



(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)



1-0032653

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/00; (13) B
A61K 31/48; A61P 31/4745

(21) 1-2015-01054

(22) 10/10/2013

(86) PCT/JP2013/006069 10/10/2013

(87) WO 2014/057687 17/04/2014

(30) 2012-225887 11/10/2012 JP

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/09/2015 330A

(73) Daiichi Sankyo Company, Limited. (JP)

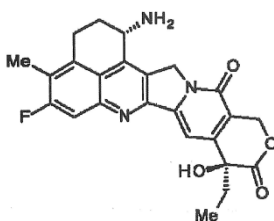
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 1038426, Japan

(72) Takeshi MASUDA (JP); Hiroyuki NAITO (JP); Takashi NAKADA (JP); Masao YOSHIDA (JP); Shinji ASHIDA (JP); Hideki MIYAZAKI (JP); Yuji KASUYA (JP); Koji MORITA (JP); Yuki ABE (JP); Yusuke OGITANI (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) THỂ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ-THUỐC CÓ TÁC DỤNG KHÁNG KHỐI U VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể liên hợp kháng thể-thuốc có thể được sử dụng làm chất kháng khối u mà có tác dụng kháng khối u hoàn hảo và độ an toàn cao, thể liên hợp nêu trên được mô tả bằng cách liên kết hợp chất kháng khối u có công thức (I) với kháng thể thông qua chất liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng công thức: $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$, trong đó kháng thể được nối với đầu tận của L^1 , và hợp chất kháng khối u được nối với đầu tận của L^c , trong đó vị trí liên kết của hợp chất kháng khối u là nguyên tử nitơ trong nhóm amino ở vị trí 1.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

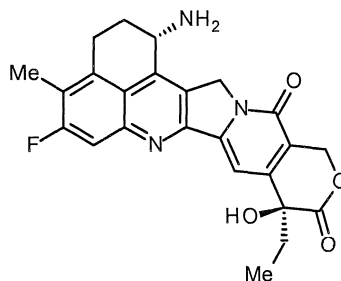
Sáng chế đề cập đến thể liên hợp kháng thể-thuốc có chứa thuốc kháng khối u được liên hợp với kháng thể có khả năng hướng đích các tế bào khối u thông qua gốc cấu trúc chất liên kết, thể liên hợp này hữu ích làm thuốc kháng khối u.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thể liên hợp kháng thể-thuốc (ADC) có chứa thuốc có tính gây độc tế bào được liên hợp với kháng thể, kháng nguyên của chúng được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư và cũng liên kết với kháng nguyên có khả năng tương tác nội bộ tế bào, và do đó có thể phân phối thuốc một cách có chọn lọc đến các tế bào ung thư và do đó được mong đợi là có thể tạo ra được sự tích tụ thuốc bên trong các tế bào ung thư và tiêu diệt các tế bào ung thư này (xem, các tài liệu phi sáng chế từ 1 tới 3). Đối với ADC, Mylotarg (Gemtuzumab ozogamixin) trong đó calicheamixin được liên hợp với kháng thể kháng CD33 được chấp nhận là tác nhân trị liệu cho bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính. Ngoài ra, Adcetris (Brentuximab vedotin), trong đó auristatin E được liên hợp với kháng thể kháng CD30, gần đây đã được chấp nhận là tác nhân trị liệu cho u lympho Hodgkin và u lympho tế bào lớn tự ghép (xem, Tài liệu phi sáng chế 4). Các thuốc có trong ADC được chấp nhận cho đến hiện tại là ADN hoặc tubulin đích.

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

Công thức 1



(exatecan, tên hóa 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)-dione) là dẫn xuất hòa tan trong nước của camptothecin (Tài liệu sáng chế 1 và 2). Không giống với irinotecan hiện được sử dụng trong các thiết lập lâm sàng, sự hoạt hóa bằng enzym là không cần thiết. Ngoài ra, hoạt tính ức chế đối với topoisomerase I là cao hơn so với SN-38 mà là chất có hoạt động chính của irinotecan và topotecan cũng được sử dụng trong thiết lập lâm sàng, và thu được hoạt tính diệt tế bào cao hơn *in vitro* để chống lại các tế bào ung thư khác nhau. Cụ thể, nó thể hiện tác dụng chống lại các tế bào ung thư mà có tính kháng đối với SN-38 hoặc tác dụng tương tự do sự biểu hiện P-glycoprotein. Ngoài ra, trong mô hình chuột nhắt được cấy dưới da khối u của người, nó thể hiện tác dụng kháng khối u hiệu quả, và do đó trải qua các nghiên cứu lâm sàng, nhưng chưa được đưa ra thị trường (xem, Tài liệu phi sáng chế 5 đến 10). Tài liệu này vẫn chưa nêu rõ việc liệu có chức năng hữu hiệu exatecan dưới dạng ADC hay không.

DE-310 là phức chất trong đó exatecan được liên hợp với polyme carboxymetyldextran rượu polyhydric thoái biến sinh học qua đoạn đệm peptit GGFG (Tài liệu sáng chế 3). Bằng cách biến đổi exatecan thành dạng tiền dược chất polyme, sao cho tính chất lưu giữ trong máu cao có thể được duy trì và cả tính chất hướng đích cao đối với diện tích khối u cũng được gia tăng bị động bằng cách sử dụng khả năng thẩm thấu của các mạch máu mới được tạo ra trong khối u và tính chất lưu giữ trong các mô khối u. Đối với DE-310, thông qua sự phân cắt đoạn đệm peptit bằng enzym, exatecan và exatecan với glyxin được nối với nhóm amino liên tục được giải phóng dưới dạng hoạt chất chính. Do đó, các đặc tính dược động học được cải thiện và DE-310 được phát hiện ra là có hiệu lực cao hơn so với khi exatecan được dùng một mình dù là liều lượng của exatecan thấp hơn trường hợp sử dụng exatecan một mình theo các mô hình đánh giá khối u khác nhau trong các nghiên cứu phi lâm sàng. Nghiên cứu lâm sàng được tiến hành đối với DE-310, và các trường hợp hữu hiệu được xác nhận ở người, trong đó báo cáo đề xuất rằng hoạt chất chính tích tụ trong khối u nhiều hơn so với lượng có mặt trong các mô bình thường, tuy nhiên, cũng có báo cáo chỉ ra rằng sự tích tụ DE-310 và hoạt chất chính trong khối u không khác biệt nhiều so với sự tích tụ trong các mô bình thường ở người, và do đó không có quan sát thấy sự hướng đích thụ động nào ở người (xem, các tài liệu phi sáng chế 11 đến 14). Do đó, DE-310 cũng được

thương mại hóa, và tài liệu này cũng chưa nêu rõ rằng liệu có chức năng hiệu quả của exatecan làm thuốc được định hướng đối với sự hướng đích này hay không.

Phức chất trong đó gốc cấu trúc được thể hiện bằng công thức $\text{-NH(CH}_2\text{)}_4\text{C(=O)-}$ được chèn vào giữa đoạn đệm GGFG và exatecan để tạo ra $\text{-GGFG-NH(CH}_2\text{)}_4\text{C(=O)-}$ được dùng làm cấu trúc đoạn đệm cũng đã được biết là dạng hợp chất có liên quan đến DE-310 (Tài liệu sáng chế 4). Tuy nhiên, hiệu quả kháng khối u của phức chất vẫn chưa được biết đến.

Danh mục trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 5-59061

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 8-337584

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn quốc tế số WO 1997/46260

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn quốc tế số WO 2000/25825

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Ducry, L., et al. Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5–13.; Antibody-Drug Bioconjugates: Linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies.

Tài liệu phi sáng chế 2: Alley, S. C., et al. Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529–537.; Antibody-Drug Bioconjugates: targeted delivery for cancer.

Tài liệu phi sáng chế 3: Damle N.K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.; Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin.

Tài liệu phi sáng chế 4: Senter P. D., et al. Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.; The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma.

Tài liệu phi sáng chế 5: Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.; Antitumour activity of DX-8951f: new camptothecin derivative.

Tài liệu phi sáng chế 6: Mitsui, I., Kumazawa, E., Hirota, Y., et al. Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776–782.; A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors *in vitro* and *in vivo*.

Tài liệu phi sáng chế 7: Takiguchi, S., Tohgo, A., et al. Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760–769.; Antitumor effect of DX-8951, novel camptothecin analog, on human pancreatic tumor cells and their CPT-11-resistant variants cultured *in vitro* and xenografted into nude mice.

Tài liệu phi sáng chế 8: Joto, N. et al. Int J Cancer (1997) 72, 680–686.; DX-8951f, a water-soluble camptothecin analog, exhibits potent antitumor activity against a human lung cancer cell line and its SN-38-resistant variant.

Tài liệu phi sáng chế 9: Kumazawa, E. et al. Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210–220.; Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice.

Tài liệu phi sáng chế 10: De Jager, R., et al. Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260–273.; DX-8951f: summary of phase I clinical trials.

Tài liệu phi sáng chế 11: Inoue, K. et al. Polymer Drugs in the Clinical Stage, Edited by Maeda et al. (2003), 145–153.; CM-dextran-polyalcohol-camptothecin conjugate, DE-310 with a novel carrier system and its preclinical data.

Tài liệu phi sáng chế 12: Kumazawa, E. et al. Cancer Sci (2004) 95, 168–175.; DE-310, novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f: Potent antitumor activities in various murine tumor models.

Tài liệu phi sáng chế 13: Soepenberg, O. et al. Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703–711.; Phase I and pharmacokinetic study of DE-310 in Patients with Advanced Solid Tumors.

Tài liệu phi sáng chế 14: Wenthe M. N. et al. Investigational New Drugs (2005) 23, 339–347.; DE-310, macromolecular prodrug of the topoisomerase-I-inhibitor exatecan (DX-8951), in patients with operable solid tumors.

Vấn đề kỹ thuật

Đối với việc điều trị khối u bằng kháng thể, tác dụng kháng khối u chưa đầy đủ có thể được quan sát ngay cả khi kháng thể này nhận diện kháng nguyên và liên kết với các tế bào khối u, và là trường hợp trong đó cần đến kháng thể kháng khối u hiệu quả hơn. Ngoài ra, nhiều hợp chất kháng khối u có phân tử lượng thấp gặp vấn đề về độ an toàn như tác dụng phụ và độc tố ngay cả khi các hợp chất này có tác dụng kháng khối u hoàn hảo, mục đích vẫn là đạt được tác dụng điều trị bệnh ưu việt bằng cách tăng cường thêm độ an toàn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do vậy, mục đích của sáng chế là để thu được thuốc kháng khối u có tác dụng điều trị bệnh hoàn hảo, mà hoàn hảo về tác dụng kháng khối u và độ an toàn.

Phương thức để giải quyết vấn đề

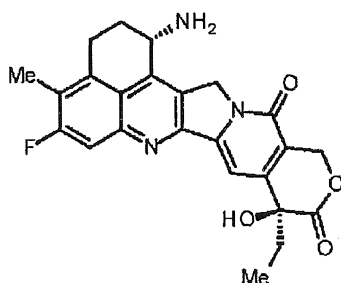
Các tác giả sáng chế cho rằng, khi hợp chất kháng khối u exatecan được chuyển hóa thành thể liên hợp kháng thể-thuốc, qua gốc cấu trúc chất liên kết, bằng cách liên hợp với kháng thể, mà có khả năng hướng đích các tế bào khối u, mà có tính chất nhận diện các tế bào khối u, tính chất liên kết với các tế bào khối u, tính chất tương tác nội bộ tế bào khối u, hoạt tính diệt tế bào đối với các tế bào khối u, hoặc tính chất tương tự, hợp chất kháng khối u này có thể được phân phối chắc chắn hơn đến các tế bào khối u để biểu hiện cụ thể tác dụng kháng khối u của hợp chất trong các tế bào khối u, và do đó tác dụng kháng khối u có thể được biểu hiện chắc chắn và cả tác dụng diệt tế bào tăng cường của kháng thể cũng được mong đợi, và liều lượng của hợp chất kháng khối u có thể được làm giảm so với trường hợp sử dụng hợp chất một mình, và do đó ảnh hưởng của hợp chất kháng khối u đến các tế bào bình thường có thể được làm giảm bớt sao cho có thể đạt được độ an toàn cao hơn.

Về vấn đề này, các tác giả sáng chế đã tạo ra chất liên kết với cấu trúc đặc trưng và thành công thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc trong đó kháng thể và exatecan được liên hợp với nhau qua chất liên kết, và xác nhận rằng có tác dụng kháng khối u hoàn hảo nhờ thể liên hợp này để từ đó hoàn thành sáng chế.

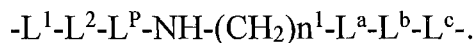
Cụ thể, sáng chế đề cập đến các nội dung dưới đây.

[1] Thễ liên hợp kháng thễ-thuốc trong đó hợp chất kháng khối u có công thức dưới đây:

Công thức 2



được liên hợp với kháng thễ thông qua chất liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:



Ở đây, kháng thễ được nối với đầu tận L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với đầu tận L^c với nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí nối,

trong đó

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^1 là $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$, $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)^{n^3}-C(=O)-$, $-C(=O)-\text{cyc.Hex}(1,4)-CH_2-(N\text{-ly-3-diminiccuS})-$, hoặc $-C(=O)-(CH_2)^{n^4}-C(=O)-$,

trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8, n^3 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8,

L^2 là $-NH-(CH_2-CH_2-O)^{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$, $-S-(CH_2)^{n^6}-C(=O)-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, n^6 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là chuỗi tận peptit gồm từ 2 đến 7 axit amin,

L^a là $-C(=O)-NH-$, $-NR^1-(CH_2)^{n^7}-$, $-O-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^7 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, R^1 là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(CH_2)^{n^8}-COOH$, hoặc $-(CH_2)^{n^9}-OH$, n^8 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^9 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

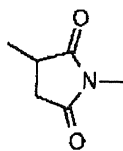
L^b là $-CR^2(-R^3)-$, $-O-$, $-NR^4-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R^2 và R^3 độc lập là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(CH_2)n^a-NH_2$, $-(CH_2)n^b-COOH$, hoặc $-(CH_2)n^c-OH$, R^4 là nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, n^b là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^c là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, với điều kiện là khi n^a bằng 0, thì R^2 và R^3 không giống nhau,

L^c là $-CH_2-$ hoặc $-C(=O)-$,

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

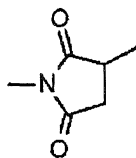
Công thức 3



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

$-(N\text{-ly-3-diminiccuS})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 4



được nối với L^2 ở vị trí 3 của chúng và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc chất liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

cyc. Hex(1,4) là nhóm 1,4-xyclohexylen, và

khi L^2 là $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$, thì L^1 là $-C(=O)-\text{cyc.Hex}(1,4)-CH_2-(N\text{-ly-3-diminiccuS})$.

Sáng chế còn đề cập đến các nội dung dưới đây.

[2] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [1], trong đó L^c là $-C(=O)-$.

[3] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [1] hoặc [2], trong đó liên kết giữa kháng thể và L^1 là

liên kết thioete được tạo thành ở vị trí liên kết disulfua có mặt trong phần bản lề của kháng thể,

liên kết disulfua được tạo thành ở vị trí liên kết disulfua có mặt trong phần bản lề của kháng thể, hoặc

liên kết amit được tạo thành ở nhóm amino có trên mạch bên của axit amin cấu thành kháng thể hoặc ở nhóm amino đầu tận.

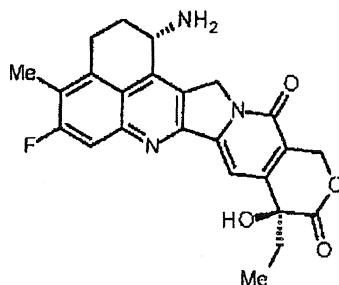
[4] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó gốc peptit của L^P là gốc axit amin có chứa axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitruilin, serin, axit glutamic, và axit aspartic.

[5] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó L^P là gốc peptit gồm 4 axit amin.

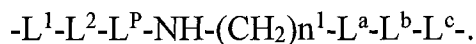
[6] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó L^P là -GGFG-.

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

Công thức 5



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



Ở đây, kháng thể được nối với đầu tận của L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với đầu tận của L^c với nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí nối,

trong đó

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^1 là $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$, hoặc $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n^4}-\text{C}(=\text{O})-$,

trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8, n^3 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8,

L^2 là $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}-(\text{CH}_2)_{n^6}-\text{C}(=\text{O})-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, n^6 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là gốc tetrapeptit của GGFG,

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

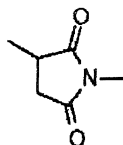
L^b là $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R^2 và R^3 là nguyên tử hydro,

L^c là $-\text{C}(=\text{O})-$,

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

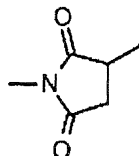
Công thức 6



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

$-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 7



được nối với L^2 ở vị trí 3 của chúng và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc chất liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

cyc. Hex(1,4) là nhóm 1,4-xyclohexylen, và

khi L^2 là $-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$, thì L^1 là $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$.

[8] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó L^1 là $-(suxinimit-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$ hoặc $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^3-C(=O)-$.

[9] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó L^1 là $-(suxinimit-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

[10] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó L^1 là $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$ hoặc $-C(=O)-(CH_2)n^4-C(=O)-$.

[11] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, và L^2 là liên kết đơn.

[12] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, L^2 là $-NH-(CH_2CH_2O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$, và n^5 bằng 2 hoặc 4.

[13] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12], trong đó $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ là một phần cấu trúc có độ dài mạch từ 4 đến 7 nguyên tử.

[14] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12], trong đó $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ là một phần cấu trúc có độ dài mạch bằng 5 hoặc 6 nguyên tử.

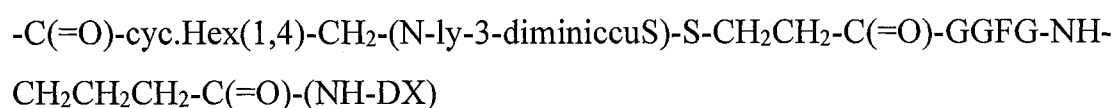
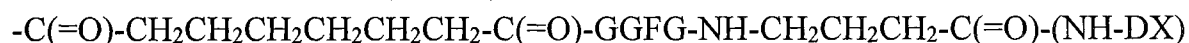
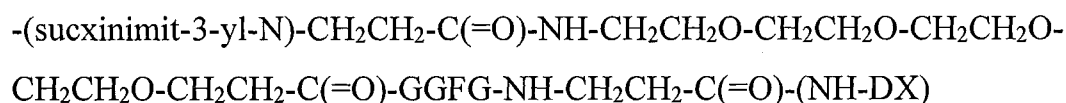
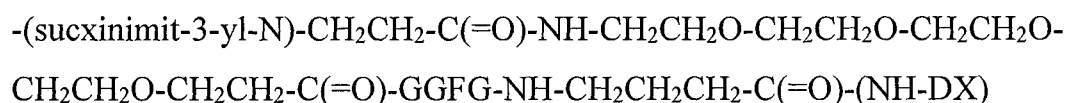
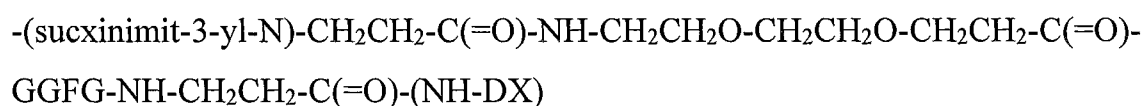
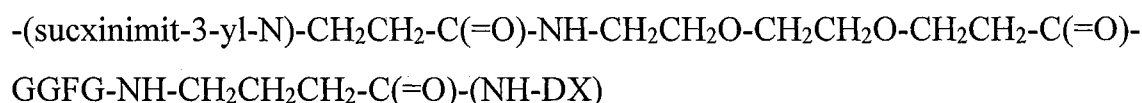
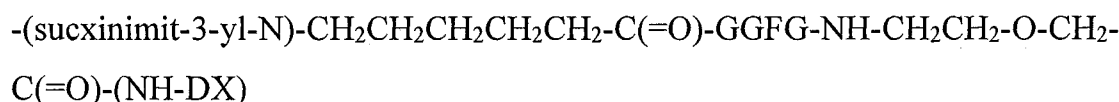
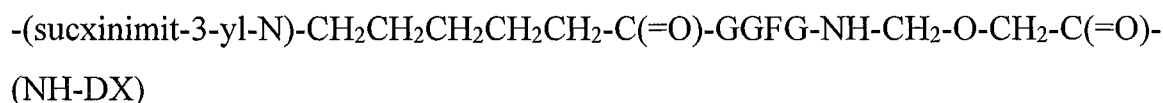
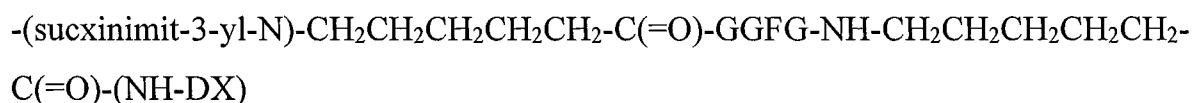
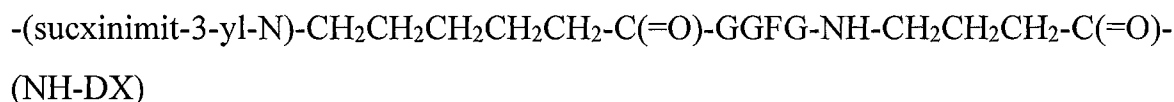
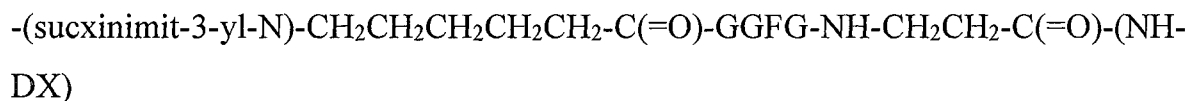
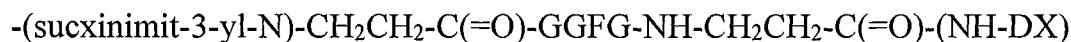
[15] Thễ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [14], trong đó $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ là

$-NH-(CH_2)_3-C(=O)-$,

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$, hoặc

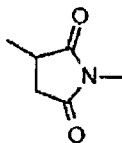
$-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-C(=O)-$.

