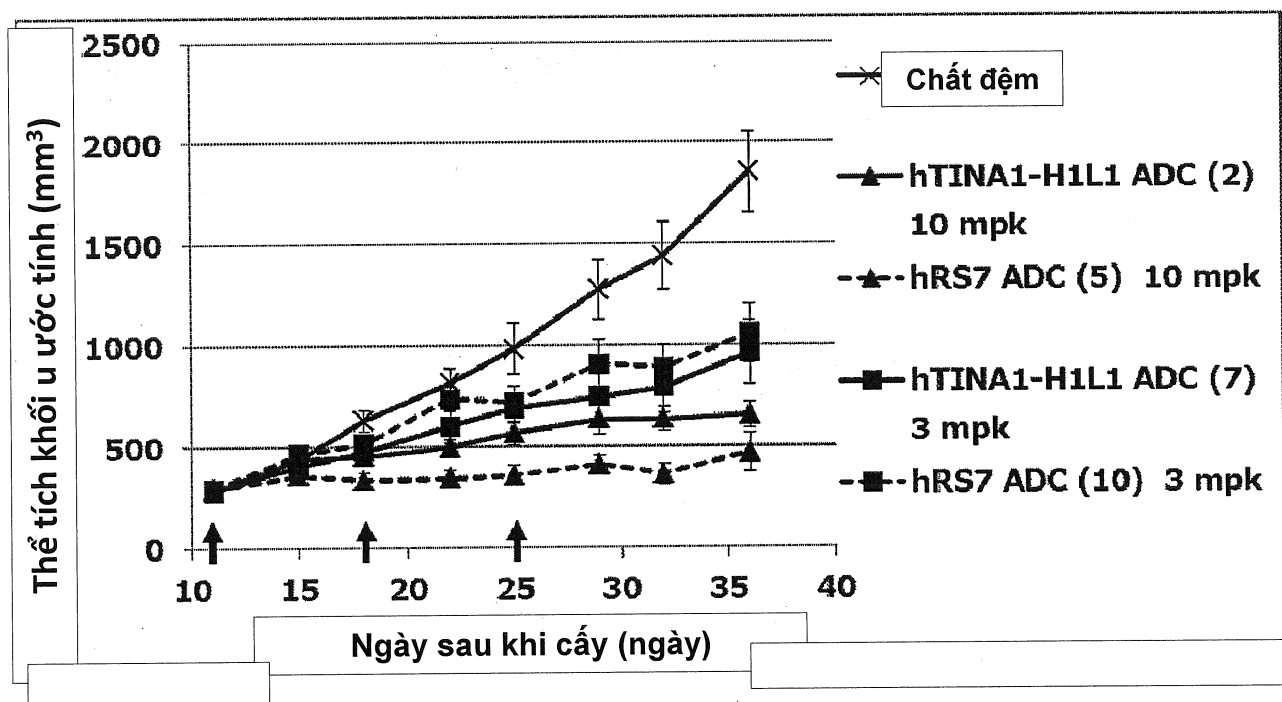


FIG.17

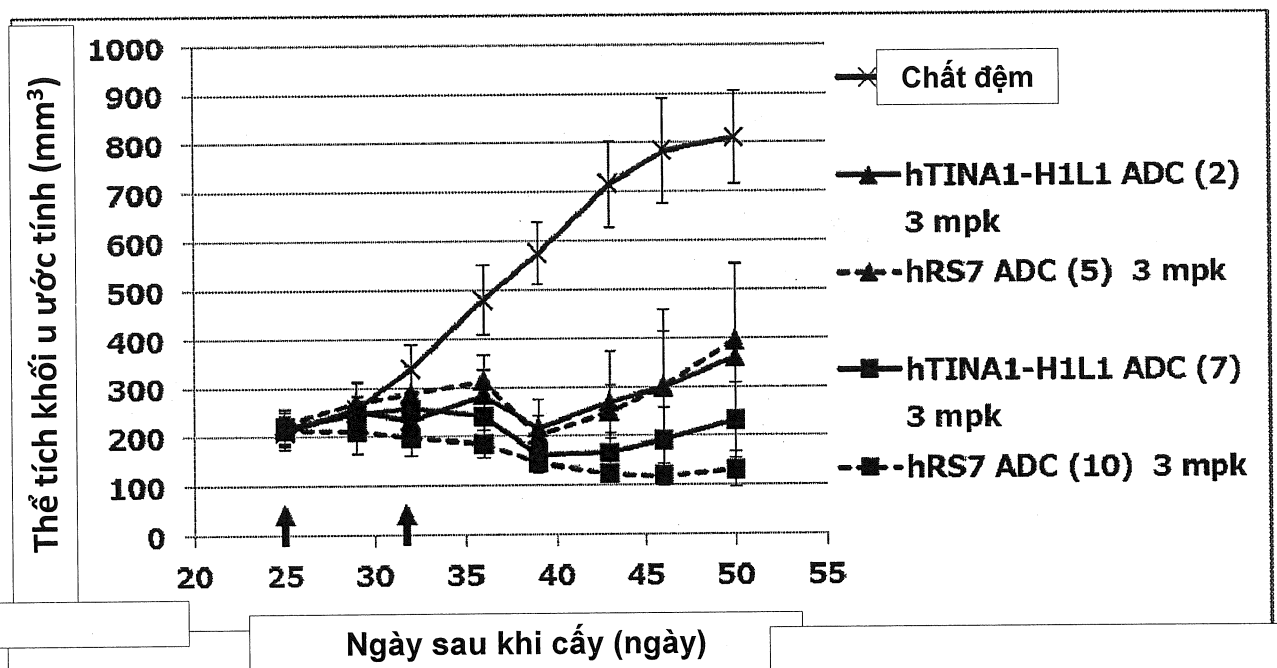


FIG.18