[16] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [15], trong đó gốc cấu trúc chất liên kết - thuốc là một cấu trúc chất liên kết - thuốc được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc chất liên kết - thuốc dưới đây:



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

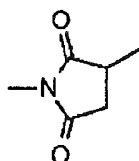
Công thức 8



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

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

Công thức 9

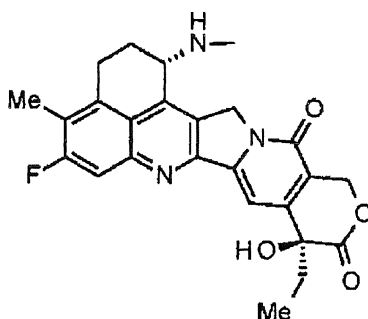


được nối với L^2 ở vị trí 3 của chúng và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc chất liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

cyc. Hex(1,4) là nhóm 1,4-xyclohexylen,

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 10



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

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

[17] Thở liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9] và từ [11] đến [14], trong đó gốc cấu trúc chất liên kết - thuốc có thuốc được nối với -L¹-

$L^2-L^P-NH-(CH_2)_n-L^a-L^b-L^c$ là một cấu trúc chất liên kết - thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

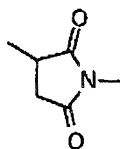
$-(\text{succinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$
(NH-DX)

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

$-(\text{succinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$
 $GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX).$

Theo mục trên đây, $-(\text{succinimit-3-yl-N})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

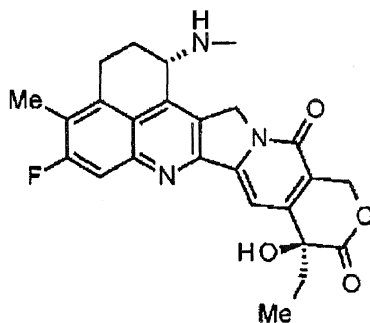
Công thức 11



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

$-(NH-DX)$ là nhóm có công thức sau:

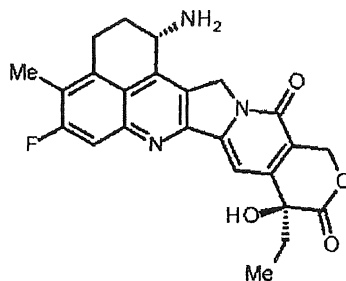
Công thức 12



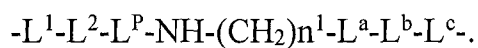
trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí nối.

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

Công thức 13



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



Ở đây, kháng thể được nối với đầu tận của L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với đầu tận của L^c ,

trong đó

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^1 là $-(\text{succinimit-3-yl-N})-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ và được nối với kháng thể qua liên kết thioete được tạo thành ở vị trí liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể,

trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8,

L^2 là $-NH-(CH_2-CH_2-O)_{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là gốc tetrapeptit của GGFG,

L^a là $-O-$ hoặc liên kết đơn,

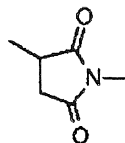
L^b là $-CR^2(-R^3)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R^2 và R^3 là nguyên tử hydro,

L^c là $-C(=O)-$, và

$-(\text{succinimit-3-yl-N})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 14



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

[19] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [18], trong đó

n^2 bằng 2, L^2 là $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, n^5 bằng 2, n^1 bằng 3, và cả L^a và L^b đều là liên kết đơn,

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

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

[20] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [18] hoặc [19], trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, và L^2 là liên kết đơn.

[21] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [18] hoặc [19], trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, L^2 là $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, và n^5 bằng 2 hoặc 4.

[22] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [18] đến [21], trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^a-L^b-L^c-$ là

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$,

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

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

[23] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [18] đến [22], trong đó gốc cấu trúc chất liên kết - thuốc là một cấu trúc chất liên kết - thuốc được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc chất liên kết - thuốc dưới đây:

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

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

-(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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

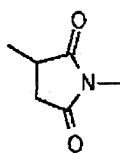
-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

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

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

Ở mục đây, -(succinimit-3-yl-N)- có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

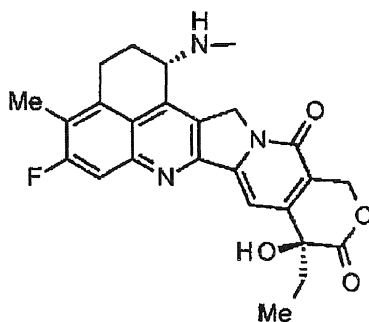
Công thức 15



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

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

Công thức 16



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

[24] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [23], trong đó gốc cấu trúc chất liên kết - thuốc có thuốc được nối với $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$ là một cấu trúc chất liên kết - thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

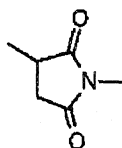
$-(\text{succinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$
(NH-DX)

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

$-(\text{succinimit-3-yl-N})-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-$
 $GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX).$

Theo mục trên đây, $-(\text{succinimit-3-yl-N})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

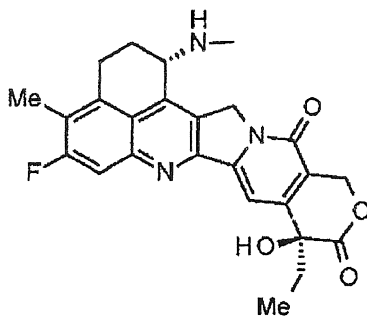
Công thức 17



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

$-(NH-DX)$ là nhóm có công thức sau:

Công thức 18



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

[25] Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [24], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[26] Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [24], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[27] Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [24], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

[28] Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [27], trong đó kháng thể là kháng thể có một hoặc nhiều tính chất nhận diện tế bào đích, tính chất liên kết với tế bào đích, tính chất tương tác nội bộ tế bào đích, và tính chất phá hủy tế bào đích.

[29] Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [27], trong đó tế bào được hướng đích bằng thẻ liên hợp kháng thể-thuốc là tế bào khối u.

[30] Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [27], trong đó kháng thể là kháng thể kháng A33, kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CanAg, kháng thể kháng CD20, kháng thể kháng CD22, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, kháng thể kháng CD56, kháng thể kháng CD70, kháng thể kháng CEA, kháng thể kháng Cripto, kháng thể kháng EphA2, kháng thể kháng G250, kháng thể kháng MUC1, kháng thể kháng GPNMB, kháng thể kháng integrin, kháng thể

kháng PSMA, kháng thể kháng tenascin-C, kháng thể kháng SLC44A4, hoặc kháng thể kháng mesothelin.

[31] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [27], trong đó kháng thể là kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, hoặc kháng thể kháng CD70.

[32] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [27], trong đó kháng thể là kháng thể kháng B7-H3.

[33] Thuốc chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [32], muối của chúng hoặc hydrat của chúng.

[34] Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [32], muối của chúng hoặc hydrat của chúng.

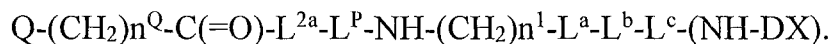
[35] Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư theo mục [34], được áp dụng cho bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư đường niệu, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp đa khuôn, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc tố, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư thực quản.

[36] Dược phẩm chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [32], muối của chúng hoặc hydrat của chúng làm thành phần hoạt tính, và thành phần bào chế dược dụng.

[37] Dược phẩm theo mục [36], được áp dụng cho bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư đường niệu, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp đa khuôn, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc tố, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư thực quản.

[38] Phương pháp điều trị khối u và/hoặc bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [32], muối của chúng hoặc hydrat của chúng.

[39] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuốc có công thức sau:



Trong công thức này, Q là (maleimide-N-yl)-, HS-, X-CH₂-C(=O)-NH-, hoặc (pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-,

X là nguyên tử brom hoặc nguyên tử iot,

n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8,

L^{2a} là -NH-(CH₂-CH₂-O) n^5 -CH₂-CH₂-C(=O)- hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là gốc peptit gồm từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitruilin, serin, axit glutamic, và axit aspartic,

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^a là -C(=O)-NH-, -NR¹-(CH₂) n^7 -, -O-, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^7 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, R¹ là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, -(CH₂) n^8 -COOH, hoặc -(CH₂) n^9 -OH, n^8 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^9 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

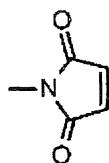
L^b là -CR²(-R³)-, -O-, -NR⁴-, hoặc liên kết đơn,

trong đó R² và R³ mỗi độc lập là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, -(CH₂) n^a -NH₂, -(CH₂) n^b -COOH, hoặc -(CH₂) n^c -OH, R⁴ là nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, n^b là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^c là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, với điều kiện là khi n^a bằng 0, thì R² và R³ không giống nhau,

L^c là -CH₂- hoặc -C(=O)-,

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

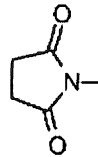
Công thức 19



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối,

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl) là nhóm có công thức sau:

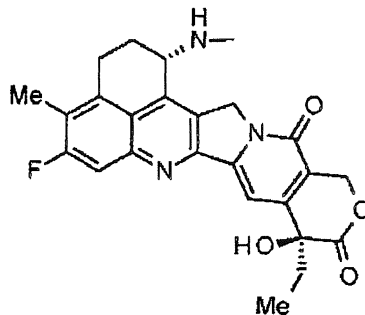
Công thức 20



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 21



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

[40] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuốc theo mục [39], trong đó L^c là $-C(=O)-$.

[41] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuốc theo mục [39] hoặc [40], trong đó L^p là gốc peptit gồm 4 axit amin.

[42] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [39] đến [41], trong đó L^p là $-GGFG-$.

[43] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [39] đến [42], trong đó $-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-L^b-$ 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-CH₂CH₂-O-CH₂-.

[44] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuộc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [39] đến [42], trong đó -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-L^b- là

-NH-CH₂CH₂CH₂-,

-NH-CH₂-O-CH₂-, hoặc

-NH-(CH₂)₂-O-CH₂-.

[45] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuộc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [39] đến [44], trong đó n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 6.

[46] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuộc theo mục [43], trong đó

Q là (maleimit-N-yl)-,

n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, và

L^{2a} là liên kết đơn.

[47] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuộc theo mục [44], trong đó

Q là (maleimit-N-yl)-,

n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, và

L^{2a} là liên kết đơn.

[48] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuộc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [39] đến [42], trong đó

Q là (maleimit-N-yl)-,

n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5,

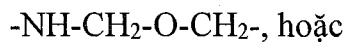
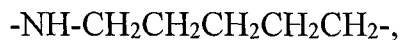
L^{2a} là -NH-(CH₂-CH₂-O)^{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)-,

n⁵ là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 4, và

-NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-L^b- là

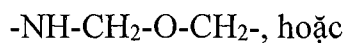
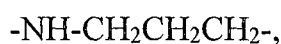
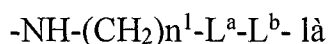
-NH-CH₂CH₂-,

-NH-CH₂CH₂CH₂-,

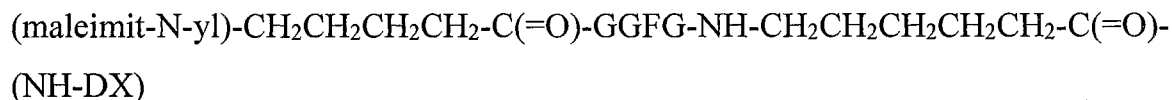
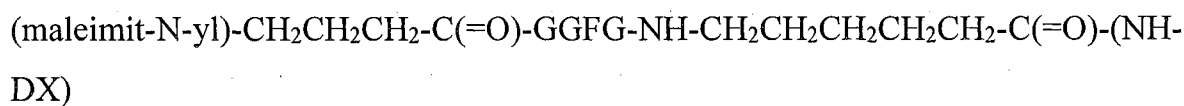
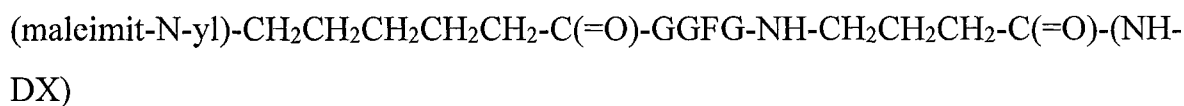
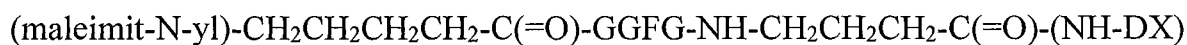
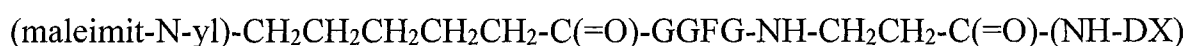
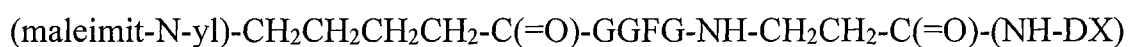
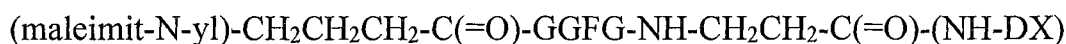


[49] Hợp chất trung gian chất liên kết - thuộc theo mục [48], trong đó

n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 hoặc 4, và



[50] Hợp chất có công thức dưới đây:



(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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
 C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
 CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 HS-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
 C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 (NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-
CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

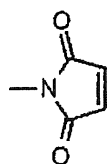
(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), or

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Theo mục trên đây, (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

Công thức 22

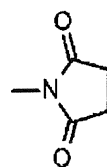


trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối,

X là nguyên tử halogen,

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

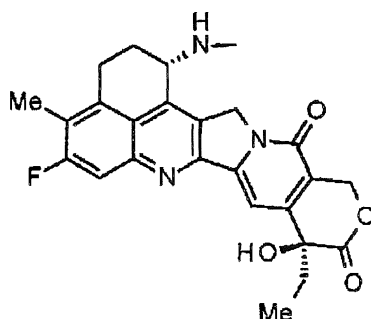
Công thức 23



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 24



(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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

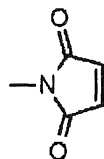
(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), hoặc

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Theo mục trên đây, (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

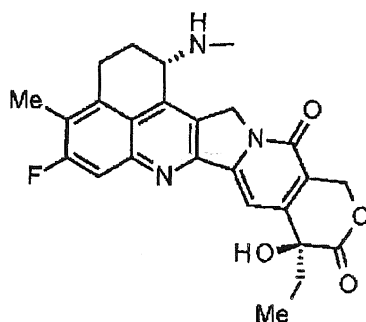
Công thức 25



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 26



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

[52] Hợp chất có công thức dưới đây:

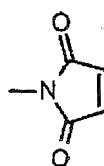
(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

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

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

Theo mục trên đây, (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

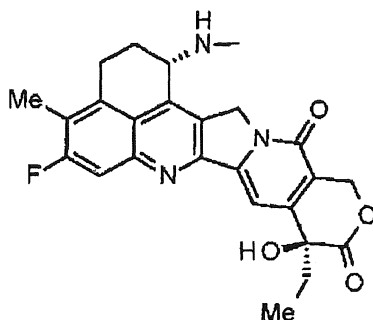
Công thức 27



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 28



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

[53] Hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

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

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

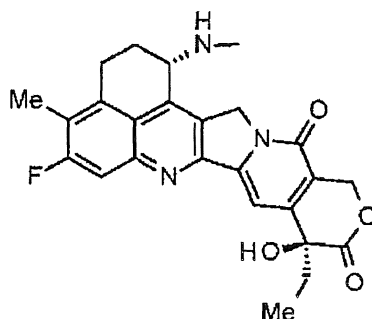
$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$,

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

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

trong đó -(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

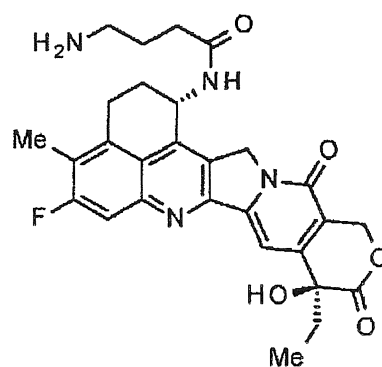
Công thức 29



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

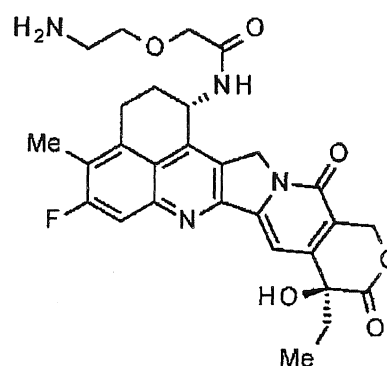
[54] Hợp chất có công thức sau:

Công thức 30



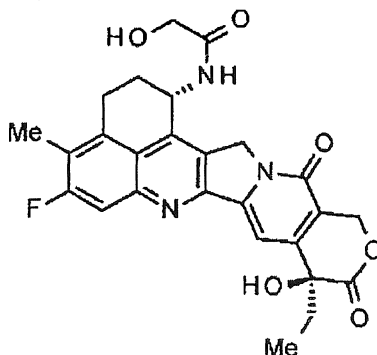
[55] Hợp chất có công thức sau:

Công thức 31



[56] Hợp chất có công thức sau:

Công thức 32



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



phản ứng với kháng thể hoặc dẫn xuất phản ứng của chúng và cho gốc chất liên kết - thuốc liên hợp với kháng thể này

bằng phương pháp tạo ra liên kết thioete ở vị trí liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể, hoặc bằng phương pháp tạo ra liên kết amit ở nhóm amino có trên mạch bên của axit amin cấu thành kháng thể hoặc ở nhóm amino đầu tận.

Trong công thức, Q là (maleimide-N-yl)-, HS-, X-CH₂-C(=O)-NH-, hoặc (pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-,

X là nguyên tử brom hoặc nguyên tử iot,

n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8,

L^{2a} là -NH-(CH₂-CH₂-O) n^5 -CH₂-CH₂-C(=O)- hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là gốc peptit gồm từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitruilin, serin, axit glutamic, và axit aspartic,

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^a là -C(=O)-NH-, -NR¹-(CH₂) n^7 -, -O-, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^7 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, R^1 là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(CH_2)n^8-COOH$, hoặc $-(CH_2)n^9-OH$, n^8 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^9 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

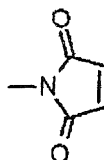
L^b là $-CR^2(-R^3)-$, $-O-$, $-NR^4-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R^2 và R^3 độc lập là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(CH_2)n^a-NH_2$, $-(CH_2)n^b-COOH$, hoặc $-(CH_2)n^c-OH$, R^4 là nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, n^b là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^c là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, với điều kiện khi n^a bằng 0, thì R^2 và R^3 không giống nhau,

L^c là $-CH_2-$ hoặc $-C(=O)-$,

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

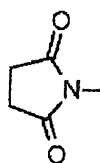
Công thức 33



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối,

(pyrrolidine-2,5-dione-N-yl) là nhóm có công thức sau:

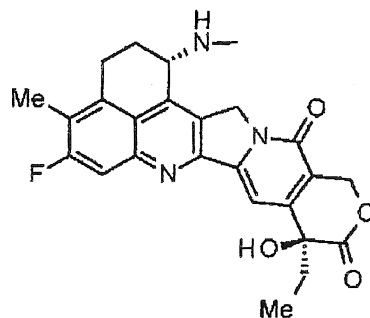
Công thức 34



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 35



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

[58] Phương pháp sản xuất theo mục [57], trong đó phương pháp để liên hợp gốc chất liên kết - thuốc với kháng thể là

phương pháp khử kháng thể và sau đó tạo ra liên kết thioete bằng cách cho phản ứng với hợp chất trong đó Q là nhóm maleimidyl hoặc $X-CH_2-C(=O)-NH-$,

phương pháp tạo ra liên kết amit bằng cách cho phản ứng với hợp chất trong đó Q là (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-, hoặc

phương pháp cho kháng thể phản ứng với hợp chất có công thức $Q^1-L^{1a}-Q^2$

[trong đó Q^1 là (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-, (3-sulfo-pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-, $R^Q-O-C(=N)-$, hoặc $O=C=N-$,

L^{1a} - là vòng -hex(1,4)-CH₂-, nhóm alkylen có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, nhóm phenylen, $-(CH_2)^{n^4}-C(=O)-$, $-(CH_2)^{n^{4a}}-NH-C(=O)-(CH_2)^{n^{4b}}-$, hoặc $-(CH_2)^{n^{4a}}-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-$,

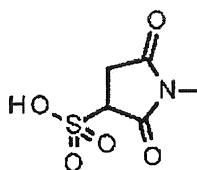
Q^2 là (maleimide-N-yl), nguyên tử halogen, hoặc -S-S-(2-pyridyl),

R^Q là nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8,

n^{4a} là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, n^{4b} là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

(3-sulfo-pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

Công thức 36



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và axit sulfonic này có khả năng tạo ra muối lithi, muối natri, hoặc muối kali,

Cyc. Hex(1,4) là nhóm 1,4-xyclohexylen, và

(2-pyridyl) là nhóm 2-pyridyl]

và sau đó phản ứng với hợp chất trong đó Q là SH để tạo ra cấu trúc chất liên kết - thuốc bằng liên kết amit.

[59] Phương pháp sản xuất theo mục [57] hoặc [58], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[60] Phương pháp sản xuất theo mục [57] hoặc [58], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[61] Phương pháp sản xuất theo mục [57] hoặc [58], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

[62] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [57] đến [61], trong đó tế bào được hướng đích bằng thể liên hợp kháng thể-thuốc là tế bào khối u.

[63] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [57] đến [61], trong đó kháng thể là kháng thể kháng A33, kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CanAg, kháng thể kháng CD20, kháng thể kháng CD22, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, kháng thể kháng CD56, kháng thể kháng CD70, kháng thể kháng CEA, kháng thể kháng Cripto, kháng thể kháng EphA2, kháng thể kháng G250, kháng thể kháng MUC1, kháng thể kháng GPNMB, kháng thể kháng integrin, kháng thể kháng

PSMA, kháng thể kháng tenascin-C, kháng thể kháng SLC44A4, hoặc kháng thể kháng mesothelin.

[64] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [57] đến [61], trong đó kháng thể là kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, hoặc kháng thể kháng CD70.

[65] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [57] đến [61], trong đó kháng thể là kháng thể kháng B7-H3.

[66] Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc thu được bằng phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [57] đến [65].

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

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

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

(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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

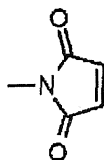
(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), or

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Theo mục trên đây, (maleimit-N-yl)- là nhóm được thể hiện bằng vòng thức sau:

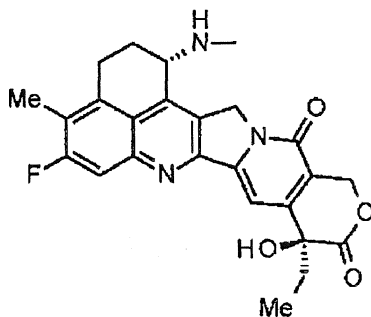
Công thức 37



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 38



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

[68] Thể liên hợp kháng thể-thuốc thu được bằng cách tạo ra liên kết thioete ở vị trí liên kết sulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể, trong đó kháng thể này được xử lý

trong điều kiện khử và sau đó được cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm các hợp chất được chỉ ra dưới đây:

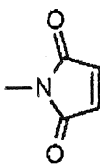
(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(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).

Theo mục trên đây, (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

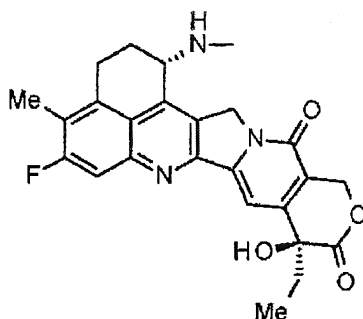
Công thức 39



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

Công thức 40



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

[69] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [67] hoặc [68], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[70] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [67] hoặc [68], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[71] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục [67] hoặc [68], trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

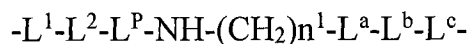
[72] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [67] đến [71], trong đó tế bào được hướng đích bằng thể liên hợp kháng thể-thuốc là tế bào khối u.

[73] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [67] đến [71], trong đó kháng thể là kháng thể kháng A33, kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CanAg, kháng thể kháng CD20, kháng thể kháng CD22, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, kháng thể kháng CD56, kháng thể kháng CD70, kháng thể kháng CEA, kháng thể kháng Cripto, kháng thể kháng EphA2, kháng thể kháng G250, kháng thể kháng MUC1, kháng thể kháng GPNMB, kháng thể kháng integrin, kháng thể kháng PSMA, kháng thể kháng tenascin-C, kháng thể kháng SLC44A4, hoặc kháng thể kháng mesothelin.

[74] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [67] đến [71], trong đó kháng thể là kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, hoặc kháng thể kháng CD70.

[75] Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo mục bất kỳ trong số các mục từ [67] đến [71], trong đó kháng thể là kháng thể kháng B7-H3.

[76] Chất liên kết có công thức sau:



để thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc trong đó thuốc được liên hợp với kháng thể thông qua chất liên kết này.

Theo mục trên đây, L^1 là vị trí nối đối với kháng thể, L^c là vị trí nối cho hợp chất kháng khối u,

trong đó

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^1 là $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex(1,4)}-\text{CH}_2-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$, hoặc $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n^4}-\text{C}(=\text{O})-$,

trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8, n^3 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8,

L^2 là $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}-(\text{CH}_2)_{n^6}-\text{C}(=\text{O})-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, n^6 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

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

L^a là $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NR}^1-(\text{CH}_2)_{n^7}-$, $-\text{O}-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^7 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, R^1 là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(\text{CH}_2)_{n^8}-\text{COOH}$, hoặc $-(\text{CH}_2)_{n^9}-\text{OH}$, n^8 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^9 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

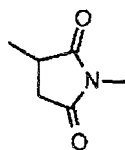
L^b là $-\text{CR}^2(-\text{R}^3)-$, $-\text{O}-$, $-\text{NR}^4-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R^2 và R^3 độc lập là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(\text{CH}_2)_{n^a}-\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_{n^b}-\text{COOH}$, hoặc $-(\text{CH}_2)_{n^c}-\text{OH}$, R^4 là nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, n^b là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^c là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, với điều kiện là khi n^a bằng 0, thì R^2 và R^3 không giống nhau,

L^c là $-\text{CH}_2-$ hoặc $-\text{C}(=\text{O})-$,

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

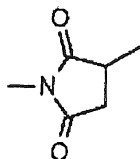
Công thức 41



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

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

Công thức 42



được nối với L^2 ở vị trí 3 của chúng và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc chất liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

Cyc. Hex(1,4) là nhóm 1,4-xyclohexylen, và

khi L^2 là $-S-(CH_2)_n^6-C(=O)-$, thì L^1 là $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$.

[77] Chất liên kết theo mục [76], được chọn từ nhóm dưới đây, với điều kiện là đầu tận bên trái là vị trí nối với kháng thể và đầu tận bên phải là vị trí nối với hợp chất kháng khối u:

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

-(suxinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

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

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

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

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

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

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

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

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

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

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

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

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
 GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
 GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
 C(=O)-
 -C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
 CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[78] Chất liên kết theo mục [76], được chọn từ nhóm dưới đây, với điều kiện là đầu tận bên trái là vị trí nối với kháng thể và đầu tận bên phải là vị trí nối với hợp chất kháng khối u:

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

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

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-

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

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-
 C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
 GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-
 C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 -(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[79] Chất liên kết theo mục [76], được chọn từ nhóm dưới đây, với điều kiện là đầu tận bên trái là vị trí nối với kháng thể và đầu tận bên phải là vị trí nối với hợp chất kháng khối u:

- (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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- (succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[80] Chất liên kết theo mục [76], được chọn từ nhóm dưới đây, với điều kiện là đầu tận bên trái là vị trí nối với kháng thể và đầu tận bên phải là vị trí nối với hợp chất kháng khối u:

- (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)-.

Hiệu quả của sáng chế

Đối với thể liên hợp kháng thể-thuốc có hợp chất kháng khối u exatecan được liên hợp qua chất liên kết với cấu trúc đặc trưng, có thể đạt được tác dụng kháng khối u và độ an toàn hoàn hảo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ ID NO: 1).

Fig.2 là trình tự axit amin của biến thể 2 của B7-H3 (SEQ ID NO: 2).

Fig.3 là trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H1 (SEQ ID NO: 9).

Fig.4 là trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H2 (SEQ ID NO: 10).

Fig.5 là trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H3 (SEQ ID NO: 11).

Fig.6 là trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H4 (SEQ ID NO: 12).

Fig.7 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L1 (SEQ ID NO: 13).

Fig.8 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L2 (SEQ ID NO: 14).

Fig.9 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L3 (SEQ ID NO: 15).

Fig.10 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L4 (SEQ ID NO: 16).

Fig.11 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L5 (SEQ ID NO: 17).

Fig.12 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L6 (SEQ ID NO: 18).

Fig.13 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L7 (SEQ ID NO: 19).

Fig.14 là trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 20).

Fig.15 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể M30 (SEQ ID NO: 21).

Fig.16 thể hiện trình tự nucleotit của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ ID NO: 26).

Fig.17 thể hiện tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) đến tế bào A375 dòng u hắc sắc tố ở người được cấy ghép dưới da. Trên hình vẽ, đường có các hình thoi rỗng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tam giác rỗng mô

tác dụng của kháng thể M30-H1-L4P, và đường có các đường tròn rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2).

Fig.18 thể hiện tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) đến các tế bào A375 dòng u hắc sắc tố ở người được cấy ghép dưới da. Đường có các hình thoi rỗng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình vuông đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 0,1mg/kg, đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 0,3mg/kg, đường có các hình tam giác đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 1mg/kg, và đường có các đường tròn rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 3mg/kg.

Fig.19 thể hiện tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) đến các tế bào Calu-6 dòng ung thư phổi tế bào không nhỏ ở người được cấy dưới da. Đường có các hình thoi rỗng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tam giác rỗng mô tả tác dụng của kháng thể M30-H1-L4P, và đường có các đường tròn rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2).

Fig.20 thể hiện tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (1), (13), (41), và (55) đến các tế bào A375 dòng u hắc sắc tố ở người được cấy dưới da. Trên hình vẽ, đường có các hình thoi rỗng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tròn rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (1), đường có các hình tam giác rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (13), đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (41), và đường có các hình vuông rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (55).

Fig.21 thể hiện tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (13), (41), và (55) đến các tế bào Calu-6 dòng ung thư phổi tế bào không nhỏ ở người được cấy dưới da. Đường có các hình thoi rỗng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tròn rỗng mô tả tác dụng của DE-310, đường có các hình tam giác rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (13), đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (41), và đường có các hình vuông rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (55).

Fig.22 thể hiện tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (17), (18), (19), (59), (60), và (61) đối với các tế bào A375 dòng u hắc sắc tố ở người được cấy dưới da. Trên hình vẽ này, đường có các hình thoi đặc mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình vuông đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (17), đường có các hình vuông rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (18), đường có các hình tròn rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (19), đường có các hình tam giác đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (59), đường có các hình tam giác rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (60), và đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (61).

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Kháng thể

Kháng thể được sử dụng trong thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế nghĩa là globin miễn dịch và là phân tử chứa vị trí liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên. Lớp kháng thể theo sáng chế có thể là lớp bất kỳ trong số IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, và IgY và tốt hơn là IgG. Lớp phụ của kháng thể theo sáng chế có thể là lớp phụ bất kỳ trong số IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2 và tốt hơn là IgG1 hoặc IgG2. Kháng thể có thể có nguồn gốc từ loài bất kỳ, và các ví dụ được ưu tiên về loài này có thể bao gồm người, chuột cống, chuột nhắt, và thỏ. Trong trường hợp kháng thể có nguồn gốc từ loài không phải người, thì tốt hơn là kháng thể đó được khảm hoặc được biến đổi giống như của người bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết. Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng và tốt hơn là kháng thể đơn dòng.

Kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể có khả năng hướng đích các tế bào khối u. Do kháng thể theo sáng chế được liên hợp với thuốc có hoạt tính kháng khối u qua chất liên kết, nên kháng thể này tốt hơn là mang một hoặc nhiều tính chất nhận diện tế bào khối u, tính chất liên kết với tế bào khối u, tính chất tương tác nội bộ tế bào khối u, và tính chất phá hủy tế bào khối u.

Hoạt tính liên kết của kháng thể đối với các tế bào khối u có thể được xác nhận bằng cách sử dụng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Tương tác nội bộ của kháng thể vào các tế bào khối u có thể được xác nhận bằng cách sử dụng (1) thử nghiệm quan sát kháng thể được kết hợp trong các tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp (được đánh dấu huỳnh quang) liên kết với kháng thể điều trị bệnh (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) thử nghiệm xác định lượng huỳnh quang được kết hợp trong các tế bào bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp (được đánh dấu huỳnh quang) liên kết với kháng thể điều trị bệnh (Molecular Biology of Cell, Vol. 15, 5268-5282, December 2004), hoặc (3) thử nghiệm Mab-ZAP sử dụng độc tố miễn dịch liên kết với kháng thể điều trị bệnh trong đó độc tố này được giải phóng khi kết hợp vào các tế bào để ức chế sự phát triển của tế bào (Bio Techniques 28: 162-165, January 2000).

Hoạt tính kháng khối u của kháng thể dùng để chỉ hoạt tính gây độc tế bào hoặc tác dụng diệt tế bào chống lại các tế bào khối u và có thể được xác nhận *in vitro* bằng cách xác định hoạt tính ức chế chống lại sự phát triển của tế bào. Ví dụ, dòng tế bào ung thư biểu hiện quá mức protein đích đối với kháng thể được nuôi cấy, và kháng thể được bổ sung ở các nồng độ thay đổi vào hệ thống nuôi cấy để xác định hoạt tính ức chế đối với sự hình thành ổ bệnh, sự hình thành khuẩn lạc, và sự phát triển dạng cầu. Hoạt tính kháng khối u có thể được xác nhận *in vivo*, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể này cho chuột nhắt trụi lông có dòng tế bào khối u đã được cấy biểu hiện protein đích ở mức cao, và xác định sự thay đổi trong tế bào ung thư. Do thuốc được liên hợp trong thể liên hợp kháng thể-thuốc đem lại tác dụng kháng khối u, nên nó được ưu tiên hơn nhưng không nhất thiết là bản thân kháng thể phải có tác dụng kháng khối u. Để thuốc đem lại tác dụng kháng khối u và cả phá hủy cụ thể và có chọn lọc các tế bào khối u, thì quan trọng và tốt hơn là kháng thể nên có tính chất tương tác nội bộ để đi trú vào các tế bào khối u.

Các ví dụ về kháng thể này có thể gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể kháng A33, kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CanAg, kháng thể kháng CD20, kháng thể kháng CD22, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, kháng thể kháng CD56, kháng thể kháng CD70, kháng thể kháng CEA, kháng thể kháng Cripto, kháng

thể kháng EphA2, kháng thể kháng G250, kháng thể kháng MUC1, kháng thể kháng GPNMB, kháng thể kháng integrin, kháng thể kháng PSMA, kháng thể kháng tenascin-C, kháng thể kháng SLC44A4, và kháng thể kháng mesothelin.

Tốt hơn nếu kháng thể theo sáng chế là kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, kháng thể kháng CD70, hoặc kháng thể kháng B7-H3, và tốt hơn nữa nếu là kháng thể kháng B7-H3.

Kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp thường được tiến hành trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm bước tạo miễn dịch cho các con vật bằng polypeptit kháng nguyên và thu gom và tinh chế kháng thể được sản xuất *in vivo*. Nguồn gốc của kháng nguyên không bị giới hạn là từ người, và động vật có thể được tạo miễn dịch bằng kháng nguyên có nguồn gốc từ động vật không phải người như chuột nhắt, chuột cống và loài tương tự. Trong trường hợp này, tính phản ứng chéo của kháng thể liên kết với kháng nguyên khác loại thu được bằng kháng nguyên người có thể được thử nghiệm để sàng lọc kháng nguyên có thể ứng dụng cho bệnh ở người.

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

Kháng nguyên có thể thu được bằng cách thiết kế di truyền các tế bào vật chủ để sản xuất ra gen mã hóa protein kháng nguyên. Cụ thể là, các vector cho phép biểu hiện gen kháng nguyên được chuẩn bị và được chuyển tới tế bào vật chủ sao cho gen này được biểu hiện. Nhờ đó kháng nguyên đã biểu hiện có thể được tinh chế.

Kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, và kháng thể kháng CD70 có thể thu được bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật lần lượt dựa trên các tài liệu WO2002/043661, Patent Mỹ số 5773001, và WO2006/113909.

Kháng thể B7-H3 được sử dụng theo sáng chế tốt hơn là các kháng thể có các tính chất như được mô tả dưới đây.

(1) Kháng thể có các tính chất dưới đây:

(a) liên kết đặc hiệu với B7-H3,

(b) có hoạt tính thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (antibody-dependent cell-mediated phagocytosis - ADCP), và

(c) có hoạt tính kháng khối u *in vivo*.

(2) Kháng thể theo mục (1), trong đó B7-H3 là phân tử có chứa trình tự axit amin được nêu ra trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

(3) Kháng thể theo mục (1) hoặc (2), trong đó kháng thể này có CDRH1 có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, CDRH2 có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, và CDRH3 có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5 là các vùng quyết định bổ thể chuỗi nặng, và CDRL1 có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, CDRL2 có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, và CDRL3 có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 là các vùng quyết định bổ thể chuỗi nhẹ.

(4) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó vùng hằng định của nó là vùng hằng định có nguồn gốc từ người.

(5) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó kháng thể này là kháng thể đã được biến đổi giống như của người.

(6) Kháng thể theo mục (5), trong đó kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (a) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9, (b) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 10, (c) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 11, (d) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12, (e) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc hơn 95% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (a) đến (d), và (f) trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (a) đến (d) nhờ các đột biến làm khuyết, thay thế hoặc thêm ít nhất một axit amin, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm (g) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 13, (h) trình tự axit amin được mô tả trong các

vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 14, (i) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 15, (j) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 16, (k) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 17, (l) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 18, (m) trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 19, (n) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc hơn 95% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin từ (g) đến (m), và (o) trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (g) đến (m) nhờ các đột biến làm khuyết, thay thế, hoặc thêm ít nhất một axit amin.

(7) Kháng thể theo mục (6), trong đó kháng thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 13, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 14, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 15, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 16, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 17, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 18, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID

NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 19, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 13, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 14, vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 15, và vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 16.

(8) Kháng thể theo mục (6) hoặc (7), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 13, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 14, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 15, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 16, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 17, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong

SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 19, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 13, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 14, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 15, và chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 16.

(9) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (6) đến (8), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 19, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14, chuỗi nặng có chứa

trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, và chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16.

(10) Kháng thể theo mục (8) hoặc (9), trong đó kháng thể này thiếu axit amin ở đầu tận carboxy của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 12 trong chuỗi nặng.

(11) Kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (10), phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào vật chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện chứa polynucleotit mã hóa kháng thể; và thu gom kháng thể đang nói đến từ môi trường nuôi cấy thu được trong bước trước đó.

(12) Kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (11), trong đó việc cải biến glycan được điều hòa để tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể.

Sau đây, kháng thể B7-H3 được sử dụng theo sáng chế sẽ được mô tả.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh ung thư" và "khối u" được sử dụng với cùng một nghĩa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "gen" không chỉ gồm ADN, mà còn gồm cả ARN thông tin (mARN) của nó, ADN bổ sung (cADN) của nó và ARN bổ sung (cARN) của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polynucleotit" được sử dụng với cùng một nghĩa như axit nucleic và cũng bao gồm cả ADN, ARN, đầu dò, oligonucleotit, và môi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit" và "protein" được sử dụng với nghĩa tương đương.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào" còn bao gồm các tế bào ở cá thể động vật và các tế bào được nuôi cấy.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "B7-H3" được sử dụng với cùng một nghĩa như protein B7-H3, và cũng dùng để chỉ biến thể 1 của B7-H3 và/hoặc biến thể 2 của B7-H3.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "CDR" dùng để chỉ vùng quyết định bổ thể (complementarity determining region - CDR), và đã biết là mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể có ba vùng quyết định bổ thể (CDR). CDR còn được gọi là vùng siêu biến, và có trong vùng biến đổi của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Đó là vị trí có mức độ biến đổi cao một cách khác thường về cấu trúc sơ cấp của nó, và có ba CDR riêng rẽ trong cấu trúc sơ cấp của mỗi chuỗi polypeptit nặng và nhẹ. Trong bản mô tả này, như đối với các CDR của kháng thể, các CDR của chuỗi nặng được thể hiện bằng CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ phía đầu tận amino của trình tự axit amin của chuỗi nặng, và các CDR của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ phía đầu tận amino của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ. Các vị trí này gần với nhau trong cấu trúc bậc ba và quyết định tính đặc hiệu đối với kháng nguyên liên kết với kháng thể.

Cụm từ "quy trình lai được thực hiện trong các điều kiện nghiêm ngặt" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ quy trình trong đó việc lai được thực hiện trong các điều kiện mà sự nhận biết có thể đạt được bằng cách tiến hành phương pháp lai ở nhiệt độ 68°C trong dung dịch lai có bán trên thị trường ExpressHyb Hybridization Solution (được sản xuất bởi Clontech, Inc.) hoặc bằng cách tiến hành phương pháp lai ở nhiệt độ 68°C với sự có mặt của NaCl với lượng nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1,0M bằng cách sử dụng thiết bị lọc có ADN được cố định trên đó, tiếp đó là tiến hành rửa ở nhiệt độ 68°C bằng cách sử dụng dung dịch SSC với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2 x (1 x dung dịch SSC chứa NaCl 150mM và natri xitrat 15mM) hoặc trong các điều kiện tương đương với đó.

1. B7-H3

B7-H3 là thành viên của họ B7 được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên dưới dạng các phân tử kích thích đồng thời, và được xem là tác động đến thụ thể trên các tế bào T để tăng cường hoặc ức chế hoạt tính miễn dịch.

B7-H3 là protein có cấu trúc xuyên màng dịch chuyển đơn, và miền ngoại bào đầu tận N của B7-H3 chứa hai biến thể. Biến thể 1 của B7-H3 (4Ig-B7-H3) chứa miền IgG lần lượt giống V hoặc giống C ở hai vị trí, và biến thể 2 của B7-H3 (2Ig-B7-H3) chứa miền Ig lần lượt giống V hoặc giống C ở một vị trí.