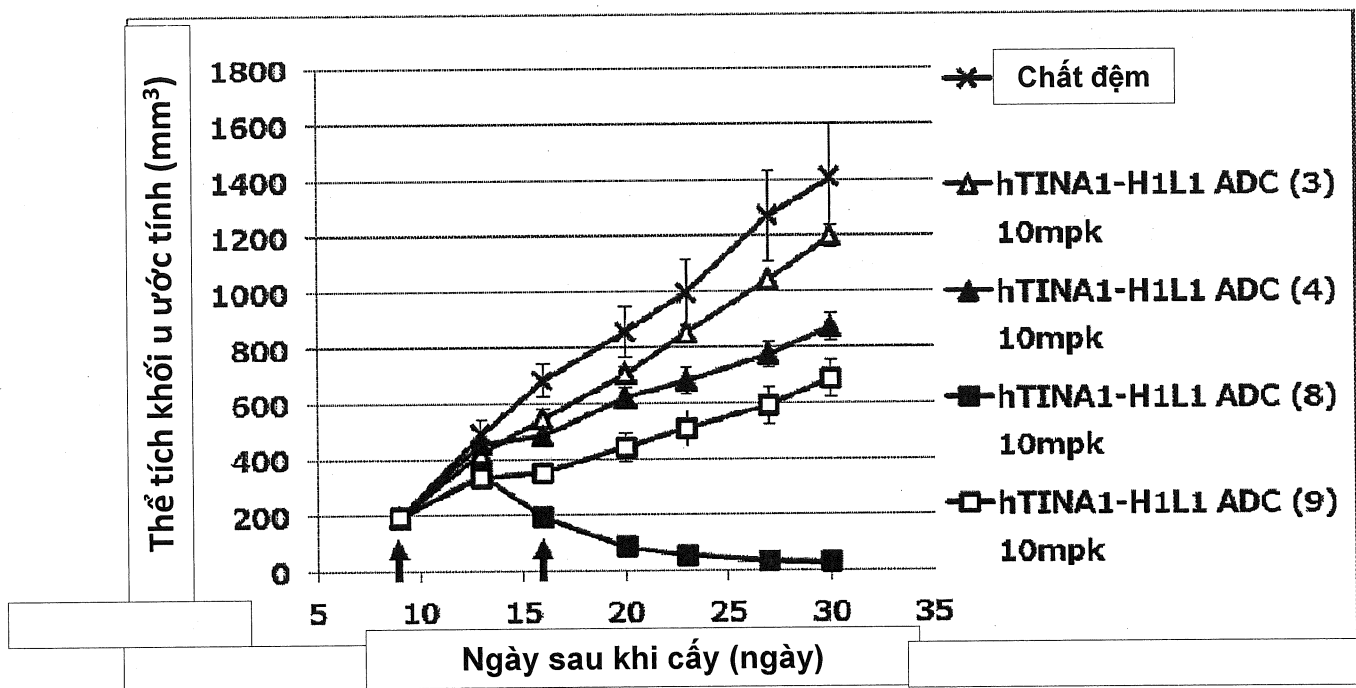


FIG.19

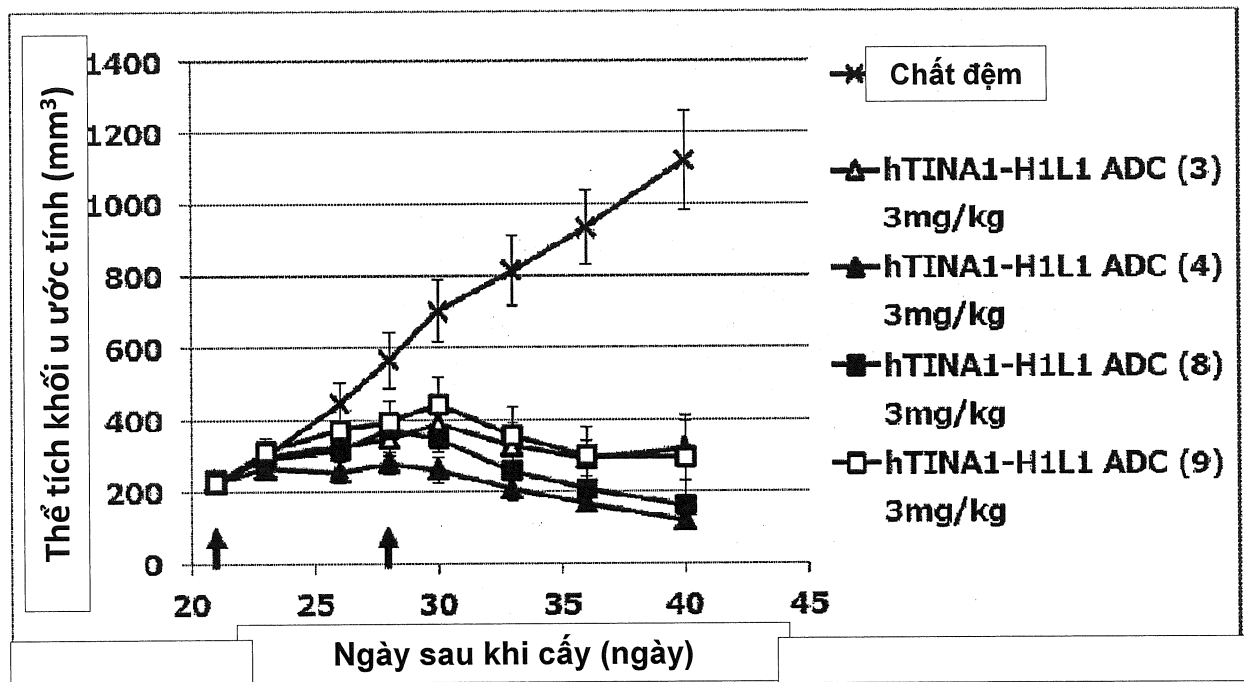