Đối với B7-H3 được sử dụng theo sáng chế, B7-H3 có thể trực tiếp được tinh chế từ các tế bào biểu hiện B7-H3 ở người hoặc động vật có vú không phải người (như chuột cống hoặc chuột nhắt) và được sử dụng, hoặc phân cắt màng tế bào chứa các tế bào được mô tả ở trên có thể được điều chế và được sử dụng. Ngoài ra, B7-H3 có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp chúng *in vitro* hoặc phương pháp sản xuất chúng trong tế bào vật chủ thông qua phương pháp thiết kế di truyền. Trong phương pháp thiết kế di truyền, cụ thể là, sau khi cADN của B7-H3 được kết hợp vào vector có khả năng biểu hiện cADN của B7-H3, B7-H3 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch chứa enzym, cơ chất và chất năng lượng cần để phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện B7-H3 trong một tế bào vật chủ nhân sơ hoặc nhân thực được biến nạp khác.

Trình tự axit amin của khung đọc mở (open reading frame - ORF) của gen biến thể 1 của B7-H3 ở người được nêu trong SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 1 được thể hiện trên Fig.1.

Trình tự axit amin của ORF của gen biến thể 2 của B7-H3 ở người được nêu trong SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự của SEQ ID NO: 2 được thể hiện trên Fig.2.

Ngoài ra, protein mà bao gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được thế, được làm khuyết và/hoặc được thêm vào trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được mô tả ở trên của B7-H3 và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của protein cũng bao gồm trong B7-H3.

Biến thể 1 của B7-H3 trưởng thành ở người từ trình tự tín hiệu đã được loại bỏ tương ứng với trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 27 đến 534 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, biến thể 2 của B7-H3 trưởng thành ở người từ trình tự tín hiệu đã được loại bỏ tương ứng với trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 27 đến 316 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

2. Sản xuất kháng thể kháng B7-H3

Kháng thể chống lại B7-H3 theo sáng chế có thể thu được bằng cách tạo miễn dịch con vật bằng B7-H3 hoặc polypeptit tùy ý được chọn từ trình tự axit amin của B7-H3, và thu gom và tinh chế kháng thể được sản xuất *in vivo* này theo quy trình chung. Các loài sinh học của B7-H3 được sử dụng làm kháng nguyên không bị giới hạn ở người, và động vật có thể được tạo miễn dịch bằng B7-H3 có nguồn gốc từ động vật khác người như chuột nhắt hoặc chuột cống. Trong trường hợp này, bằng cách xác định tính phản ứng chéo giữa kháng thể liên kết với B7-H3 khác loại đã thu được và B7-H3 ở người, kháng thể có thể áp dụng cho bệnh ở người có thể được chọn.

Ngoài ra, kháng thể đơn dòng có thể thu được từ tế bào lai được thiết lập bằng cách dung hợp các tế bào sản xuất kháng thể mà sản xuất ra kháng thể chống lại B7-H3 với các tế bào u tuỷ theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler and Milstein, *Nature*, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

B7-H3 được sử dụng làm kháng nguyên có thể thu được bằng cách biểu hiện gen B7-H3 trong tế bào vật chủ bằng cách sử dụng kỹ thuật thiết kế di truyền.

Cụ thể là, vector có khả năng biểu hiện gen B7-H3 được sản xuất, và vector tạo thành được chuyển nhiễm vào tế bào vật chủ để biểu hiện gen, và sau đó, B7-H3 đã biểu hiện được tinh chế. Dưới đây, phương pháp thu kháng thể chống lại B7-H3 được mô tả một cách cụ thể.

(1) Tạo ra kháng nguyên

Các ví dụ về kháng nguyên được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng B7-H3 gồm B7-H3, polypeptit gồm một phần trình tự axit amin có chứa ít nhất 6 axit amin liên ứng của B7-H3, và dẫn xuất thu được bằng cách bổ sung trình tự axit amin đã biết hoặc chất mang vào đó.

B7-H3 có thể được tinh chế trực tiếp từ các mô khối u của người hoặc các tế bào khối u của người và được sử dụng. Ngoài ra, B7-H3 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó *in vitro* hoặc bằng cách tạo ra nó trong tế bào vật chủ bằng kỹ thuật thiết kế di truyền.

Đối với kỹ thuật thiết kế di truyền, cụ thể là, sau khi cADN của B7-H3 được kết hợp vào vector có khả năng biểu hiện cADN của B7-H3, thì B7-H3 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch chứa enzym, cơ chất và chất năng lượng cần thiết để phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện B7-H3 trong tế bào vật chủ nhân sơ hoặc nhân thực được biến nạp.

Ngoài ra, kháng nguyên cũng có thể thu được dưới dạng protein bài tiết bằng cách biểu hiện protein dung hợp thu được bằng cách gắn miền ngoại bào của B7-H3, mà là protein màng, vào vùng hằng định của kháng thể trong hệ thống vector-vật chủ thích hợp.

cADN của B7-H3 có thể là thu được bằng, ví dụ, phương pháp gọi là phương pháp PCR trong đó phản ứng chuỗi polymeaza (dưới đây được gọi là "PCR") được thực hiện bằng cách sử dụng thư viện cADN biểu hiện cADN của B7-H3 dưới dạng mẫu và mỗi phóng đại đặc hiệu cADN của B7-H3 (xem Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489).

Ví dụ, hệ thống dịch mã nhanh (Rapid Translation System - RTS) được sản xuất bởi Roche Diagnostics, Inc. có thể được lấy làm ví dụ về phương pháp tổng hợp polypeptit *in vitro*, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Các ví dụ về các tế bào vật chủ nhân sơ gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*. Để biến nạp các tế bào vật chủ này bằng gen đích, thì tế bào vật chủ được biến nạp bằng vector plasmit có chứa đơn vị sao chép, tức là, nguồn gốc sao chép nhận được từ các loài tương hợp với vật chủ, và trình tự điều hòa. Ngoài ra, vector này tốt hơn là có trình tự có khả năng tiếp nhận tính chọn lọc kiểu hình trên tế bào được biến nạp.

Các ví dụ về tế bào vật chủ nhân thực gồm các tế bào của động vật có xương sống, các tế bào côn trùng, và các tế bào nấm men. Đối với các tế bào của động vật có xương sống, ví dụ, các tế bào COS ở khỉ (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), NIH3T3 nguyên bào sợi ở chuột (ATCC số CRL-1658), và chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) của các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61); và các tế bào tương tự thường được sử dụng, tuy nhiên, các tế bào không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Thế biến nạp thu được từ đó có thể được nuôi cấy theo quy trình chung, và bằng phương pháp nuôi cấy thế biến nạp, thì polypeptit đích được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào.

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

Protein tái tổ hợp được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào bằng thế biến nạp thông qua phương pháp nuôi cấy này có thể được tách riêng và được tinh chế bằng các phương pháp tách đã biết bất kỳ bằng cách sử dụng đặc tính vật lý hoặc hóa học của protein.

Các ví dụ cụ thể về các phương pháp bao gồm phương pháp xử lý bằng chất kết tủa protein phổ biến, phương pháp siêu lọc, các loại phương pháp sắc ký lỏng khác nhau như phương pháp sắc ký sàng phân tử (lọc gel), phương pháp sắc ký hấp phụ, phương pháp sắc ký trao đổi ion, và phương pháp sắc ký ái lực, phương pháp thẩm tách, và sự kết hợp của chúng.

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

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

(2) Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng kháng B7-H3

Ví dụ về kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 bao gồm kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với B7-H3, và phương pháp thu kháng thể như được mô tả dưới đây.

Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng thường cần đến các bước hoạt động dưới đây:

(a) tinh chế polyme sinh học được sử dụng làm kháng nguyên;

(b) tạo ra các tế bào sản xuất kháng thể bằng cách tạo miễn dịch cho động vật bằng cách tiêm kháng nguyên, thu gom máu, thử nghiệm độ chuẩn kháng thể của nó để xác định khi nào lá lách được cắt bỏ;

(c) tạo ra các tế bào u tuỷ (dưới đây được gọi là "u tuỷ");

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

(e) sàng lọc nhóm tế bào lai sản xuất ra kháng thể mong muốn;

(f) chia tách các tế bào lai thành các dòng vô tính tế bào đơn lẻ (tách dòng);

(g) tùy ý, nuôi cấy tế bào lai hoặc nuôi động vật đã được cấy tế bào lai để tạo ra một lượng lớn kháng thể đơn dòng;

(h) kiểm tra kháng thể đơn dòng thu được từ đó về hoạt tính sinh học và tính đặc hiệu liên kết, hoặc thử nghiệm kháng thể đó về các đặc tính dưới dạng chất phản ứng được đánh dấu; và các thao tác tương tự.

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

(a) Phương pháp tinh chế kháng nguyên

Đối với kháng nguyên, B7-H3 được điều chế bằng phương pháp như được mô tả ở trên hoặc một phần peptit của chúng có thể được sử dụng.

Ngoài ra, phần cắt màng được điều chế từ các tế bào tái tổ hợp biểu hiện B7-H3 hoặc các tế bào tái tổ hợp tự biểu hiện B7-H3, và cả một phần peptit của protein theo sáng chế được tổng hợp hóa học bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể được dùng làm kháng nguyên.

(b) Tạo ra các tế bào sản xuất kháng thể

Kháng nguyên thu được ở bước (a) được trộn với chất phụ trợ như chất phụ trợ hoàn thiện hoặc chưa hoàn thiện của Freund hoặc nhôm kali sulfat và hỗn hợp tạo thành được sử dụng làm chất kháng nguyên để tạo miễn dịch cho động vật thử nghiệm. Đối với động vật thử nghiệm, thì động vật bất kỳ được sử dụng trong phương pháp sản xuất tế bào lai đã biết có thể được sử dụng mà không có bất cứ vấn đề gì. Cụ thể, ví dụ, chuột

nhất, chuột cống, dê, cừu, bò sữa, ngựa, hoặc các loài tương tự có thể được sử dụng. Tuy nhiên, theo quan điểm về việc dễ có sẵn các tế bào u tủy sẽ được dung hợp với các tế bào sản xuất kháng thể được chiết, thì tốt hơn là chuột nhắt hoặc chuột cống được sử dụng làm động vật được tạo miễn dịch.

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

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

Trong số những loài này, xét về độ tương hợp khi dung hợp với các tế bào u tủy được mô tả dưới đây, thì trong trường hợp chuột nhắt, chủng BALB/c, và trong trường hợp chuột cống, các chủng Wistar và Low được ưu tiên đặc biệt để làm động vật được tạo miễn dịch.

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

Độ tuổi của chuột nhắt hoặc chuột cống ở thời điểm tạo miễn dịch tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn nữa nếu nằm tổng khoảng từ 6 đến 8 tuần tuổi.

Để tạo miễn dịch cho động vật bằng B7-H3 hoặc dạng tái tổ hợp của nó, ví dụ, phương pháp đã biết được mô tả chi tiết trong tài liệu, ví dụ, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng.

Trong số các phương pháp tạo miễn dịch này, thì phương pháp đặc trưng được ưu tiên theo sáng chế là, ví dụ, như dưới đây.

Tức là, trước tiên, phần cắt protein màng dùng làm kháng nguyên hoặc các tế bào được sử dụng để biểu hiện kháng nguyên được dùng cho động vật trong da hoặc trong màng bụng.

Tuy nhiên, sự kết hợp của cả hai đường dùng được ưu tiên để làm tăng hiệu quả tạo miễn dịch, và khi tiến hành sử dụng trong da ở một nửa thời gian đầu và tiến hành sử dụng trong màng bụng ở một nửa thời gian còn lại hoặc chỉ dùng ở liều dùng cuối cùng, thì hiệu tạo miễn dịch mới có thể tăng lên đáng kể.

Chế độ sử dụng kháng nguyên thay đổi tùy thuộc vào loài động vật được tạo miễn dịch, cá thể khác nhau hoặc các yếu tố tương tự. Tuy nhiên, nói chung, chế độ sử dụng trong đó tần suất sử dụng kháng nguyên là từ 3 đến 6 lần và khoảng cách dùng liều là 2 đến 6 tuần được ưu tiên, và chế độ sử dụng trong đó tần suất sử dụng kháng nguyên là từ 3 đến 4 lần và khoảng cách dùng liều là từ 2 đến 4 tuần được ưu tiên hơn.

Ngoài ra, liều dùng kháng nguyên thay đổi tùy thuộc vào loài động vật, cá thể khác nhau hoặc các yếu tố tương tự, tuy nhiên, liều dùng này thường được đặt nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5mg, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5mg.

Việc tạo miễn dịch tăng cường được thực hiện từ 1 đến 6 tuần, tốt hơn là từ 2 đến 4 tuần, tốt hơn nữa là từ 2 đến 3 tuần sau khi sử dụng kháng nguyên như được mô tả trên đây.

Liều dùng kháng nguyên tại thời điểm tiến hành tạo miễn dịch tăng cường thay đổi phụ thuộc vào loài hoặc kích thước của con vật hoặc yếu tố tương tự, tuy nhiên, trong trường hợp, ví dụ, chuột nhắt, thì liều dùng thường được đặt nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5mg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2mg.

Các tế bào lá lách hoặc tế bào lympho gồm các tế bào sản xuất kháng thể được loại bỏ vô trùng từ động vật đã tạo miễn dịch từ 1 đến 10 ngày, tốt hơn nếu là từ 2 đến 5 ngày, tốt hơn nữa nếu là từ 2 đến 3 ngày sau khi tạo miễn dịch tăng cường. Tại thời điểm này, độ chuẩn kháng thể được đo, và nếu động vật có độ chuẩn kháng thể tăng đủ

cao được sử dụng làm nguồn cung cấp các tế bào sản xuất kháng thể, thì quy trình tiếp theo có thể được thực hiện hiệu quả hơn.

Ví dụ về phương pháp xác định độ chuẩn kháng thể được sử dụng ở đây bao gồm phương pháp RIA và phương pháp ELISA, nhưng phương pháp này không bị giới hạn ở ví dụ này.

Ví dụ, nếu phương pháp ELISA được sử dụng, thì phép đo độ chuẩn kháng thể theo sáng chế có thể được tiến hành theo các phương pháp như được mô tả dưới đây.

Trước tiên, kháng nguyên đã được tinh chế hoặc được tinh chế một phần được hấp phụ vào bề mặt của pha rắn như đĩa 96 lỗ dùng trong phương pháp ELISA, và bề mặt của pha rắn không có kháng nguyên được hấp phụ trên đó được phủ bằng protein không liên quan tới kháng nguyên như albumin huyết thanh bò (dưới đây được gọi là "BSA"). Sau khi rửa bề mặt, bề mặt này được cho tiếp xúc với mẫu được pha loãng theo dãy (ví dụ, huyết thanh chuột nhắt) làm kháng thể sơ cấp để cho phép kháng thể trong mẫu này liên kết với kháng nguyên.

Ngoài ra, để làm kháng thể thứ cấp, kháng thể đã đánh dấu bằng enzym kháng kháng thể của chuột nhắt được bổ sung vào và được cho liên kết với kháng thể của chuột nhắt. Sau khi rửa, cơ chất dùng cho enzym được bổ sung vào và thay đổi về mức độ hấp phụ xảy ra do sự hiện màu gây ra bởi sự giảm cơ chất hoặc yếu tố tương tự được đo và độ chuẩn kháng thể được tính dựa trên số đo này.

Việc tách các tế bào sản xuất kháng thể từ các tế bào lá lách hoặc tế bào lympho của động vật được tạo miễn dịch có thể được tiến hành theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler et al., *Nature* (1975), 256, p. 495; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* (1977), 6, p. 511; Milstein et al., *Nature* (1977), 266, p. 550; Walsh, *Nature* (1977), 266, p. 495). Ví dụ, trong trường hợp các tế bào lá lách, thì phương pháp chung trong đó các tế bào sản xuất kháng thể được tách bằng cách đồng nhất hóa lá lách để thu được các tế bào bằng cách lọc bằng lưới thép không gỉ và tạo huyền phù các tế bào trong môi trường Eagle's Minimum Essential (MEM) có thể được sử dụng.

(c) Tạo ra các tế bào u tuỷ (dưới đây được gọi là "u tuỷ")

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

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

Các chủng tế bào này được nuôi cấy cấp hai trong môi trường thích hợp như môi trường 8-azaguanin [môi trường thu được bằng cách bổ sung 8-azaguanin vào môi trường RPMI 1640 đã bổ sung glutamin, 2-mercaptoetanol, gentamixin, và huyết thanh bào thai bê (dưới đây được gọi là "FCS")], Môi trường Iscove's Modified Dulbecco (dưới đây được gọi là "IMDM"), hoặc môi trường Dulbecco's Modified Eagle (dưới đây được gọi là "DMEM"). Trong trường hợp này, 3 đến 4 ngày trước khi thực hiện dung hợp tế bào, thì các tế bào được nuôi cấy cấp hai trong môi trường bình thường [ví dụ, môi trường ASF104 (được sản xuất bởi Ajinomoto Co., Ltd.) chứa FCS 10%] để đảm bảo lượng không thấp hơn 2×10^7 tế bào vào ngày dung hợp tế bào.

(d) Dung hợp tế bào

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

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

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

(e) Chọn lọc nhóm tế bào lai

Phương pháp chọn lọc tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào được mô tả trên đây không bị giới hạn cụ thể. Thường là, phương pháp chọn lọc HAT (hypoxanthin, aminopterin, thymidin) (Kohler et al., Nature (1975), 256, trang 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, trang 550) được sử dụng.

Phương pháp này hữu hiệu khi thu được các tế bào lai bằng cách sử dụng tế bào u tủy của chủng thiếu hụt HGPRT mà không thể sống sót khi có mặt aminopterin.

Tức là, bằng cách nuôi cấy tế bào không được dung hợp và tế bào lai trong môi trường HAT, thì chỉ có tế bào lai kháng aminopterin được cho phép sống sót và tăng sinh một cách chọn lọc.

(f) Phân chia dòng tế bào đơn lẻ (tách dòng)

Đối với phương pháp tách dòng dùng cho tế bào lai, phương pháp đã biết như phương pháp metyloxenuloza, phương pháp agaroza mềm, hoặc phương pháp pha loãng giới hạn có thể được sử dụng (xem trong tài liệu, ví dụ, Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Trong số các phương pháp này, đặc biệt là, phương pháp nuôi cấy ba chiều như phương pháp metyloxenuloza được ưu tiên. Ví dụ, nhóm tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào được tạo huyền phù trong môi trường metyloxenuloza như môi trường chọn lọc ClonaCell-HY D (được sản xuất bởi StemCell Technologies, Inc., #03804) và được nuôi cấy. Sau đó, các cụm tế bào lai đã được tạo ra này được thu gom lại, nhờ đó có thể thu được tế bào lai đơn dòng. Cụm tế bào lai tương ứng đã được thu gom được nuôi cấy, và tế bào lai đã được xác nhận là có độ chuẩn kháng thể ổn định trong dịch nuôi cấy tế bào lai nổi trên bề mặt thu được được chọn làm chủng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng B7-H3.

Ví dụ về chủng tế bào lai được tạo ra từ đó bao gồm tế bào lai M30 của B7-H3. Trong bản mô tả này, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai M30 của B7-H3 được gọi là "kháng thể M30" hoặc gọi tắt là "M30".

Chuỗi nặng của kháng thể M30 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, chuỗi nhẹ của kháng thể M30 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 471 là vùng hằng định. Ngoài ra, trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 22 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 23 đến 130 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 131 đến 235 là vùng hằng định.

(g) Tạo ra kháng thể đơn dòng bằng cách nuôi cấy tế bào lai

Bằng cách nuôi cấy tế bào lai được chọn lọc như vậy, có thể thu được kháng thể đơn dòng một cách hiệu quả. Tuy nhiên, trước khi nuôi cấy, tốt hơn là tiến hành sàng lọc tế bào lai mà sản sinh ra kháng thể đơn dòng đích.

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

Phép đo độ chuẩn kháng thể theo sáng chế có thể được tiến hành bằng, ví dụ, phương pháp ELISA được giải thích trong mục (b) được mô tả ở trên.

Tế bào lai thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên có thể được cất giữ ở trạng thái đông lạnh trong môi trường nitơ lỏng hoặc trong tủ lạnh ở nhiệt độ -80°C hoặc thấp hơn.

Sau khi kết thúc việc tách dòng, thay đổi môi trường từ môi trường HT thành môi trường thông thường, và nuôi cấy tế bào lai.

Tiến hành nuôi cấy phạm vi lớn bằng cách nuôi cấy xoay sử dụng bình nuôi cấy lớn hoặc bằng cách nuôi cấy quay. Từ dịch nổi trên bề mặt thu được bằng cách nuôi cấy phạm vi lớn, có thể thu được kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với protein theo sáng chế 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 phương pháp lọc gel.

Ngoài ra, tế bào lai được tiêm vào ổ bụng của chuột nhắt cùng chủng để làm tế bào lai (ví dụ, BALB/c được mô tả ở trên) hoặc chuột nhắt Nu/Nu để tăng sinh tế bào lai, nhờ đó có thể thu được cổ trướng chứa một lượng lớn kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Trong trường hợp mà tế bào lai được cấy trong ổ bụng, nếu dầu khoáng như 2,6,10,14-tetrametyl pentadecan (pristan) được cấy vào trong đó từ 3 đến 7 ngày trước đó, thì có thể thu được một lượng lớn cổ trướng.

Ví dụ, chất ức chế miễn dịch được tiêm trước vào ổ bụng của chuột nhắt cùng chủng dưới dạng tế bào lai để không hoạt hóa các tế bào T. 20 ngày sau đó, 10^6 đến 10^7 tế bào dòng bào lai được tạo hỗn dịch trong môi trường không có huyết thanh (0,5ml), và hỗn dịch này được cấy trong ổ bụng của chuột nhắt. Nói chung, khi bụng được nong rộng và làm đầy bằng cổ trướng, thì cổ trướng được gom từ chuột nhắt. Bằng phương

pháp này, có thể thu được kháng thể đơn dòng ở nồng độ gấp khoảng 100 lần hoặc cao hơn nhiều so với nồng độ trong dung dịch nuôi cấy.

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

Kháng thể đơn dòng thu được như vậy có tính đặc hiệu kháng nguyên cao đối với B7-H3.

(h) Thử nghiệm về kháng thể đơn dòng

Lớp kháng thể và phân lớp của kháng thể đơn dòng thu được như vậy có thể được xác định như sau.

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

Phương pháp Ouchterlony đơn giản, nhưng nếu nồng độ của kháng thể đơn dòng thấp, thì cần phải tiến hành ngưng tụ.

Mặt khác, nếu phương pháp ELISA hoặc phương pháp RIA được sử dụng, bằng cách cho dịch nuôi cấy nổi trên bề mặt phản ứng trực tiếp với pha rắn hấp thu kháng nguyên và sử dụng kháng thể tương ứng với các dạng khác nhau của lớp kháng thể và các phân lớp của globulin miễn dịch làm kháng thể thứ cấp, thì có thể nhận biết được lớp kháng thể và phân lớp của kháng thể đơn dòng.

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

Ngoài ra, việc xác định số lượng protein có thể được tiến hành bằng phương pháp Folin Lowry và phương pháp tính toán dựa trên cơ sở độ hấp phụ ở 280nm [$1,4 (OD_{280}) = \text{globulin miễn dịch } 1\text{mg/ml}$].

Ngoài ra, ngay cả khi kháng thể đơn dòng thu được một cách riêng rẽ và độc lập bằng cách tiến hành lại các bước từ (a) đến (h) trong mục (2), thì vẫn có thể thu được

kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể M30. Kháng thể mà liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30 có thể được lấy làm một ví dụ về kháng thể này. M30 nhận diện epitop trong miền IgC1 hoặc IgC2, mà là miền trong miền ngoại bào B7-H3, và liên kết với miền IgC1 hoặc miền IgC2 hoặc cả hai. Do đó, cụ thể là, epitop có mặt trong miền IgC1 hoặc IgC2 của B7-H3 có thể được lấy làm ví dụ về epitop đối với kháng thể theo sáng chế. Nếu kháng thể đơn dòng mới được sản sinh liên kết với peptit một phần hoặc cấu trúc bậc ba một phần mà kháng thể M30 liên kết, thì có thể xác định được rằng kháng thể đơn dòng này liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30. Ngoài ra, bằng cách xác nhận rằng kháng thể đơn dòng cạnh tranh với kháng thể M30 để liên kết với B7-H3 (tức là, kháng thể đơn dòng ức chế liên kết giữa kháng thể M30 và B7-H3), thì có thể xác định được rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30 ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc epitop đặc hiệu chưa được xác định. Khi xác nhận được rằng kháng thể đơn dòng liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30, thì rất mong muốn là kháng thể đơn dòng này có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể M30.

(3) Kháng thể khác

Kháng thể theo sáng chế không những bao gồm kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 được mô tả ở trên mà còn bao gồm kháng thể tái tổ hợp thu được bằng cách cải biến nhân tạo nhằm mục đích làm giảm tính kháng nguyên khác loại đối với người như kháng thể dạng thể khảm, kháng thể được biến đổi giống như của người và kháng thể người. Các kháng thể này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đã biết.

Kháng thể mà vùng biến đổi và hằng định kháng thể thu được từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể dạng thể khảm mà vùng biến đổi kháng thể có nguồn gốc từ chuột nhắt hoặc chuột cống được nối với vùng hằng định kháng thể có nguồn gốc từ người có thể được lấy làm ví dụ về kháng thể dạng thể khảm (xem Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

Kháng thể thu được bằng cách chỉ hợp nhất vùng quyết định bổ thể (complementarity determining region - CDR) vào kháng thể có nguồn gốc từ người (xem Nature (1986) 321, trang 522-525), và kháng thể thu được bằng cách ghép một

phần của các gốc axit amin của khung làm việc cũng như trình tự CDR với kháng thể người bằng phương pháp ghép CDR (WO 90/07861) có thể được lấy làm ví dụ về kháng thể được biến đổi giống như của người.

Tuy nhiên, kháng thể được biến đổi giống như của người thu được từ kháng thể M30 không bị giới hạn ở kháng thể được biến đổi giống như của người đặc hiệu miễn là kháng thể được biến đổi giống như của người này có tất cả 6 dạng trình tự CDR của kháng thể M30 và có hoạt tính kháng khối u. Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể M30 có CDRH1 (NYVMH) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, CDRH2 (YINPYNDDVKYNEKFKG) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự, và CDRH3 (WGYYGSPLYFYFDY) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể M30 có CDRL1 (RASSRLIYMH) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, CDRL2 (ATSNLAS) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7 trong danh mục trình tự, và CDRL3 (QQWNSNPPT) bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 trong danh mục trình tự.

Là ví dụ về kháng thể được biến đổi giống như của người của kháng thể M30 của chuột nhắt, tổ hợp tùy ý của chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự bất kỳ trong số (1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của các SEQ ID NO: 9, 10, 11, hoặc 12 trong danh mục trình tự, (2) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc hơn 95% so với trình tự axit amin (1) được mô tả trên đây, và (3) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin trong trình tự axit amin (1) được mô tả trên đây được làm khuyết, được thay thế hoặc được thêm vào và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự bất kỳ trong số (4) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của các SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, hoặc 19 trong danh mục trình tự, (5) trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 95% hoặc hơn 95% so với trình tự axit amin (4) được mô tả trên đây, và (6) trình tự axit amin trong đó một hoặc một vài axit amin trong trình tự axit amin (4) được mô tả trên đây được làm khuyết, được thay thế hoặc được thêm vào có thể được lấy làm ví dụ.

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

Đối với đột biến thay thế axit amin trong bản mô tả này, thì đột biến thay thế axit amin bảo toàn được ưu tiên. Đột biến thay thế axit amin bảo toàn đề cập đến đột biến thay thế xảy ra trong nhóm axit amin liên quan tới chuỗi bên axit amin. 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, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, và tryptophan); và nhóm phân cực không tích điện (glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, và tyrosin). Nhóm axit amin được ưu tiên hơn là như sau: nhóm hydroxy béo (serin và threonin); nhóm chứa amit (asparagin và glutamin); nhóm béo (alanin, valin, leuxin, và isoleuxin); và nhóm thơm (phenylalanin, tryptophan, và tyrosin). Đột biến thay thế axit amin như vậy tốt hơn là được tiến hành trong phạm vi mà không làm giảm 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 được mô tả ở trên, kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 13; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 14; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 15; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 16; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm

trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 17; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 18; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 19; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 13; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 14; kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 15; và kháng thể bao gồm chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 của SEQ ID NO: 16 có thể được lấy làm ví dụ.

Ngoài ra, đối với kháng thể có tổ hợp được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả ở trên, kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 13; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 14; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO:

15; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 16; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 17; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 18; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 19; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 13; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 14; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 15; và kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 471 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 233 của SEQ ID NO: 16 có thể được lấy làm ví dụ.

Hơn nữa, đối với kháng thể có một tổ hợp khác cũng được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả ở trên, kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ

bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14; kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15; và kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 có thể được lấy làm ví dụ.

Bằng cách kết hợp trình tự có độ tương đồng cao so với trình tự axit amin của chuỗi nặng được mô tả ở trên với trình tự có tính tương đồng cao với trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được mô tả trên đây, có thể chọn kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính gây độc tế bào của mỗi trong các kháng thể được mô tả ở trên. Độ tương đồng này thường là độ tương đồng lớn hơn hoặc bằng 80%, tốt hơn nếu độ tương đồng này lớn hơn hoặc bằng 90%, tốt hơn nữa nếu độ tương đồng này lớn hơn hoặc bằng 95%, tốt nhất là độ tương đồng này lớn hơn hoặc bằng 99%. Ngoài ra, bằng cách kết hợp trình tự axit amin mà trong đó một đến một vài gốc axit amin được thay thế, làm khuyết hoặc thêm vào trong trình tự axit amin của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, thì cũng có thể chọn kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính gây độc tế bào của mỗi trong số các kháng thể được mô tả ở trên.

Độ 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. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, và David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Thuật toán Blast cũng có thể được sử dụng qua Internet bằng cách truy cập vào trang www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.

Trong trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 9, 10, 11 hoặc 12 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 141 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 142 đến 471 là vùng hằng định. Trình tự của SEQ ID NO: 9, 10, 11 và 12 lần lượt được thể hiện trên Fig.3, Fig.4, Fig.5 và Fig.6.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19 trong danh mục trình tự, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 128 là vùng biến đổi, và trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 129 đến 233 là vùng hằng định. Trình tự của SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18 và 19 lần lượt được thể hiện trên Fig.7, Fig.8, Fig.9, Fig.10, Fig.11, Fig.12 và Fig.13.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể người mà liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30. Kháng thể kháng B7-H3 của người đề cập đến kháng thể người chỉ có trình tự của kháng thể thu được từ nhiễm sắc thể của người. Có thể thu được kháng thể kháng B7-H3 của người theo phương pháp sử dụng chuột nhắt sản sinh kháng thể người có đoạn nhiễm sắc thể của người có chứa gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người (xem Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics* (1997) 16, trang 133-143; Kuroiwa, Y. et al., *Nucl. Acids Res.* (1998) 26, trang 3447-3448; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* vol. 10, trang 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, trang 722-727, v.v.).

Chuột nhắt sản sinh kháng thể người này có thể được tạo ra một cách đặc hiệu như sau. Động vật được cải biến di truyền, trong đó locus gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch nội sinh đã được phá vỡ, và thay vào đó, locus gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch của người được đưa vào qua vector nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (yeast artificial chromosome - YAC) hoặc dạng tương tự được tạo ra bằng cách tạo ra động vật bất hoạt gen và động vật chuyển gen và cho các động vật này giao cấu với nhau.

Ngoài ra, theo kỹ thuật tái tổ hợp ADN, bằng cách sử dụng cADN mã hóa từng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như vậy của kháng thể người, và tốt hơn là vectơ có chứa cADN như vậy, các tế bào nhân thực được biến nạp, và tế bào biến nạp mà tạo ra kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người được nuôi cấy, nhờ đó cũng có thể thu được kháng thể từ dịch nuôi cấy nổi trên bề mặt.

Ở đây, đối với vật chủ, ví dụ, các tế bào nhân thực, tốt hơn nếu là các tế bào của động vật có vú như các tế bào CHO, các tế bào lympho, hoặc các tế bào u tủy có thể được sử dụng.

Ngoài ra, phương pháp thu được kháng thể người thu được bằng cách hiển thị thực khuẩn thể được chọn từ thư viện kháng thể người (xem Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), trang 2301-2308; Carmen, S. et al., *Briefings In Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), trang 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology* (2002) 109 (3), trang 427-431, v.v.) cũng đã được biết.

Ví dụ, phương pháp hiển thị thực khuẩn thể, trong đó vùng biến đổi của kháng thể người được biểu hiện trên bề mặt của thực khuẩn thể như là kháng thể chuỗi đơn (scFv), và thực khuẩn thể mà liên kết với kháng nguyên được chọn (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), trang 1105-1116) có thể được sử dụng.

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

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

Nếu kháng thể người mới được tạo ra liên kết với peptit một phần hoặc cấu trúc bậc ba một phần mà kháng thể M30 liên kết với, thì có thể xác định được rằng, kháng

thể người liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30. Ngoài ra, bằng cách xác nhận rằng kháng thể người cạnh tranh với kháng thể M30 để liên kết với B7-H3 (tức là, kháng thể người ức chế liên kết giữa kháng thể M30 và B7-H3), thì có thể xác định được rằng kháng thể người này liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30 ngay cả khi trình tự hoặc cấu trúc epitop đặc hiệu không được xác định. Khi xác nhận được rằng kháng thể người liên kết với cùng epitop giống như kháng thể M30, thì rất mong đợi là kháng thể người này có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể M30.

Kháng thể có dạng thể khảm, kháng thể được biến đổi giống như của người, hoặc kháng thể người thu được theo phương pháp được mô tả ở trên được đánh giá về tính liên kết với kháng nguyên bằng phương pháp đã biết hoặc phương pháp tương tự, và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn.

Có thể lấy độ ổn định của kháng thể để làm ví dụ về một chỉ số khác dùng để so sánh các tính chất của kháng thể. Nhiệt kế lượng quét vi sai (Differential scanning calorimetry - DSC) là thiết bị có khả năng đo nhanh và chính xác nhiệt độ biến tính trung bình do nhiệt (T_m) được dùng làm chỉ số thích hợp về tính ổn định hình dáng tương đối của các protein. Bằng cách đo các trị số T_m bằng cách sử dụng DSC và so sánh các trị số này, có thể so sánh được mức độ chênh lệch về độ ổn định nhiệt. Đã biết rằng, độ ổn định lưu giữ của kháng thể thể hiện một số tương quan với tính ổn định nhiệt của kháng thể (Lori Burton, et al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, trang 265-273), và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn bằng cách sử dụng độ ổn định nhiệt làm chỉ số. Ví dụ về các chỉ số khác để chọn kháng thể bao gồm các dấu hiệu sau: hiệu suất trong tế bào vật chủ thích hợp là cao; và khả năng kết tụ trong dung dịch nước là thấp. Ví dụ, kháng thể mà thể hiện hiệu suất cao nhất không phải lúc nào cũng thể hiện tính ổn định nhiệt cao nhất, và do đó, cần phải chọn kháng thể thích hợp nhất để sử dụng cho người bằng cách tiến hành đánh giá toàn diện dựa trên các chỉ số được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng bao gồm biến thể được cải biến của kháng thể. Biến thể được cải biến đề cập đến biến thể thu được bằng cách cho kháng thể theo sáng chế cải biến hóa học hoặc sinh học. Ví dụ về biến thể được cải biến hóa học bao gồm các biến thể được

cải biến về mặt hóa học bằng cách liên kết gốc hóa học với khung axit amin, các biến thể được cải biến về mặt hóa học với mạch carbohydrat liên kết với N hoặc O, v.v.. Ví dụ về biến thể được cải biến về mặt sinh học bao gồm các biến thể thu được bằng cách cải biến sau dịch mã (như glycosyl hoá liên kết với N hoặc O, xử lý đầu tận N hoặc C, khử amin hóa, đồng phân hóa axit aspartic, hoặc oxy hóa metionin), và các biến thể mà trong đó gốc metionin được bổ sung vào đầu tận N bằng cách biểu hiện trong tế bào vật chủ nhân sơ.

Ngoài ra, kháng thể được đánh dấu để có thể phát hiện hoặc phân lập kháng thể hoặc kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ, kháng thể được đánh dấu bằng enzym, kháng thể được đánh dấu bằng huỳnh quang, và kháng thể được đánh dấu bằng ái lực cũng nằm trong phạm vi ý nghĩa biến thể được cải biến. Biến thể được cải biến của kháng thể theo sáng chế này hữu ích để cải thiện độ ổn định và cảm máu của kháng thể gốc theo sáng chế, làm giảm tính kháng nguyên của chúng, phát hiện hoặc phân lập kháng thể như vậy hoặc kháng nguyên, và v.v..

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

Trong trường hợp mà kháng thể được tạo ra trước tiên bằng cách phân lập gen kháng thể và sau đó đưa gen này vào vật chủ thích hợp, tổ hợp của vật chủ thích hợp và vectơ biểu hiện thích hợp có thể được sử dụng. Ví dụ cụ thể về gen kháng thể bao gồm tổ hợp của gen mã hóa trình tự chuỗi nặng của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và gen mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của nó. Khi tế bào vật chủ được biến nạp, có thể thêm gen trình tự chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ vào cùng một vectơ biểu hiện, và cũng có thể vào các vectơ biểu hiện khác nhau một cách riêng rẽ.

Trong trường hợp mà các tế bào nhân thực được sử dụng làm vật chủ, thì các tế bào động vật, các tế bào thực vật, và vi sinh vật nhân thực có thể được sử dụng. Đối với các tế bào động vật, các tế bào động vật có vú, ví dụ, các tế bào COS của khí

(Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, trang 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi NIH3T3 của chuột (ATCC số CRL-1658), và chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, trang 4126-4220) của tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO; ATCC: CCL-61) có thể được lấy làm ví dụ.

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

Bằng cách đưa gen kháng thể mong muốn vào các tế bào này bằng cách biến nạp, và nuôi cấy các tế bào đã được biến nạp như vậy *in vitro*, có thể thu được kháng thể. Trong phương pháp nuôi cấy được mô tả ở trên, đôi khi hiệu suất có thể thay đổi tùy thuộc vào trình tự của kháng thể, và do đó, có thể chọn kháng thể mà dễ dàng sản xuất được dưới dạng thuốc bằng cách sử dụng hiệu suất làm chỉ số trong các kháng thể có hoạt tính liên kết tương đối. Do đó, trong kháng thể theo sáng chế, kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể, khác biệt ở chỗ, bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ được biến nạp và bước gom kháng thể mong muốn từ sản phẩm được nuôi cấy thu được trong bước nuôi cấy cũng được bao gồm.

Đã biết là gốc lysin ở đầu tận carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được sản xuất trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy được làm khuyết (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), và cũng đã biết là hai gốc axit amin (glyxin và lysin) ở đầu tận carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được sản xuất trong tế bào động vật có vú đã được nuôi cấy được làm khuyết và gốc prolin mới được đặt ở đầu tận carboxyl được amit hóa (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Tuy nhiên, việc làm khuyết và cải biến này ở trình tự chuỗi nặng không tác động tới ái lực liên kết kháng nguyên và chức năng tác động (sự hoạt hóa của bổ thể, tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể, v.v.) của kháng thể. Do đó, kháng thể được cho cải biến như vậy cũng được bao gồm trong sáng chế, và biến thể làm khuyết trong đó một hoặc hai axit amin được làm khuyết ở đầu tận carboxyl của chuỗi nặng, biến thể thu được bằng cách amit hóa biến thể làm khuyết (ví dụ, chuỗi nặng mà gốc prolin có đầu tận carboxyl được amit hóa), và dạng tương tự có thể được lấy làm ví dụ. Dạng biến thể làm khuyết có sự khuyết ở đầu tận carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế không bị giới

hạn ở các biến thể trên đây miễn là ái lực liên kết kháng nguyên và chức năng tác động được bảo toàn. Hai chuỗi nặng cấu thành kháng thể theo sáng chế có thể là một dạng được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và biến thể làm khuyết được mô tả ở trên, hoặc có thể là hai dạng kết hợp được chọn từ đó. Tỷ lệ về lượng mỗi biến thể làm khuyết có thể bị ảnh hưởng bởi dạng tế bào động vật có vú được nuôi cấy mà tạo ra kháng thể theo sáng chế và các điều kiện nuôi cấy, tuy nhiên, trường hợp mà một gốc axit amin ở đầu tận carboxyl được làm khuyết trong cả hai chuỗi nặng chứa để làm các hợp phần chính trong kháng thể theo sáng chế có thể được lấy làm ví dụ.

Đối với lớp kháng thể của kháng thể theo sáng chế, ví dụ, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) có thể được lấy làm ví dụ, và IgG1 hoặc IgG2 có thể được lấy làm ví dụ ưu tiên.

Đối với chức năng của kháng thể, nói chung là hoạt tính liên kết kháng nguyên, hoạt tính trung hòa hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính tăng cường hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) và hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC) có thể được lấy làm ví dụ. Chức năng của kháng thể theo sáng chế là hoạt tính liên kết với B7-H3, tốt hơn là hoạt tính thực bào được điều tiết bởi tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), tốt hơn nữa là hoạt tính gây độc tế bào (hoạt tính kháng khối u) với tế bào khối u được điều tiết bởi hoạt tính ADCP. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể có hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC ngoài hoạt tính ADCP.

Kháng thể thu được có thể được tinh chế đến đồng nhất. Việc tách và tinh chế kháng thể có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp tách protetin và tinh chế thông thường. Ví dụ, kháng thể có thể được tách và tinh chế bằng cách chọn và kết hợp một cách thích hợp phương pháp sắc ký cột, phương pháp lọc bằng thiết bị lọc, phương pháp siêu lọc, phương pháp kết tủa muối, phương pháp thẩm tách, phương pháp điện di trên gel polyacrylamit điều chế, phương pháp điện di hội tụ trên điểm đẳng điện, và phương pháp tương tự (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibody: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), nhưng phương pháp như vậy không bị giới hạn ở đó.

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

Phương pháp sắc ký này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Đối với cột được sử dụng trong phương pháp sắc ký ái lực, thì cột protein A và cột protein G có thể được lấy làm ví dụ. Ví dụ, đối với cột sử dụng cột protein A, thì Hyper D, POROS, Sepharosa FF (Pharmacia) và dạng tương tự có thể được lấy làm ví dụ.

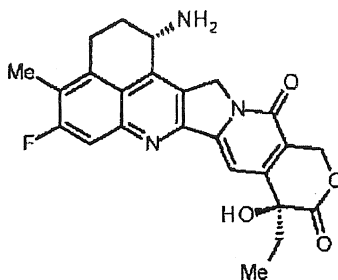
Ngoài ra, bằng cách sử dụng chất mang có kháng nguyên được làm bất động trên đó, kháng thể cũng có thể được tinh chế bằng cách sử dụng tính chất liên kết của kháng thể với kháng nguyên.