FIG.20

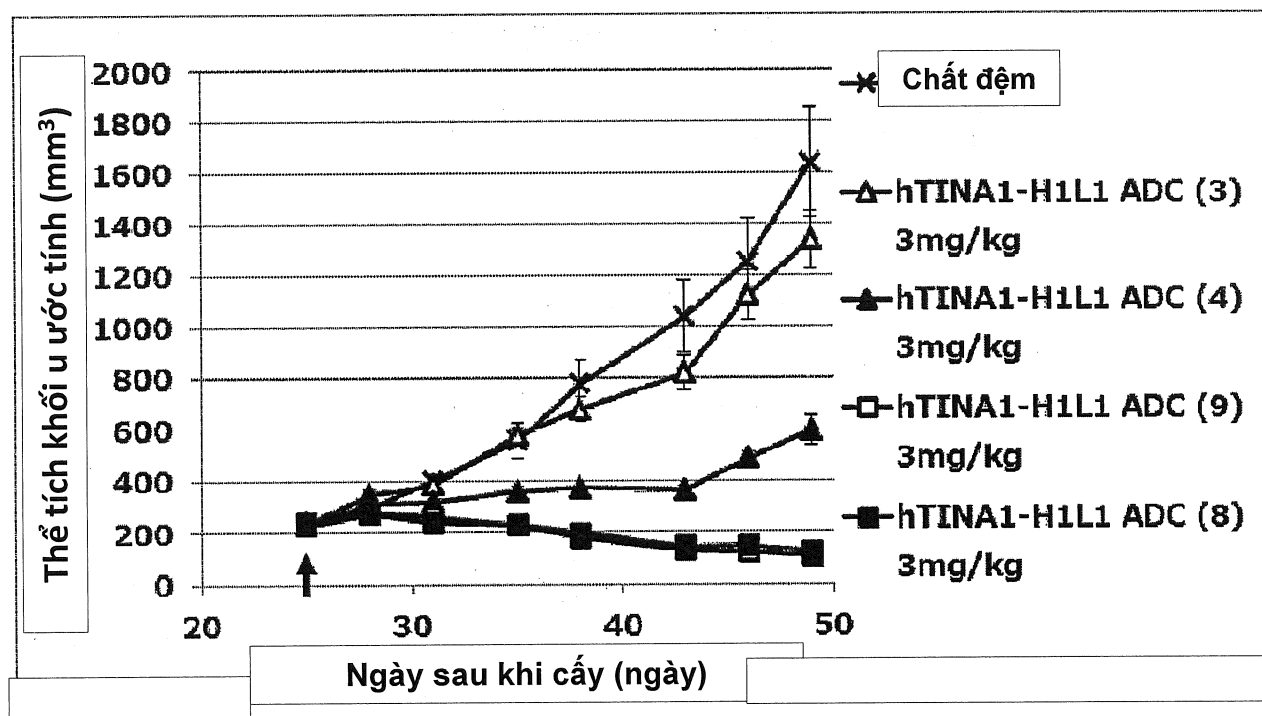


FIG.21

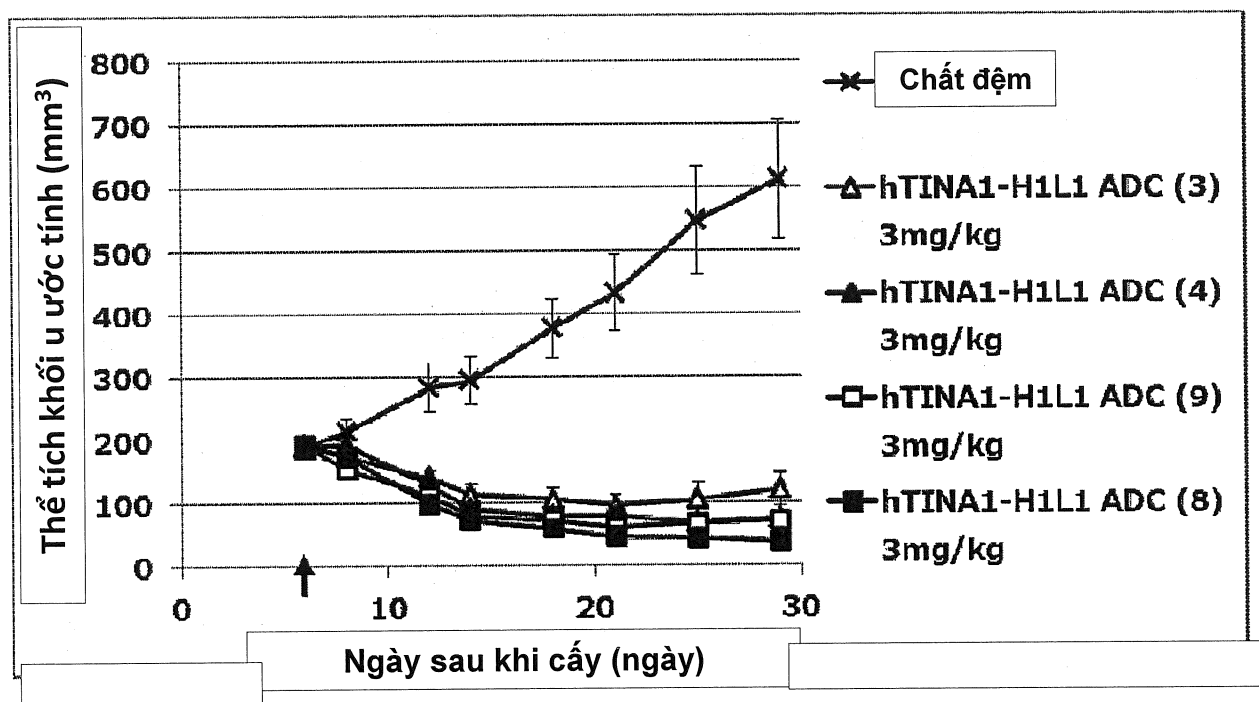