Hợp chất kháng khối u

Hợp chất kháng khối u được liên hợp với thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế được giải thích. Hợp chất kháng khối u không bị giới hạn cụ thể nếu nó là hợp chất có tác dụng kháng khối u và nhóm thể hoặc cấu trúc một phần cho phép liên kết với cấu trúc liên kết. Khi một phần hoặc toàn bộ liên kết được tách trong các tế bào khối u, thì gốc hợp chất kháng khối u được giải phóng để thể hiện tác dụng kháng khối u của hợp chất kháng khối u. Do liên kết được tách ở vị trí nối với thuốc, nên hợp chất kháng khối u được giải phóng trong cấu trúc ở bên trong của nó để thể hiện tác dụng kháng khối u bên trong của nó.

Các ví dụ về hợp chất kháng khối u có thể bao gồm doxorubixin, daunorubixin, mitomycin C, bleomycin, cycloxytidin, vincristin, vinblastin, metotrexat, chất kháng khối u dựa trên platin (cisplatin hoặc dẫn xuất của chúng), taxol hoặc dẫn xuất của chúng, và camptotecin hoặc dẫn xuất của chúng (chất kháng khối u được mô tả trong Công bố xin cấp patent Nhật Bản số 6-87746). Trong thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế, tốt hơn là có thể sử dụng exatecan để làm dẫn xuất camptotecin (((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)-dione; được thể hiện trong Công thức sau).

Công thức 43



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

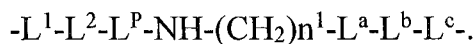
Đối với thể liên hợp kháng thể-thuốc, số lượng phân tử thuốc được liên hợp trong mỗi phân tử kháng thể là yếu tố chính có ảnh hưởng đến độ hiệu nghiệm và độ an toàn. Việc sản xuất thể liên hợp kháng thể-thuốc được tiến hành bằng cách xác định điều kiện phản ứng bao gồm lượng nguyên liệu thô và chất phản ứng cần dùng cho phản ứng để có số lượng phân tử thuốc được liên hợp không đổi, hỗn hợp chứa số lượng phân tử thuốc được liên hợp khác nhau thường thu được khác với phản ứng hóa học của hợp chất có phân tử lượng thấp. Số lượng thuốc được liên hợp trong phân tử kháng thể được biểu hiện hoặc cụ thể hóa bằng trị số trung bình, tức là, số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình. Trừ khi có quy định khác, số lượng phân tử thuốc được liên hợp nghĩa có nghĩa là trị số trung bình ngoại trừ trong trường hợp mà nó biểu thị thể liên hợp kháng thể-thuốc có số lượng phân tử thuốc được liên hợp cụ thể có trong hỗn hợp thể liên hợp kháng thể-thuốc có số lượng phân tử thuốc được liên hợp khác nhau. Số lượng phân tử exatecan được liên hợp với phân tử kháng thể là kiểm soát được, và làm số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình trong mỗi kháng thể, khoảng từ 1 đến 10 exatecan có thể được liên kết. Tốt hơn là, từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa là 3 đến 8. Trong khi đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể thiết kế phản ứng để liên hợp số lượng phân tử thuốc được yêu cầu với phân tử kháng thể dựa trên phần mô tả về Ví

dự thực hiện sáng chế và có thể thu được kháng thể được liên hợp với số lượng phân tử exatecan được kiểm soát.

Do exatecan có cấu trúc camptotecin, nên biết được rằng tính cân bằng chuyển sang cấu trúc với vòng lacton kín (vòng kín) trong môi trường axit nước (ví dụ, độ pH = 3 hoặc độ pH tương tự) nhưng nó chuyển sang cấu trúc với vòng lacton hở (vòng hở) trong môi trường bazơ nước (ví dụ, độ pH = 10 hoặc độ pH tương tự). Thể liên hợp thuốc được đưa gốc exatecan tương ứng với cấu trúc vòng kín và cấu trúc vòng hở vào cũng được mong đợi là có cùng tác dụng kháng khối u và không cần phải nói rằng, cấu trúc bất kỳ trong số chúng là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cấu trúc chất liên kết

Đối với thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế, cấu trúc chất liên kết để liên hợp thuốc kháng khối u với kháng thể được giải thích. Chất liên kết này có cấu trúc sau:

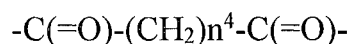
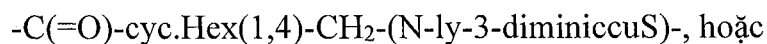
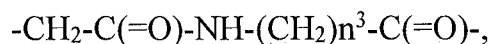
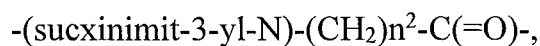


Kháng thể được nối với đầu tận của L^1 (đầu tận đối diện để nối với L^2), và thuốc kháng khối u được nối với đầu tận của L^c (đầu tận đối diện để nối với L^b).

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

1. L^1

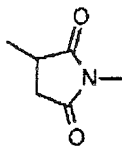
L^1 là gốc trong chất liên kết được thể hiện bằng cấu trúc sau:



Trong các cấu trúc nêu trên, n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8, n^3 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, và n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

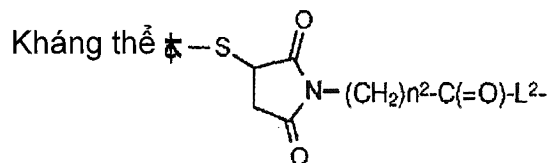
Trong chất liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ của L^1 , " $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-$ " có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 44



Vị trí 3 của cấu trúc một phần trên đây là vị trí nối với kháng thể. Liên kết với kháng thể ở vị trí 3, khác biệt ở chỗ, liên kết này có sự tạo thành thioete. Mặt khác, nguyên tử nitơ ở vị trí 1 của gốc cấu trúc được nối với nguyên tử cacbon của metylen mà có trong chất liên kết bao gồm cấu trúc này. Đặc biệt, $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-$ là cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau (ở đây, "kháng thể-S-" xuất phát từ kháng thể).

Công thức 45



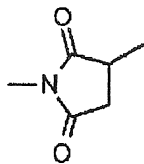
Trong công thức này, n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8, và tốt hơn là từ 2 đến 5.

Trong chất liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-$ của L^1 , n^3 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 6. Chất liên kết này được nối với kháng thể ở nguyên tử cacbon của nó của metylen tận cùng và có cấu trúc sau để nối bằng cách tạo ra thioete, như với chất liên kết trước đó (ở đây, "kháng thể-S-" xuất phát từ kháng thể).

Kháng thể-S- $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-\text{L}^2-$.

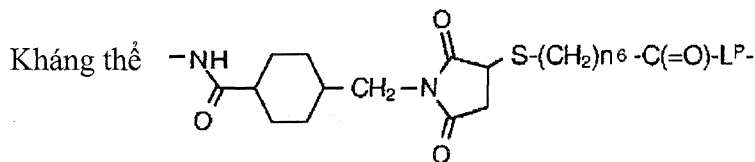
Trong chất liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$ của L^1 , " $-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$ " có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 46



Trong gốc cấu trúc này, nguyên tử nitơ ở vị trí 1 được nối với nguyên tử cacbon của metylen có mặt trong cấu trúc chất liên kết chứa cấu trúc này. Nguyên tử cacbon ở vị trí 3 được nối với nguyên tử lưu huỳnh tận cùng của $-S-(CH_2)_n-C(=O)-$ của L^2 trong chất liên kết. Gốc $-S-(CH_2)_n-C(=O)-$ này của L^2 trong chất liên kết tạo ra cấu trúc chất liên kết được kết hợp chỉ có $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$ của L^1 trong chất liên kết. Trong cấu trúc trên đây, "-cyc.Hex(1,4)-" có trong chất liên kết là nhóm 1,4-xyclohexylen. Trong chất liên kết này, $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$ được nối với kháng thể có tạo ra liên kết amit ở cacbonyl cacbon tận cùng của nó (ở đây, "kháng thể-NH-" xuất phát từ kháng thể).

Công thức 47



Nhóm amino của kháng thể để tạo ra liên kết amit này là nhóm amino tận cùng của chuỗi bên của gốc lysin trong kháng thể hoặc nhóm amino ở đầu tận N của kháng thể. Chất liên kết có cấu trúc này có thể nối bằng cách tạo ra liên kết este với nhóm hydroxy của axit amin trong kháng thể khác với liên kết amit như vậy.

Gốc cấu trúc "-cyc.Hex(1,4)-" có trong liên kết này có thể là nhóm alkylen vòng no có hoá trị hai khác với nhóm 1,4-xyclohexylen, tức là nhóm hydrocacbon vòng no có hoá trị hai như nhóm xyclobutylen, nhóm xyclopentylen, nhóm xycloheptalen, hoặc nhóm xyclooctalen, nhóm hydrocacbon thơm có hoá trị hai như nhóm phenylen hoặc nhóm naphtylen, hoặc nhóm dị vòng có 5 hoặc 6 cạnh no, no một phần, hoặc thơm có hoá trị hai chứa 1 hoặc 2 nguyên tử khác loại. Theo cách khác, gốc này có thể là nhóm alkylen có hoá trị hai có 1 đến 4 nguyên tử cacbon. Việc nối với nhóm có hoá trị hai có thể xảy ra ở các vị trí liền kề hoặc ở vị trí xa.

Trong chất liên kết có cấu trúc được thể hiện bằng $-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-$ để làm L^1 , n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 6. Chất liên kết này cũng được nối bằng cách tạo ra liên kết amit ở nhóm cacbonyl tận cùng của nó với nhóm amino của kháng thể, như với các chất liên kết đã được đề cập ở trên (xem công thức sau; trong cấu trúc của chúng, "kháng thể-NH-" xuất phát từ kháng thể).

Kháng thể-NH- $C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-L^2-$.

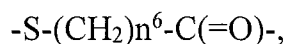
Các ví dụ cụ thể về L^1 trong chất liên kết có thể bao gồm

$-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{CH}_2\text{C}(=O)\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$,
 $-\text{CH}_2\text{C}(=O)\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{CH}_2\text{C}(=O)\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{CH}_2\text{C}(=O)\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{CH}_2\text{C}(=O)\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{C}(=O)-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$
 $-\text{C}(=O)-\text{Aryl}-\text{CH}_2-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$
 $-\text{C}(=O)-\text{cyc.Het}-\text{CH}_2-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$
 $-\text{C}(=O)-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{C}(=O)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{C}(=O)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{C}(=O)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$
 $-\text{C}(=O)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=O)-$.

(Aryl là nhóm hydrocacbon thơm có hoá trị hai, và cyc.Het là nhóm vòng dị vòng có hoá trị hai).

2. L^2

L^2 là chất liên kết được thể hiện bằng cấu trúc sau:

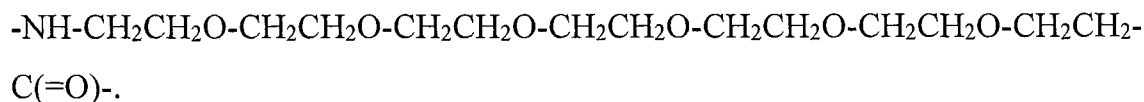
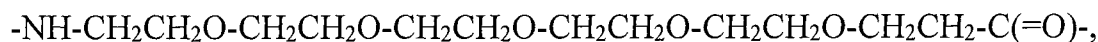
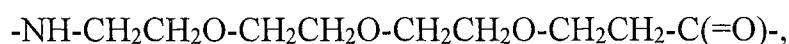
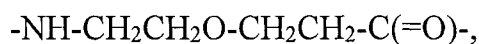


L^2 có thể không có mặt, và trong trường hợp như vậy, L^2 là liên kết đơn. Trong cấu trúc trên đây, n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, và n^6 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6.

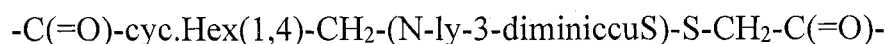
Trong chất liên kết có cấu trúc là $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})n^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ để làm L^2 , n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 4. Gốc này trong chất liên kết được nối với L^1 ở nhóm amino tận cùng của nó và được nối với L^P ở nhóm cacbonyl của nó ở đầu tận còn lại.

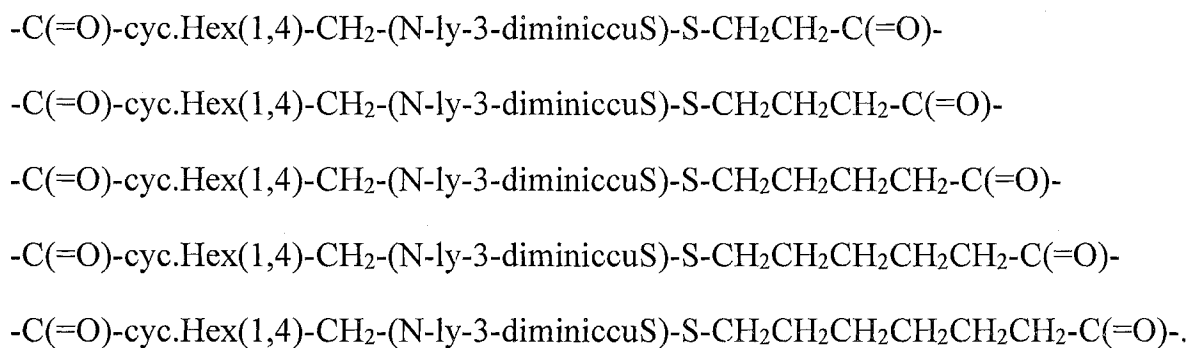
Trong chất liên kết có cấu trúc là $-\text{S}-(\text{CH}_2)n^6-\text{C}(=\text{O})-$ để làm L^2 , n^6 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 4.

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



Nếu L^2 là $-\text{S}-(\text{CH}_2)n^6-\text{C}(=\text{O})-$, thì L^1 cần kết hợp với nó là $-\text{C}(=\text{O})-\text{cyc.Hex}(1,4)-\text{CH}_2-(\text{N-ly-3-diminiccuS})-$. Các ví dụ cụ thể về $-L^1-L^2-$ có thể bao gồm





3. L^P

Chất liên kết L^P là gốc peptit bao gồm từ 2 đến 7 axit amin. Đặc biệt, nó bao gồm gốc oligopeptit trong đó 2 đến 6 axit amin được liên kết bằng liên kết peptit. Chất liên kết L^P được nối với L² ở đầu tận N của nó và được nối với nhóm amino của gốc -NH-(CH₂)^{n¹}-L^a-L^b-L^c- của chất liên kết ở đầu tận C của nó. Axit amin cấu thành L^P trong chất liên kết không bị giới hạn cụ thể, tuy nhiên, ví dụ về chúng bao gồm axit amin L hoặc D, tốt hơn là axit amin L. Và, nó có thể là axit amin có cấu trúc như β-alanin, axit ε-aminocaproic, hoặc axit γ-aminobutyric ngoài axit α-amin, ngoài ra, nó có thể là axit amin dạng không tự nhiên như axit amin được metyl hóa bằng N.

Trình tự axit amin của L^P không bị giới hạn cụ thể, mà các ví dụ về axit amin cấu thành bao gồm phenylalanin (Phe; F), tyrosin (Tyr; Y), leuxin (Leu; L), glyxin (Gly; G), alanin (Ala; A), valin (Val; V), lysin (Lys; K), xitrulin (Cit), serin (Ser; S), axit glutamic (Glu; E), và axit aspartic (Asp; D). Trong số đó, các ví dụ được ưu tiên bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrulin, serin, axit glutamic, và axit aspartic. Tùy thuộc vào loại axit amin, mô hình 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 về L^P có thể bao gồm



-SGGF-

-KGGF-

-DGGFG-

-GGFGG-

-DDGGFG-

-KDGGFG-

-GGFGGGF-

[trong cấu trúc trên đây, "(D-)D" là axit D-aspartic].

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

Trong cấu trúc được thể hiện bằng $-NH-(CH_2)n^1-$ trong chất liên kết, n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6 và tốt hơn là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 tới 3. Nhóm amino của gốc này được nối với đầu tận C của L^P trong chất liên kết.

4. L^a

Chất liên kết L^a được thể hiện bằng cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc $-C(=O)-NH-$, $-NR^1-(CH_2)n^7-$, và $-O-$ hoặc là liên kết đơn. Trong các cấu trúc trên đây, n^7 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, R^1 là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(CH_2)n^8-COOH$, hoặc $-(CH_2)n^9-OH$, n^8 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và n^9 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6.

Cấu trúc amit $-C(=O)-NH-$ trong chất liên kết L^a được nối với L^b ở phía nguyên tử nitơ của nó. Trong gốc cấu trúc là $-NR^1-(CH_2)n^7-$ trong L^a , n^7 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 tới 3. Gốc này được nối với L^b ở phía metylen của nó. R^1 là nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon có thể có mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ về chúng có thể bao gồm nhóm metyl, nhóm etyl, nhóm propyl, nhóm isopropyl, nhóm butyl, nhóm isobutyl, nhóm sec-butyl, nhóm tert-butyl, nhóm pentyl, nhóm isopentyl, nhóm 2-metylbutyl, nhóm neopentyl, nhóm 1-etylpropyl, nhóm hexyl,

nhóm isohexyl, nhóm 4-methylpentyl, nhóm 3-methylpentyl, nhóm 2-methylpentyl, nhóm 1-methylpentyl, nhóm 3,3-dimethylbutyl, nhóm 2,2-dimethylbutyl, nhóm 1,1-dimethylbutyl, nhóm 1,2-dimethylbutyl, nhóm 1,3-dimethylbutyl, nhóm 2,3-dimethylbutyl, và nhóm 2-ethylbutyl. Trong số chúng, nhóm methyl hoặc nhóm ethyl được ưu tiên. Nếu R^1 có cấu trúc được thể hiện bằng $-(CH_2)n^8-COOH$, thì n^8 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 hoặc 2. Nếu R^1 có cấu trúc được thể hiện bằng $-(CH_2)n^9-OH$, thì n^9 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 hoặc 2. R^1 tốt hơn là nguyên tử hydro, nhóm methyl, nhóm ethyl, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-COOH$, hoặc $-CH_2CH_2-OH$, và tốt hơn nữa là nguyên tử hydro, nhóm methyl, hoặc $-CH_2COOH$. Tốt hơn nữa là nguyên tử hydro. Gốc L^a của chất liên kết có thể là $-O-$ hoặc liên kết đơn.

5. L^b

Chất liên kết L^b là cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc $-CR^2(-R^3)-$, $-O-$, và $-NR^4-$ hoặc là liên kết đơn. Trong cấu trúc trên đây, mỗi trong số R^2 và R^3 độc lập là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, $-(CH_2)n^a-NH_2$, $-(CH_2)n^b-COOH$, hoặc $-(CH_2)n^c-OH$, R^4 là nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, n^b là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và n^c là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4. Nếu n^a hoặc n^c là 0, thì R^2 và R^3 không giống nhau.

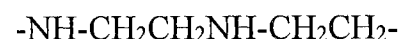
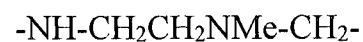
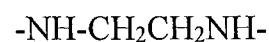
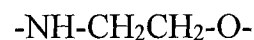
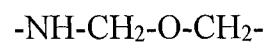
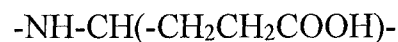
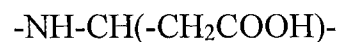
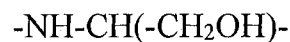
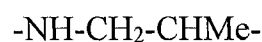
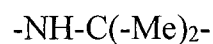
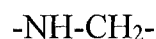
Nếu mỗi trong số R^2 và R^3 là nhóm alkyl, thì nhóm alkyl này được giải thích như được định nghĩa trong nhóm alkyl của R^1 . Nếu R^2 và R^3 có cấu trúc là $-(CH_2)n^a-NH_2$, thì n^a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, và tốt hơn là bằng 0, hoặc là nằm trong khoảng từ 3 đến 5. Nếu n^a bằng 0, thì R^2 và R^3 không giống nhau. Nếu R^2 và R^3 có cấu trúc là $-(CH_2)n^b-COOH$, thì n^b là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và tốt hơn là bằng 1 hoặc 2. Nếu R^2 và R^3 có cấu trúc là $-(CH_2)n^c-OH$, thì n^c là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4, và tốt hơn là bằng 1 hoặc 2.

Mỗi R^2 và R^3 tốt hơn là nguyên tử hydro, nhóm methyl, nhóm ethyl, $-NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-COOH$, $-CH_2OH$, hoặc $-CH_2CH_2-OH$, và tốt hơn nữa nếu là

nguyên tử hydro, nhóm metyl, $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, hoặc $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Chúng còn tốt hơn nếu là nguyên tử hydro.

Nếu R^4 là nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, nhóm alkyl này được giải thích như được định nghĩa trong nhóm alkyl của R^1 . R^4 tốt hơn là nguyên tử hydro hoặc nhóm metyl, và tốt hơn nữa nếu là nguyên tử hydro.