FIG.22

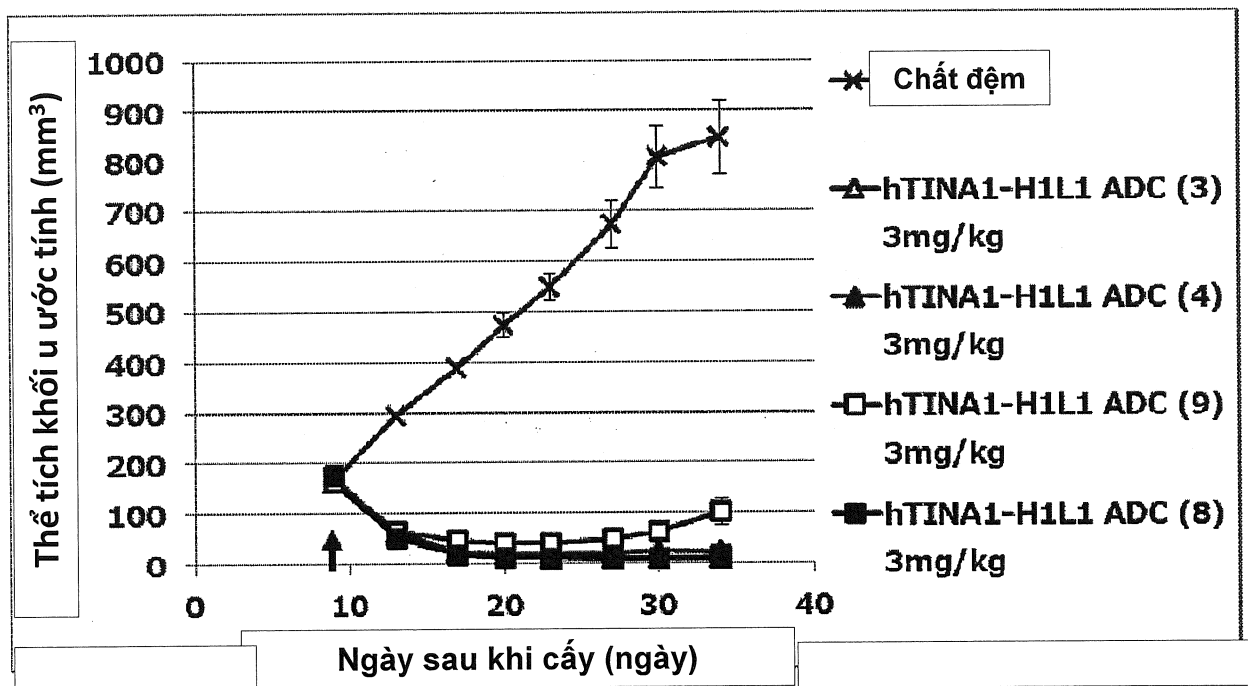


FIG.23

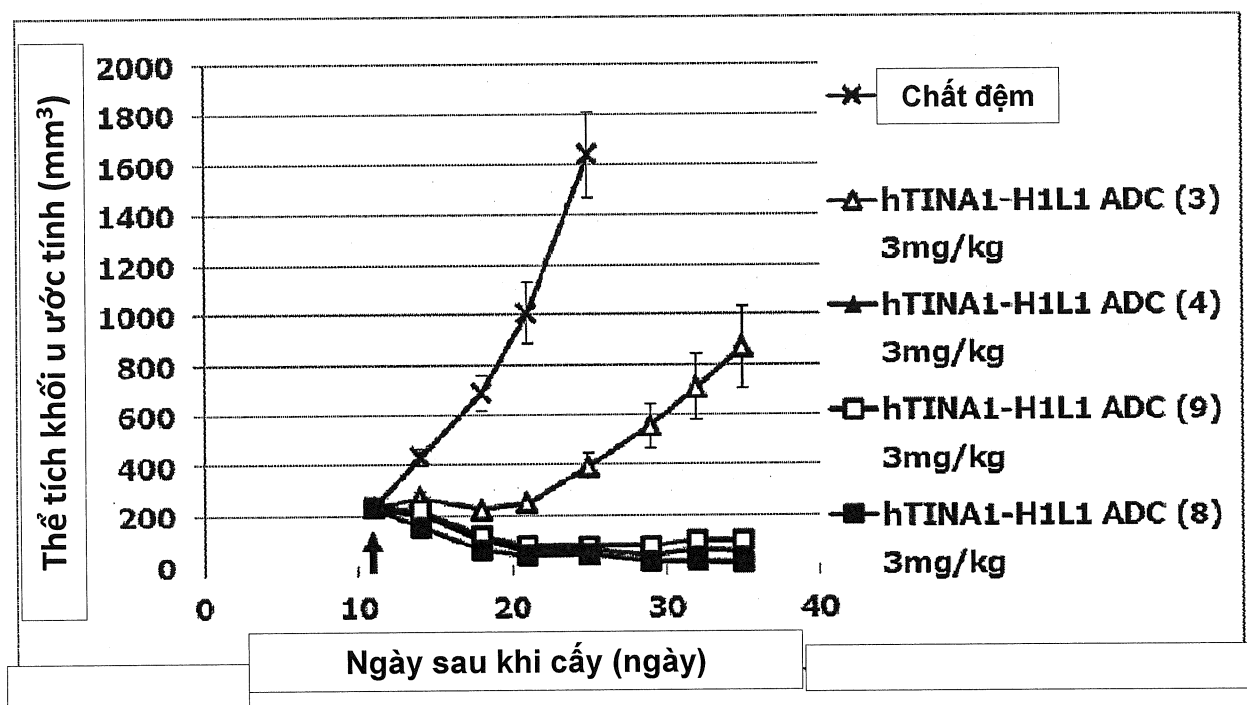


FIG.24

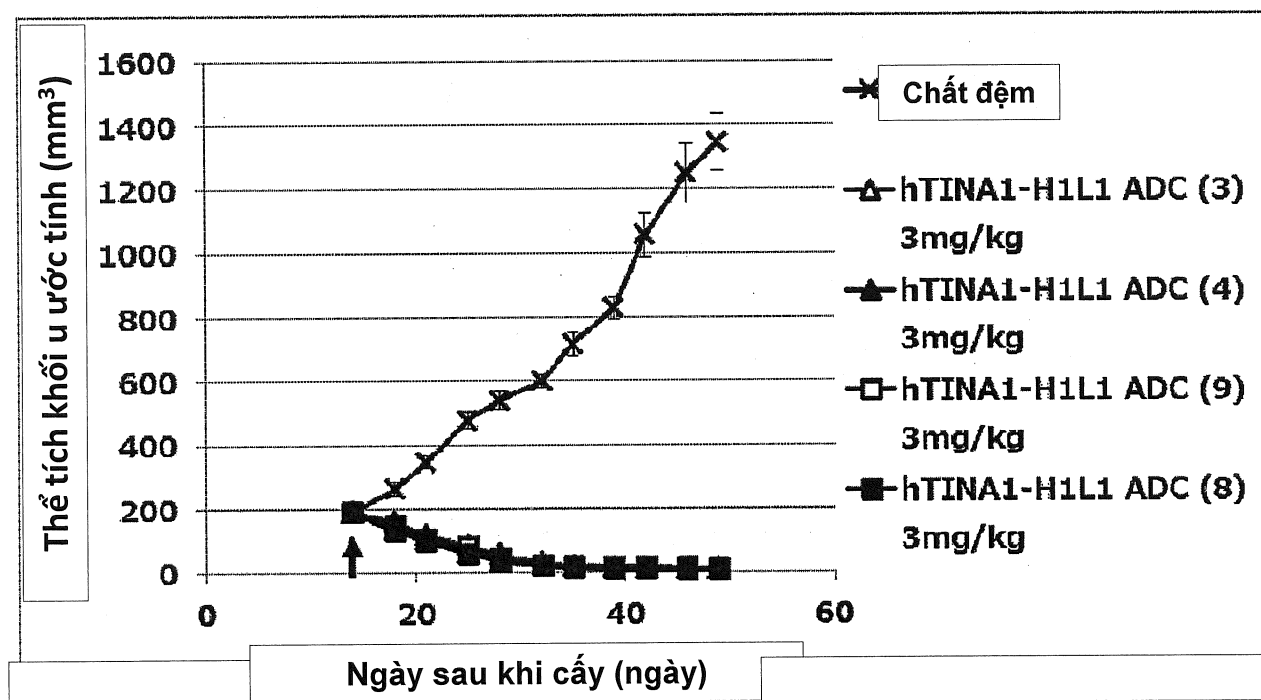


FIG.25

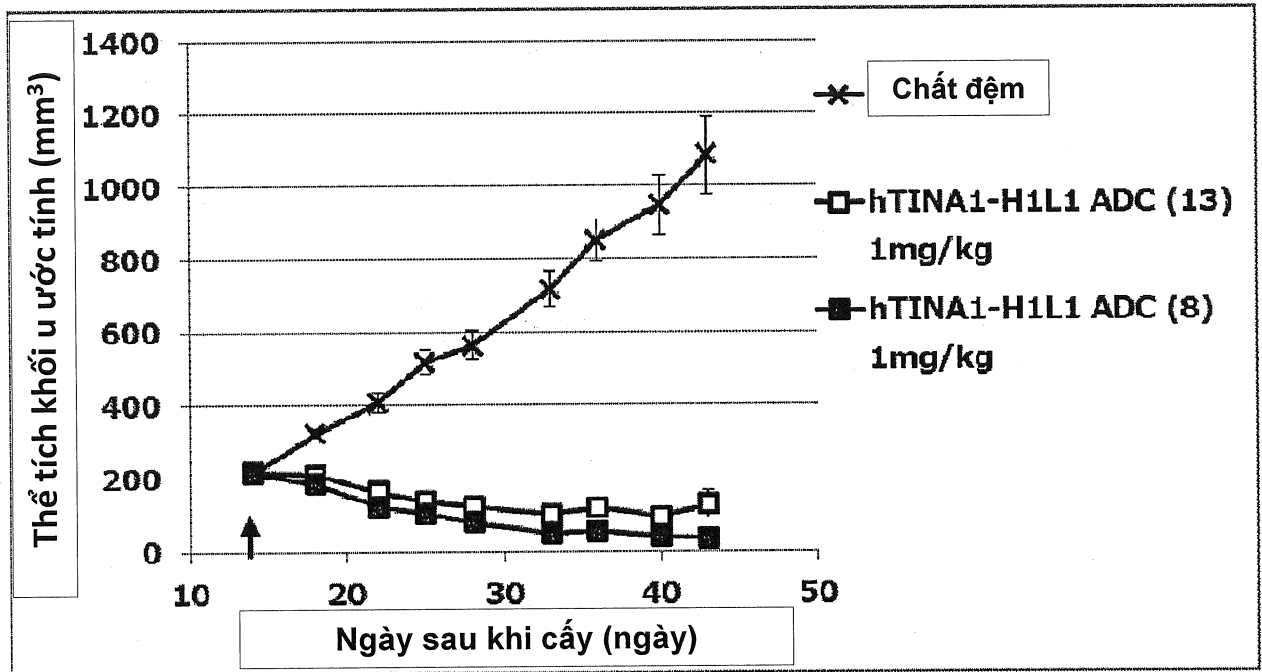