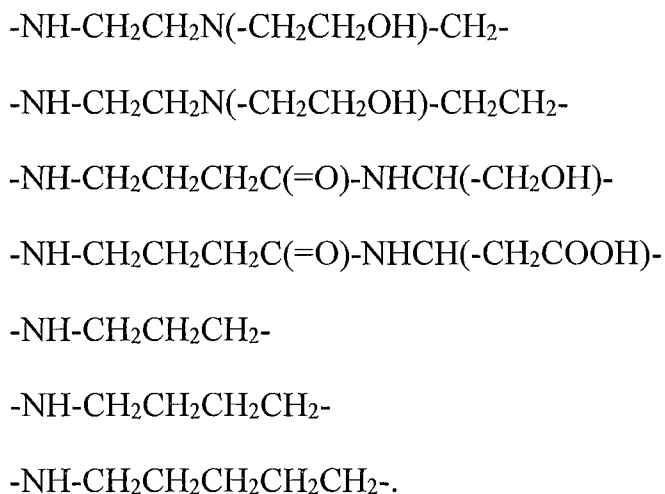
Các ví dụ cụ thể về cấu trúc được thể hiện bằng $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n\text{L}^a\text{L}^b-$ để làm chất liên kết có thể bao gồm



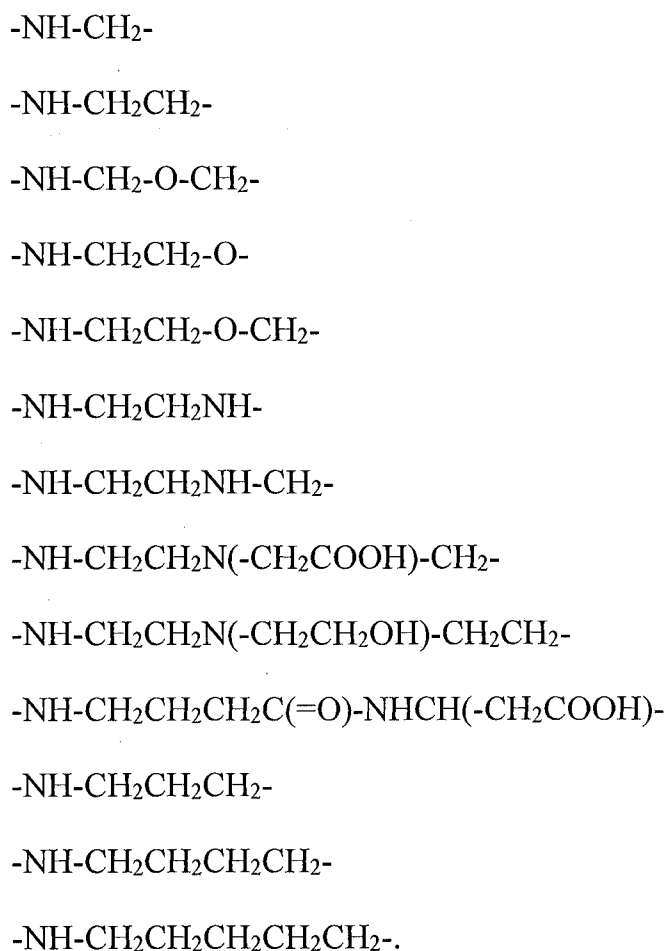
$\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{N(-CH}_2\text{COOH)-CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{N(-CH}_2\text{CH}_2\text{OH)-CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{N(-CH}_2\text{CH}_2\text{OH)-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)-NHCH(-CH}_2\text{OH)-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)-NHCH(-CH}_2\text{COOH)-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)-NHCH(-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{)-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH(NH}_2\text{)-}$

Trong số chúng, các ví dụ được ưu tiên về chúng có thể bao gồm

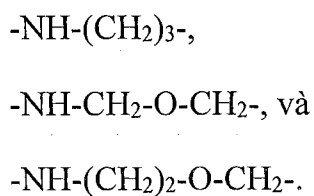
$\text{-NH-CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{-CH(Me)-}$
 $\text{-NH-CH(-CH}_2\text{OH)-}$
 $\text{-NH-CH(-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH)-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{C(-Me)}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{NH-CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{NMe-CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{NMe-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$
 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{N(-CH}_2\text{COOH)-CH}_2\text{-}$



Các ví dụ được ưu tiên hơn về chúng có thể bao gồm



Các ví dụ được ưu tiên hơn nữa về chúng có thể bao gồm

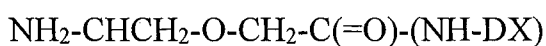
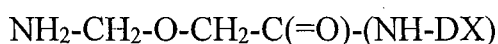
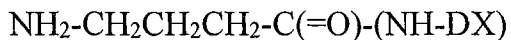
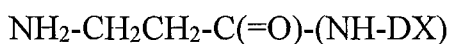


6. L^c

Chất liên kết L^c là $-CH_2-$ hoặc $-C(=O)-$. Chất liên kết này được nối với hợp chất kháng khối u. L^c của chất liên kết tốt hơn nữa nếu là $-C(=O)-$.

Trong chất liên kết, độ dài mạch của $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c$ tốt hơn là độ dài mạch từ 4 đến 7 nguyên tử, và tốt hơn nữa là độ dài mạch 5 hoặc 6 nguyên tử.

Đối với thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế, nếu nó được truyền vào bên trong các tế bào khối u, gốc liên kết được tách và dẫn xuất thuốc có cấu trúc được thể hiện bằng $NH_2-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$ được giải phóng để biểu thị hoạt tính kháng khối u. Ví dụ về dẫn xuất kháng khối u thể hiện tác dụng kháng khối u bằng cách giải phóng từ thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế bao gồm dẫn xuất kháng khối u có gốc cấu trúc trong đó cấu trúc này được thể hiện bằng $-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$ của chất liên kết được liên kết với L^c và có nhóm amino tận cùng, và đặc biệt được ưu tiên là bao gồm các cấu trúc sau.



Trong khi đó, trong trường hợp $NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$, xác nhận được rằng, do cấu trúc trong phân tử động vật không ổn định, nên nó lại trải qua quá trình tự thoái hóa để giải phóng cấu trúc sau $HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$. Hợp chất này tốt hơn là cũng có thể được dùng làm hợp chất trung gian sản xuất của thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế.

Đối với thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế trong đó exatecan được dùng làm thuốc, tốt hơn là gốc cấu trúc chất liên kết-thuốc có cấu trúc sau $[-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)]$ được nối với kháng thể. Số lượng trung bình các gốc cấu trúc chất liên kết-thuốc được liên hợp trong mỗi kháng thể có thể là nằm trong khoảng từ 1 đến 10. Tốt hơn là, nằm trong khoảng từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-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-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
- C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

Trong số đó, được ưu tiên hơn là các cấu trúc sau.

- (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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-(sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Đặc biệt được ưu tiên là các cấu trúc sau.

-(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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Đối với cấu trúc chất liên kết để liên hợp kháng thể và thuốc trong thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế, chất liên kết được ưu tiên có thể được xây dựng cấu trúc bằng cách nối các cấu trúc được ưu tiên thể hiện cho từng phần của chất liên kết được giải thích trên đây. Như đối với cấu trúc chất liên kết, các chất liên kết có cấu trúc sau có thể được ưu tiên sử dụng. Trong khi đó, đầu tận bên trái của cấu trúc này là vị trí nối với kháng thể và đầu tận bên phải là vị trí nối với thuốc.

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

- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- (sucxinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
- CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
- C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-dimanicuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

Trong số đó, được ưu tiên hơn là các cấu trúc sau.

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

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

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

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Đặc biệt được ưu tiên bao gồm các cấu trúc sau.

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

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

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

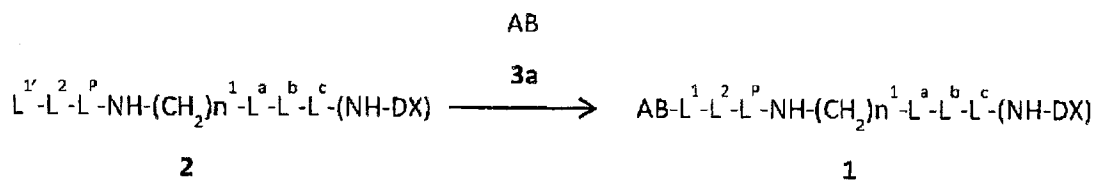
Phương pháp sản xuất

Tiếp theo, phương pháp tiêu biểu để sản xuất thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế hoặc hợp chất trung gian sản xuất của chúng được giải thích. Trong khi đó, hợp chất được mô tả dưới đây có số ký hiệu hợp chất được thể hiện trên mỗi công thức phản ứng. Cụ thể, chúng được gọi là "hợp chất có công thức (1)", "hợp chất (1)", hoặc dạng tương tự. Các hợp chất có các số ký hiệu khác với các hợp chất này cũng được mô tả tương tự.

1. Phương pháp sản xuất 1

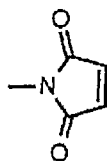
Thể liên hợp kháng thể-thuốc được thể hiện bằng công thức (1) trong đó kháng thể được liên kết với cấu trúc chất liên kết qua thioete có thể được tạo ra, ví dụ, bằng phương pháp sau.

Công thức 48



(Trong công thức này, AB là kháng thể có nhóm sulfhydryl, và L^{1'} là cấu trúc chất liên kết L¹ mà đầu tận liên kết là nhóm maleimidyl (công thức được thể hiện dưới đây)

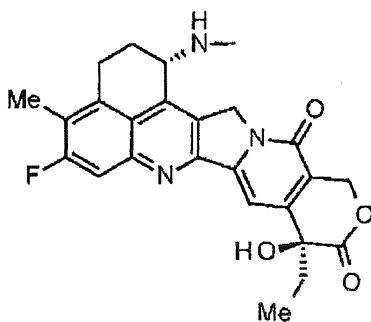
Công thức 49



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

hoặc đầu tận là halogen, và là nhóm mà gốc -(succinimit-3-yl-N)- trong -(succinimit-3-yl-N)-(CH₂)_n²-C(=O)- của L¹ là nhóm maleimidyl hoặc nhóm halogen-CH₂C(=O)NH-(CH₂)_n³-C(=O)- trong đó metylen tận cùng trong -CH₂C(=O)NH-(CH₂)_n³-C(=O)- của L¹ được halogen hóa để tạo ra haloaxetamit. Ngoài ra, -(NH-DX) là cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 50



và nó là nhóm thu được bằng cách loại bỏ 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 trên đây được mô tả là cấu trúc mà một gốc cấu trúc từ thuốc đến đầu tận liên kết nối với một kháng thể. Tuy nhiên, phần mô tả được đưa ra chỉ nhằm thuận tiện cho việc hiểu sáng chế, và trên thực tế sẽ có nhiều trường hợp mà nhiều cấu trúc gốc được nối với một phân tử kháng thể. Nguyên tắc giống như vậy cũng được áp dụng đối với phần giải thích phương pháp sản xuất được mô tả dưới đây.

Cụ thể, thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất (2), mà 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 được biết rõ trong lĩnh vực (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, các trang 56-136, các trang 456-493, Academic Press (1996)). Các ví dụ bao gồm: chất phản ứng Traut được cho phản ứng với nhóm amino của kháng thể; N-suxinimidyl S-axetylthioalkanoat được cho phản ứng với nhóm amino của kháng thể, tiếp đó là phản ứng với hydroxylamin; sau khi phản ứng với N-suxinimidyl 3-(pyridyldithio)propionat, kháng thể được cho phản ứng với chất khử; kháng thể được cho phản ứng với chất khử như dithiotreitol, 2-mercaptoetanol, và tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua (TCEP) để loại bỏ liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể đó để tạo ra nhóm sulfhydryl, nhưng không bị giới hạn ở nhóm này.

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

Trong khi đó, bằng cách tiến hành phản ứng để thêm nhóm sulfhydryl vào gốc thuốc-chất liên kết, thì gốc thuốc-chất liên kết này có thể được liên hợp bằng liên kết thioete.

Tiếp theo, bằng cách sử dụng hợp chất (2) với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 20 mol đương lượng trong mỗi kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl, thì có thể tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) trong đó từ 2 đến 8 phân tử thuốc được liên hợp trong mỗi kháng thể. Đặc biệt, dung dịch chứa hợp chất (2) đã được hòa tan vào đó được bổ sung đủ vào dung dịch

đệm chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl dùng cho phản ứng này. Trong bản mô tả này, các ví dụ về dung dịch đệm có thể được sử dụng bao gồm dung dịch natri axetat, natri phosphat, và natri borat. Độ pH cho phản ứng này nằm trong khoảng từ 5 đến 9, và tốt hơn nữa nếu phản ứng được thực hiện ở độ pH gần bằng 7. Ví dụ về dung môi để hòa tan hợp chất (2) bao gồm dung môi hữu cơ như dimetyl sulfoxit (DMSO), dimetylformamit (DMF), dimetyl axetamit (DMA), và N-metyl-2-pyridon (NMP). Dung dịch dung môi hữu cơ này chứa hợp chất (2) đã được hòa tan vào đó được bổ sung đủ với mức từ 1 đến 20% thể tích/thể tích vào dung dịch đệm chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl dùng cho phản ứng này. Nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 37°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10 đến 25°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2 giờ. Phản ứng có thể được kết thúc bằng cách khử hoạt tính phản ứng của hợp chất không phản ứng (2) bằng chất phản ứng chứa thiol. Ví dụ về chất phản ứng chứa thiol bao gồm cystein và N-axetyl-L-cystein (NAC). Đặc biệt hơn, NAC với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 2 mol đương lượng được bổ sung vào hợp chất (2) được sử dụng và, bằng cách ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian từ 10 đến 30 phút, thì phản ứng này có thể được kết thúc.

Thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) được tạo ra sau khi cô có thể được đưa vào quy trình trao đổi dung dịch đệm, tinh chế, và xác định nồng độ kháng thể và số lượng trung bình của phân tử thuốc được liên hợp trong mỗi phân tử kháng thể theo các quy trình chung được mô tả dưới đây, nhận biết thể liên hợp kháng thể-thuốc (1).

Quy trình chung A: Cô dung dịch nước chứa kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể-thuốc

Bổ sung dung dịch chứa kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể-thuốc vào thiết bị chứa Amicon Ultra (50000 MWCO, Millipore Corporation), và dung dịch chứa kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể-thuốc này được cô bằng cách ly tâm (ly tâm trong khoảng thời gian từ 5 đến 20 phút ở tốc độ 20.000m/s² đến 38.000 m/s²) bằng cách sử dụng máy ly tâm (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Quy trình chung B: Xác định nồng độ kháng thể

Bằng cách sử dụng bộ dò UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), quy trình xác định nồng độ kháng thể được thực hiện theo phương pháp đã được xác

định bởi nhà sản xuất. Ở thời điểm đó, hệ số hấp thu 280nm khác nhau đối với mỗi kháng thể được sử dụng ($1,3\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ đến $1,8\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Quy trình chung C-1: Sự trao đổi dung dịch đệm đối với kháng thể

Cột NAP-25 (Cat. số 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) sử dụng chất mang Sephadex G-25 được làm cân bằng bằng dung dịch đệm phosphat (10mM, độ pH = 6,0) (nó được gọi là PBS6.0/EDTA trong bản mô tả) chứa natri clorua (137mM) và axit etylen điamin tetraaxetic (EDTA, 5mM) theo phương pháp đã được xác định trong hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Dung dịch nước chứa kháng thể được đưa vào cột NAP-25 đơn với lượng là 2,5mL, và sau đó phân đoạn (3,5mL) rửa giải bằng 3,5ml PBS6.0/EDTA được thu gom. Phân đoạn tạo ra được cô theo Quy trình chung A. Sau khi xác định nồng độ của kháng thể bằng cách sử dụng Quy trình chung B, thì nồng độ kháng thể được điều chỉnh đến 10mg/mL bằng cách sử dụng PBS6.0/EDTA.

Quy trình chung C-2: Sự trao đổi dung dịch đệm đối với kháng thể

Cột NAP-25 (Cat. số 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) sử dụng chất mang Sephadex G-25 được làm cân bằng bằng dung dịch đệm phosphat (50mM, độ pH = 6,5) (nó được gọi là PBS6.5/EDTA trong bản mô tả) chứa natri clorua (50mM) và EDTA (2mM) theo phương pháp đã được xác định bởi nhà sản xuất. Dung dịch nước chứa kháng thể được đưa vào cột NAP-25 đơn với lượng là 2,5mL, và sau đó thu gom phân đoạn (3,5mL) đã được rửa giải bằng 3,5ml PBS6.5/EDTA. Phân đoạn tạo ra được cô theo Quy trình chung A. Sau khi xác định nồng độ của kháng thể bằng cách sử dụng Quy trình chung B, nồng độ kháng thể được điều chỉnh đến 20mg/mL bằng cách sử dụng PBS6.5/EDTA.

Quy trình chung D-1: Tinh chế thể liên hợp kháng thể-thuốc

Cột NAP-25 được làm cân bằng bằng dung dịch đệm bất kỳ được chọn từ dung dịch đệm phosphat có bán trên thị trường (PBS7,4, Cat. số 10010-023, Invitrogen), dung dịch đệm natri phosphat (10mM, độ pH = 6,0; nó được gọi là PBS6.0) chứa natri clorua (137mM), và dung dịch đệm axetat chứa sorbitol (5%) (10mM, độ pH = 5,5; nó được gọi là ABS trong bản mô tả). Dung dịch nước của phản ứng thể liên hợp kháng

thể-thuốc được đưa vào cột NAP-25 với lượng bằng khoảng 1,5mL, và sau đó được rửa giải bằng chất đệm với lượng đã được xác định bởi nhà sản xuất để thu gom phân đoạn kháng thể. Phân đoạn đã được thu gom một lần nữa được đưa vào cột NAP-25 và, bằng cách lặp lại tổng cộng 2 đến 3 lần quy trình tinh chế lọc gel để rửa giải bằng dung dịch đệm, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc loại trừ chất liên kết thuốc không được liên hợp và hợp chất có phân tử lượng thấp (tris(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua (TCEP), N-acetyl-L-cysteine (NAC), và dimethyl sulfoxit).

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

Nồng độ thuốc được liên hợp trong thể liên hợp kháng thể-thuốc có thể được tính bằng cách xác định độ hấp phụ UV của dung dịch nước của thể liên hợp kháng thể-thuốc ở hai bước sóng là 280nm và 370nm, tiếp đó thực hiện phép tính được chỉ ra dưới đây.

Do tổng độ hấp phụ ở bước sóng bất kỳ là bằng tổng của độ hấp phụ của mọi loại hóa chất hấp phụ nhẹ mà có mặt trong hệ [độ cộng của độ hấp phụ], khi hệ số mức độ hấp thu mol của kháng thể và thuốc vẫn giữ nguyên trước và sau khi liên hợp giữa kháng thể và thuốc, thì nồng độ kháng thể và nồng độ thuốc trong thể liên hợp kháng thể-thuốc được tính theo các phương trình sau.

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{Phương trình (1)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{Phương trình (2)}$$

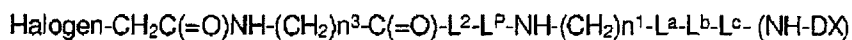
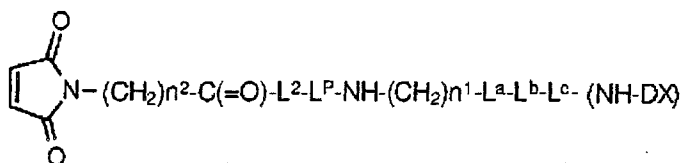
Trong các phương trình ở trên, A_{280} biểu thị độ hấp phụ của dung dịch nước của thể liên hợp kháng thể-thuốc ở bước sóng 280nm, A_{370} biểu thị độ hấp phụ của dung dịch nước của thể liên hợp kháng thể-thuốc ở bước sóng 370nm, $A_{A,280}$ biểu thị độ hấp phụ của kháng thể ở bước sóng 280nm, $A_{A,370}$ biểu thị độ hấp phụ của kháng thể ở bước sóng 370nm, $A_{D,280}$ biểu thị độ hấp phụ của tiền chất liên hợp ở bước sóng 280nm, $A_{D,370}$ biểu thị độ hấp phụ của tiền chất liên hợp ở bước sóng 370nm, $\epsilon_{A,280}$ biểu thị hệ số hấp thu mol của kháng thể ở bước sóng 280nm, $\epsilon_{A,370}$ biểu thị hệ số hấp thu mol của kháng thể ở bước sóng 370nm, $\epsilon_{D,280}$ biểu thị hệ số hấp thu mol của tiền chất liên hợp ở bước sóng 280nm, $\epsilon_{D,370}$ biểu thị hệ số hấp thu mol của tiền chất liên hợp ở bước sóng

370nm, C_A biểu thị nồng độ kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-thuốc, và C_D biểu thị nồng độ thuốc trong thể liên hợp kháng thể-thuốc.

Như đối với $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$, và $\epsilon_{D,370}$ nêu trên, sử dụng các trị số đã thu được từ trước (trị số ước tính dựa vào giá trị tính toán hoặc giá trị đo thu được bằng cách xác định UV của hợp chất). Ví dụ, $\epsilon_{A,280}$ có thể được ước tính từ trình tự axit amin của kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp tính toán đã biết (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ thường bằng không. $\epsilon_{D,280}$ và $\epsilon_{D,370}$ có thể thu được dựa vào luật Lambert-Beer (độ hấp phụ = nồng độ mol $\times$ hệ số hấp thụ mol $\times$ độ dài đường tế bào) bằng cách đo độ hấp phụ của dung dịch, trong đó tiền chất thể liên hợp cần được sử dụng được hòa tan ở nồng độ mol nhất định. Bằng cách xác định A_{280} và A_{370} của dung dịch nước của thể liên hợp kháng thể-thuốc và giải các phương trình (1) và (2) đồng thời bằng cách sử dụng các trị số, 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 trong mỗi kháng thể.

Hợp chất được thể hiện bằng công thức (2) trong phương pháp sản xuất 1 là hợp chất bất kỳ có công thức sau:

Công thức 51



Trong công thức, n^1 , n^2 , n^3 , L^2 , L^P , L^a , L^b , và L^c là như đã được xác định, và L^c là vị trí nối cho thuốc này.