FIG.26

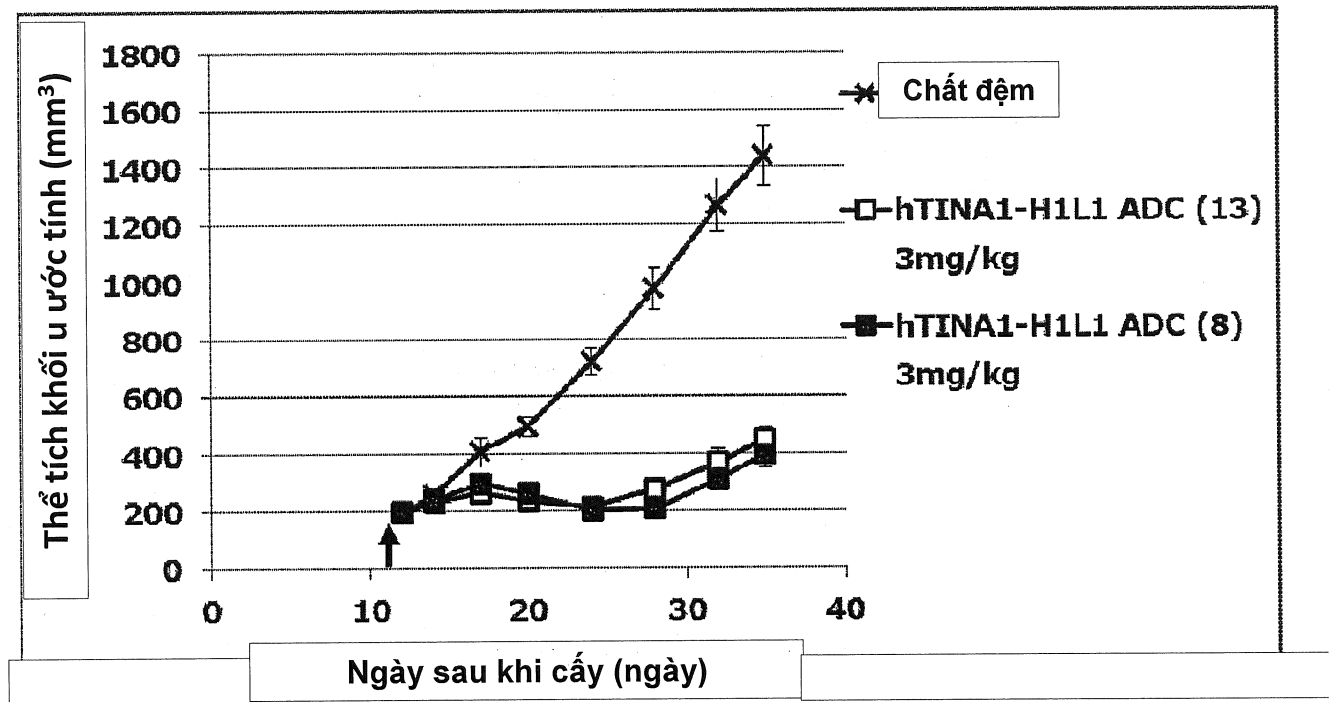
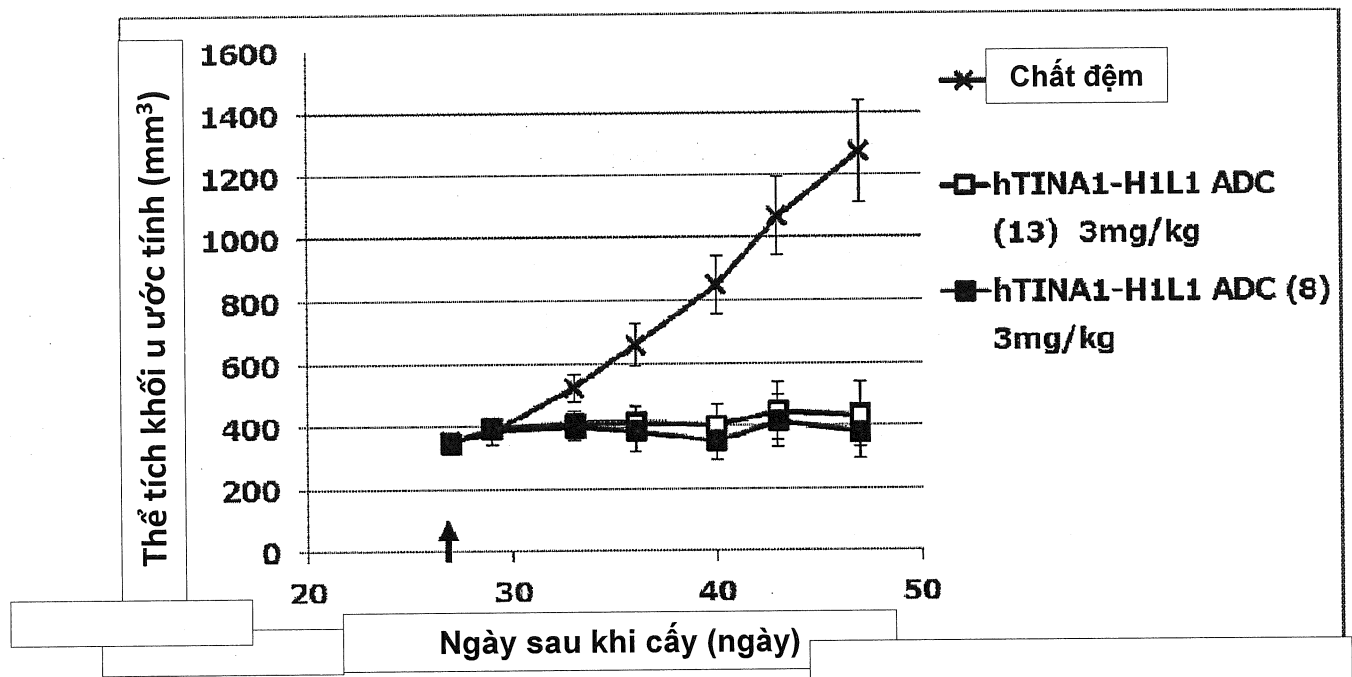


FIG. 27



Ó

6

12

18

24

30

36

30

Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 3
 gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg gcatcctacc gctacactgg agtcacctgat 180
 cgcttcactg gcagtggatc tgggacggct ttcaatttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gtccgggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

<210> 4
 <211> 109

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 100 105

<210> 5
 <211> 449
 <212> ADN
 <213> NGƯỜI

<400> 5
 gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagaccag gtgttcatct ccctgctgct 60
 gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc 120
 cgtgttcatc ttccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtggtgtg 180
 cctgctgaat aacttctacc ccagagaggc caaggtgcag tggaaggtgg acaacgccct 240
 gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag 300

cctgagcagc accctgaccc tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 360
 cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca ggggggagtg 420
 ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta 449

<210> 6
 <211> 1132
 <212> ADN
 <213> NGƯỜI

<400> 6
 gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttctctctgc tgggtggcagc 60
 tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc ctccaccaag 120
 ggcccaagcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc 180
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccctga ccgtgagctg gaactcaggc 240
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc 300
 ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac 360
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagccaa atcttgtgac 420
 aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tggggggacc ctcagtcttc 480
 ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 540
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 600
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg 660
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 720
 aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggc 780
 cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 840
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 900
 gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ctcccgtgct ggactccgac 960
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac 1020
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacca gaagagcctc 1080

tccctgtctc ccggcaaatg agatatcggg cccgtttaaa cgggggaggc ta 1132

<210> 7

<211> 1410

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của kháng thể TINA1 khảm người-chuột

<400> 7

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag	60
atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caggatctcc	120
tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaact gctggaatgc agtgggtgca aaagatgcca	180
ggaaaggggt tgaagtggat tggctggata aacacccact ctggagtgcc aaaatatgca	240
gaagacttca agggacgggt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcataattta	300
cagataagca acctcaaaaa tgaggacacg actacgtatt tctgtgcgag atcgggggttc	360
ggtagtagct actggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccgcggtcac cgtcagctca	420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc	480
ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc	540
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga	780
ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1080

aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 1140
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 8

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể TINA1 khảm người-chuột

<400> 8

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

290

295

300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 9

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 khảm người-chuột

<400> 9

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      120
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca      180
ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg gcatactacc gctacactgg agtccctgat      240
cgcttcactg gcagtggatc tgggacggct ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct      300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gttcgggtgct      360
gggaccaagc tggagctgaa acgggctgtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcacccgc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcaatccgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt                          702

```

<210> 10

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 khảm người-chuột

<400> 10

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1           5           10           15

```

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210

215

220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 11
 <211> 1410
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích với người,
 typ H1

<400> 11
 atgaaacacc tgttggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct 180
 ggacagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccacaca gcggcgtgcc caaatacgcc 240
 gaggacttca agggcagagt gaccatcagc gccgacacca gcacctccac agcctacctg 300
 cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360
 ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720
 aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga 780
 ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960

```

agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactgggt gaatggcaag      1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag      1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg      1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc      1380
cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa      1410

```

<210> 12

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích
với người,
typ H

<400> 12

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

```

```

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20           25           30

```

```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35           40           45

```

```

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50           55           60

```

```

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
65           70           75           80

```

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 13
 <211> 1410
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích với người,
 typ H2

<400> 13
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcca gcggtacac cttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct 180
 ggacagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccacaca gcggcgtgcc caaatacgcc 240
 gaggacttca agggcagagt gaccatcagc ctggacacca gcacctccac cgcctacctg 300
 cagctgagca gctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360
 ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga 780
 ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

```

aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag      1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg      1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc      1380
cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa      1410

```

<210> 14

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích
với người,
typ H2

<400> 14

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1              5              10              15

```

```

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                20              25              30

```

```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35              40              45

```

```

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
          50              55              60

```

```

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
65              70              75              80

```

```

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser
          85              90              95

```

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 15

<211> 1410

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích với người,
typ H3

<400> 15

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag	60
atccagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcgagagcgt gaaggtgtcc	120
tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgca gcagatgcct	180
ggcaagggcc tggaatggat gggctggatc aacacccaca gcggcgtgcc caaatagcc	240
gaggacttca agggcagagt gaccttcagc ctggacacca gcacctccac cgctacctg	300
cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc	360
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca	420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc	480
ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc	540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	720
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccctgccag cacctgaact cctgggggga	780
ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct	840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag	1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1200

gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 16

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích
 với người,
 typ H3

<400> 16

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 17
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,
typ L1

<400> 17

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagcct      180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc      240
agattttctg gcageggctc cggcaccgac ttcacctga caatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag      360
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcaagtccgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt                          702

```

<210> 18

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,
typ L1

<400> 18

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1           5           10          15

```

```

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20          25          30

```

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 19
<211> 702
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,
typ L2

<400> 19
atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60
gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagcct 180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc 240
agattttctg gcagcggtc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca ccccttgac ctttggccag 360
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc 420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggagt gt 702

<210> 20
<211> 234
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,

typ L2

<400> 20

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180

185

190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 21
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người,
 typ L3

<400> 21
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60
 gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120
 atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggtatca gcagaagccc 180
 ggcaagcagc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc 240
 agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga caatcagcag cctgcagccc 300
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag 360
 ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc 420
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480
 cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600
 ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660
 ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggaggt gt 702

<210> 22
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người,
 typ L3

<400> 22

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23

Thr Ala Gly Met Gln
 1 5

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25

Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 29
 <211> 1410
 <212> ADN

<213> Người

<400> 29

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag	60
gtgcagctgc agcagagcgg cagcgagctg aagaagcctg gcgccagcgt caaggtgtcc	120
tgcaaggcca gcggctacac cttcaccaac tacggcatga actgggtgaa gcaggcccca	180
ggccagggcc tgaagtggat gggctggatc aacacctaca ccggcgagcc cacctacacc	240
gacgacttca agggccggtt cgccttcagc ctggacacca gcgtgagcac cgcctacctg	300
cagatcagca gcctgaaggc cgacgatacc gccgtgtact tctgcgccag agggcgcttc	360
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca gcctggtgac cgtgagctca	420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc	480
ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc	540
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	720
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga	780
ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag	1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg	1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc	1380

cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa

1410

<210> 30
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 30

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 31

<211> 702

<212> ADN

<213> Người

<400> 31

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc	60
gatatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgtcc	120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc attgccgtgg cctggatatca gcagaagccc	180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc	240
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc	300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca ccccctgac cttcggagcc	360

```

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc 420
tccgacgagc agctgaagtc cggcacccgc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggaggt gt 702

```

<210> 32
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 32

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          20           25           30

```

```

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          35           40           45

```

```

Val Ser Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          50           55           60

```

```

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65           70           75           80

```

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          85           90           95

```

```

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
          100           105           110

```

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 33

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mỗi mG2aVR2

<400> 33

agagttccag gtcaaggtca ctggctcagg

30

<210> 34

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mỗi mKVR2

<400> 34

agtccaactg ttcaggacgc cattttgtcg

30

<210> 35

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mỗi 3.3-F1

<400> 35

tataaccgtcg acctctagct agagcttggc

30

<210> 36

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mỗi 3.3-R1

<400> 36

gctatggcag ggctgcccgc cccgacgttg

30

<210> 37

<211> 47

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mỗi TINA1H-F

<400> 37

ccagatgggt gctgagccag atccagttgg tgcagtctgg acctgag

47

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi TINA1H-R

<400> 38

cttggtggag gctgagctga cggtagaccgc ggtccctgcg cccagac

48

<210> 39

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi TINA1L-F

<400> 39

atctccggcg cgtacggcga cattgtgatg acccagtctc acaaattc

48

<210> 40

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi TINA1L-R

<400> 40

ggagggggcg gccacagccc gtttcagctc cagcttggtc ccagc

45

<210> 41

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi EG-Inf-F

<400> 41

agctcccaga tgggtgctga gc

22

<210> 42

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi EG1-Inf-R

<400> 42
 gggcccttgg tggaggctga gc 22

<210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit đoạn mồi CM-LKF

<400> 43
 ctgtggatct ccggcgcgta cggc 24

<210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit đoạn mồi KCL-Inf-R

<400> 44
 ggagggggcg gccaccgtac g 21