Trong hợp chất trung gian hữu ích trong việc tạo ra hợp chất theo sáng chế, tốt hơn là, n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, L^2 là $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{n^5}\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ hoặc liên kết đơn, n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 4, L^P là GGFG, và $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-L}^c\text{-}$ là một phần cấu trúc của $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$, hoặc $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$. Halogen tốt hơn là brom hoặc iot. Các ví dụ cụ thể về các hợp chất này có thể bao gồm

các hợp chất sau [trong bản mô tả này, (maleimit-N-yl) là nhóm maleimidyl (2,5-di-oxo-2,5-di-hydro-1H-pyrol-1-yl)].

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

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

(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-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-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

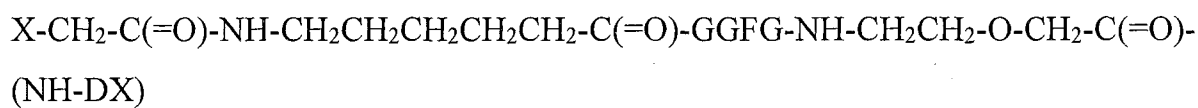
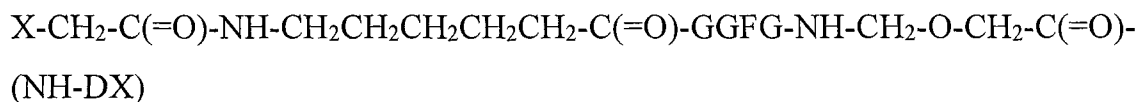
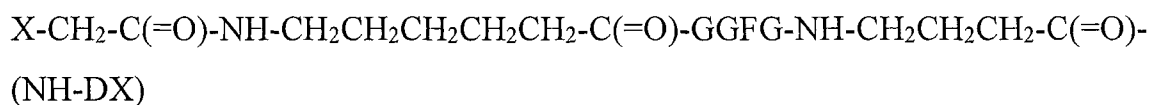
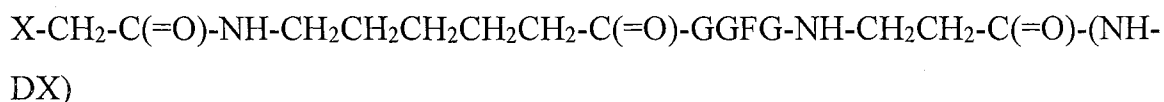
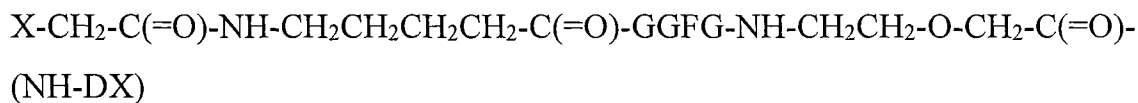
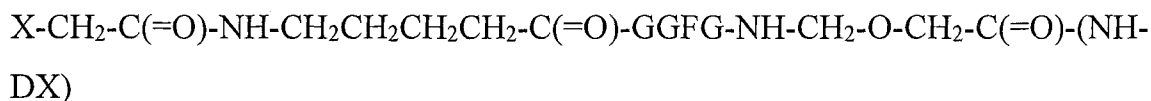
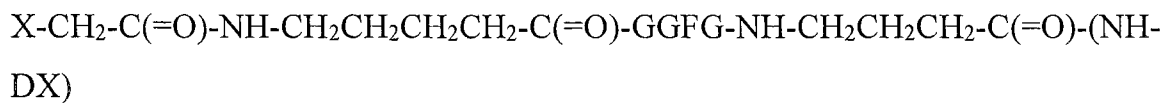
X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

X-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)



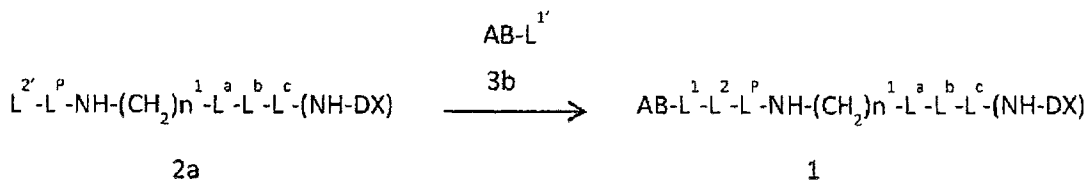
Trong công thức này, X là nguyên tử brom hoặc nguyên tử iot. Tất cả các hợp chất brom và iot này tốt hơn là có thể được dùng làm chất trung gian sản xuất.

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

2. Phương pháp sản xuất 2

Thể liên hợp kháng thể-thuốc được thể hiện bằng công thức (1) trong đó kháng thể này được nối qua nhóm amit vào chất liên kết và có liên kết thioete trong chất liên kết, cụ thể là, cấu trúc trong đó $-L^1-L^2-$ là $-\text{C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH}_2\text{-(N-ly-3-dimanicuS)-S-(CH}_2\text{)}_n\text{-C(=O)-}$, có thể cũng được tạo ra bằng phương pháp sau.

Công thức 52



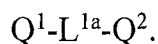
Trong công thức này, AB-L^{1'} biểu thị nhóm mà kháng thể và chất liên kết L¹ được nối và, ngoài ra, đầu tận L¹ được chuyển hóa thành nhóm N- maleimidyl. Nhóm này cụ thể là có cấu trúc trong đó -(N-ly-3-dimincuccuS)- trong AB-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-dimincuccuS)- được chuyển hóa thành nhóm maleimidyl. L^{2'} biểu thị nhóm HS-(CH₂)_n⁶-C(=O)- trong đó đầu tận là nhóm mercapto, và AB biểu thị kháng thể.

Đặc biệt, thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất có công thức (2a), mà thu được bằng phương pháp được mô tả dưới đây, phản ứng với kháng thể (3b) mà được nối với chất liên kết có nhóm maleimidyl.

Kháng thể (3b) có nhóm maleimidyl cũng có thể thu được bằng phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, các trang 56-136, các trang 456-493, Academic Press (1996)). Các ví dụ bao gồm: chất liên kết hai chức năng, như suxinimidyl-4-(N-maleimitometyl)xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), mà có khả năng liên kết với nhóm amino hoặc nhóm hydroxyl và có nhóm maleimidyl được cho phản ứng trên nhóm amino của phối tử để đưa nhóm maleimidyl vào, nhưng không bị giới hạn ở nhóm này.

Ví dụ, ưu tiên sử dụng hợp chất có gốc phản ứng nhóm amino và gốc phản ứng nhóm thiol liên kết thông qua chất liên kết. Trong bản mô tả này, gốc phản ứng nhóm amino có thể là este hoạt tính, imit este, hoặc gốc tương tự, và gốc phản ứng thiol có thể là maleimidyl, axetyl halogenua, alkyl halogenua, dithiopyridyl, hoặc gốc tương tự.

Đối với phương pháp nhằm xây dựng cấu trúc chất liên kết với nhóm amino hoặc nhóm hydroxy của axit amin cấu thành kháng thể, cụ thể là thông qua liên kết amit với nhóm amino, hợp chất phản ứng đầu tiên với kháng thể có thể là hợp chất có công thức sau:



[Trong công thức này, Q^1 biểu thị (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-, (3-Sulfo-pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-, R^Q -O-C(=N)-, hoặc O=C=N-,

L^{1a} - biểu thị -cyc.Hex(1,4)-CH₂-, nhóm alkylen có 1 đến 10 nguyên tử cacbon, nhóm phenylen, -(CH₂)^{n⁴}-C(=O)-, -(CH₂)^{n^{4a}}-NH-C(=O)-(CH₂)^{n^{4b}}-, hoặc -(CH₂)^{n^{4a}}-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-,

Q^2 biểu thị (maleimit-N-yl), nguyên tử halogen, hoặc -S-S-(2-Pyridyl),

R^Q biểu thị nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, n^{4a} là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, và n^{4b} là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6.]

Trong công thức nêu trên, R^Q là nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, và tốt hơn nữa nếu là nhóm methyl hoặc etyl.

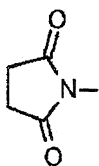
Nhóm alkylen của L^{1a} có thể là nhóm có 1 đến 10 nguyên tử cacbon. Nhóm phenylen có thể có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình ortho, meta, và para và tốt hơn nữa nếu là nhóm para- hoặc meta-phenylen.

Các ví dụ được ưu tiên về L^{1a} có thể bao gồm -cyc.Hex(1,4)-CH₂-, -(CH₂)₅-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-, -(CH₂)₂-NH-C(=O)-CH₂-, -(CH₂)₅-NH-C(=O)-(CH₂)₂-, -CH₂-, -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₅-, -(CH₂)₁₀-, -(para-Ph)-, -(meta-Ph)-, -(para-Ph)-CH(-CH₃)-, -(CH₂)₃-(meta-Ph)-, và -(meta-Ph)-NH-C(=O)-CH₂-.

Q^1 tốt hơn nếu là (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-, Q^2 tốt hơn nếu là (maleimit-N-yl), hoặc -S-S-(2-Pyridyl) có thể được sử dụng khi liên kết disulfua sẽ được tạo thành.

Trong công thức nêu trên, (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

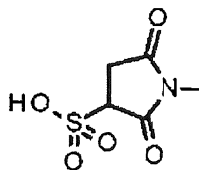
Công thức 53



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

(3-Sulfo-pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)- là nhóm có công thức sau:

Công thức 54

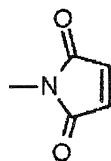


trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và axit sulfonic này có khả năng tạo thành muối lithi, muối natri, hoặc muối kali, và tốt hơn là muối natri,

Cyc. Hex(1,4) biểu thị nhóm 1,4-xyclohexylen,

(maleimit-N-yl) là nhóm có công thức sau:

Công thức 55



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối,

(2-Pyridyl) biểu thị nhóm 2-pyridyl, (para-Ph) biểu thị nhóm para-phenylen, và (meta-Ph) biểu thị nhóm meta-phenylen.

Các ví dụ về hợp chất này bao gồm sulfosuxinimidyl-4-(N-maleimidylmetyl) xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC), N-suxinimidyl-4-(N-maleimidylmetyl)-xyclohexan-1-carboxy-(6-amidocaproat) (LC-SMCC), N-suxinimidyl este của axit κ -maleimidyl undecanoic (KMUA), N-suxinimidyl este của axit γ -maleimidyl butyric (GMBS), N-hydroxysuxinimit este của axit ε -maleimidyl caproic (EMCS), m-maleimidylbenzoyl-N-hydroxysuxinimit este (MBS), N-(α -maleimidylaxetoxy)-suxinimit este (AMAS), suxinimidyl-6-(β -maleimidylpropionamit)hexanoat (SMPH), N-suxinimidyl 4-(p-maleimidylphenyl)-butyrat (SMPB), N-(p-maleimidylphenyl)isoxyanat (PMPI), N-suxinimidyl-4-(iodoaxetyl)-aminobenzoat (SIAB), N-suxinimidyl iodoaxetat (SIA), N-suxinimidyl bromaxetat (SBA), N-suxinimidyl 3-(bromaxetamit)propionat (SBAP), N-suxinimidyl-3-(2-pyridodithio)propionat (SPDP), và suxinimidyloxycacbonyl- α -metyl- α -(2-pyridyldithio)toluen (SMPT).

Đặc biệt, ví dụ, bằng cách cho SMCC với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 6 đương lượng phản ứng với kháng thể (3) trong dung dịch đệm phosphat có độ pH nằm trong khoảng 6 đến 7 trong khoảng thời gian 1 đến 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng, este hoạt tính của SMCC có thể phản ứng với kháng thể để tạo ra kháng thể (3b) có nhóm maleimidyl. Kháng thể (3b) thu được có thể được tinh chế bằng Quy trình chung D-2 được mô tả dưới đây, và được sử dụng cho phản ứng tiếp theo với hợp chất (2a).

Quy trình chung D-2: Tinh chế kháng thể thu được từ suxinimidyl 4-(N-maleimidylmetyl)-xyclohexan-1-carboxylat (SMCC)

Cột NAP-25 được làm cân bằng bằng PBS6.5/EDTA. Dung dịch phản ứng chứa suxinimidyl 4-(N-maleimidylmetyl)-xyclohexan-1-carboxylat (trong bản mô tả này, được gọi là kháng thể thu được từ SMCC) được đưa vào cột NAP-25 với lượng bằng khoảng 0,5mL, và sau đó được rửa giải bằng chất đệm với lượng đã được xác định bởi nhà sản xuất để thu gom phân đoạn kháng thể để tinh chế.

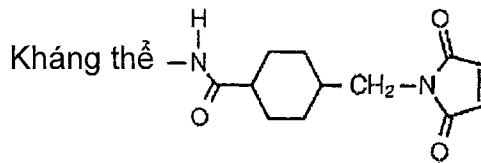
Nhóm amino của kháng thể để nối vào chất liên kết có thể là nhóm amino đầu tận N và/hoặc nhóm amino mang bởi gốc lysin, nhưng không bị giới hạn ở nhóm này. Theo cách khác, kháng thể này có thể được nối với chất liên kết với sự hình thành liên kết este bằng cách sử dụng nhóm hydroxy được mang bởi gốc serin.

Phản ứng giữa hợp chất (2a) với kháng thể (3b) nối với chất liên kết có nhóm maleimidyl có thể được thực hiện theo phương pháp giống như phương pháp để cho hợp chất (2) phản ứng với kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl như được nêu trong phương pháp sản xuất 1.

Đối với thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) được điều chế, các quy trình cô, trao đổi dung dịch đệm, tinh chế, và nhận biết thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) bằng cách xác định nồng độ kháng thể và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trong mỗi phân tử kháng thể có thể được thực hiện theo phương pháp giống như phương pháp sản xuất 1.

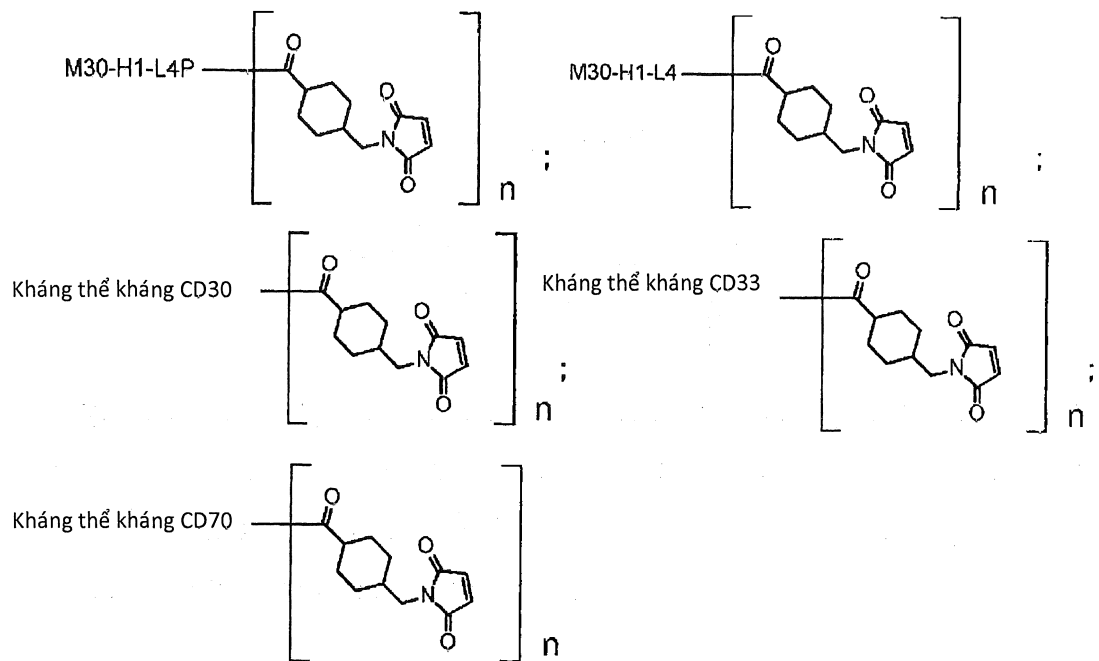
Hợp chất được thể hiện bằng công thức (3b) trong phương pháp sản xuất 2 có cấu trúc sau (xem công thức dưới đây; trong cấu trúc của nó, "kháng thể -NH-" bắt nguồn từ kháng thể).

Công thức 56

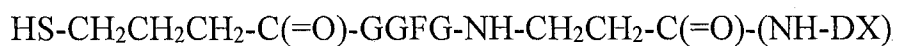


Hợp chất mà là hợp chất trung gian để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế và có cấu trúc nêu trên là như được mô tả dưới đây (trong công thức đó, n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 3 đến 8).

Công thức 57



Ngoài ra, các ví dụ về hợp chất theo sáng chế trong đó đầu tận là nhóm mercapto có thể bao gồm các hợp chất sau.

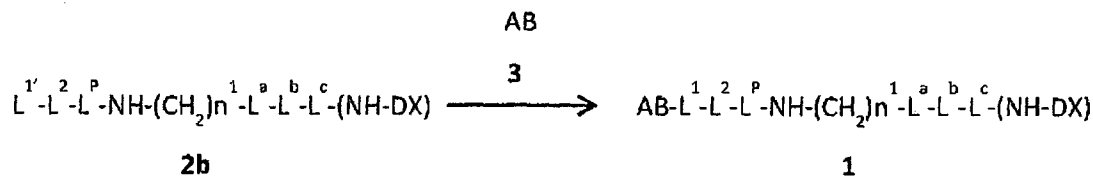




3. Phương pháp sản xuất 3

Thế liên hợp kháng thể-thuốc có công thức (1), trong đó kháng thể này được liên hợp với gốc chất liên kết - thuốc thông qua liên kết amit có thể được tạo ra theo phương pháp được mô tả dưới đây. Ví dụ, như đối với $\text{-C(=O)-(CH}_2\text{)}^n\text{-C(=O)-}$ của L^1 , este hoạt tính của nó L^1 , ví dụ, (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)- $\text{O-C(=O)-(CH}_2\text{)}^n\text{-C(=O)-}$, tốt hơn là có thể được sử dụng. Khi L^2 là liên kết đơn, thế liên hợp kháng thể-thuốc (1) có thể được tạo ra theo phương pháp sau, chẳng hạn.

Công thức 58



Đặc biệt, thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất có công thức (2b), mà thu được bằng phương pháp được mô tả dưới đây, phản ứng với kháng thể (3).

Hợp chất (2b) có khả năng nối với nhóm amino hoặc nhóm hydroxyl của kháng thể. Nhóm amino và nhóm hydroxyl của kháng thể đề cập đến, như được mô tả trong phương pháp sản xuất 2, ví dụ, nhóm amino đầu tận N được mang bởi kháng thể và/hoặc nhóm amino được mang bởi gốc lysin và nhóm hydroxy được mang bởi gốc serin, một cách tương ứng, nhưng không bị giới hạn ở các nhóm này.

Hợp chất (2b) là este hoạt tính bao gồm nhóm N-hydroxysuxinimidyl este. Theo cách khác, các este hoạt tính khác, ví dụ, nhóm sulfosuxinimidyl este, N-hydroxyphtalimidyl este, N-hydroxysulfophtalimidyl este, ortho-nitrophenyl este, para-nitrophenyl este, 2,4-dinitrophenyl este, 3-sulfonyl-4-nitrophenyl este, 3-carboxy-4-nitrophenyl este, và pentaflorophenyl este, có thể được sử dụng.

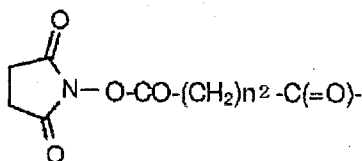
Bằng cách sử dụng hợp chất (2b) với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 20 mol đương lượng trong mỗi kháng thể (3) trong phản ứng giữa hợp chất (2b) với kháng thể (3), thì thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) trong đó 1 đến 10 phân tử thuốc được liên hợp trong mỗi kháng thể có thể tạo ra. Đặc biệt, dung dịch chứa hợp chất (2b) đã được hòa tan trong đó có thể được bổ sung vào dung dịch đệm chứa kháng thể (3) dùng cho phản ứng này để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc (1). Trong bản mô tả này, các ví dụ về dung dịch đệm đó có thể được sử dụng bao gồm dung dịch natri axetat, natri phosphat, và natri borat. Độ pH đối với phản ứng này có thể là nằm trong khoảng từ 5 đến 9, và tốt hơn nữa nếu phản ứng được thực hiện ở độ pH gần bằng 7. Ví dụ về dung môi để hòa tan hợp chất (2b) bao gồm các dung môi hữu cơ như dimetyl sulfoxit (DMSO), dimetyl-formamit (DMF), dimetyl axetamit (DMA), và N-metyl-2-pyridon (NMP). Dung dịch dung môi hữu cơ chứa hợp chất (2b) đã được hòa tan trong đó được

bổ sung đủ với mức 1 đến 20% thể tích/thể tích vào dung dịch đệm chứa kháng thể (3) dùng cho phản ứng này. Nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 37°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 10 đến 25°C, và thời gian phản ứng là từ 0,5 đến 20 giờ.

Đối với thể liên hợp kháng thể-thuốc được tạo ra (1), các quy trình cô, trao đổi dung dịch đệm, tinh chế, và nhận biết thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) bằng cách xác định nồng độ kháng thể và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trong mỗi phân tử kháng thể có thể được thực hiện theo phương pháp giống như phương pháp sản xuất 1.

Gốc (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-(CH₂)_n-C(=O)- trong phương pháp sản xuất 3 có cấu trúc sau.

Công thức 59



Các ví dụ về hợp chất theo sáng chế có cấu trúc một phần ở trên có thể bao gồm các hợp chất sau.

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-
C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-
CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

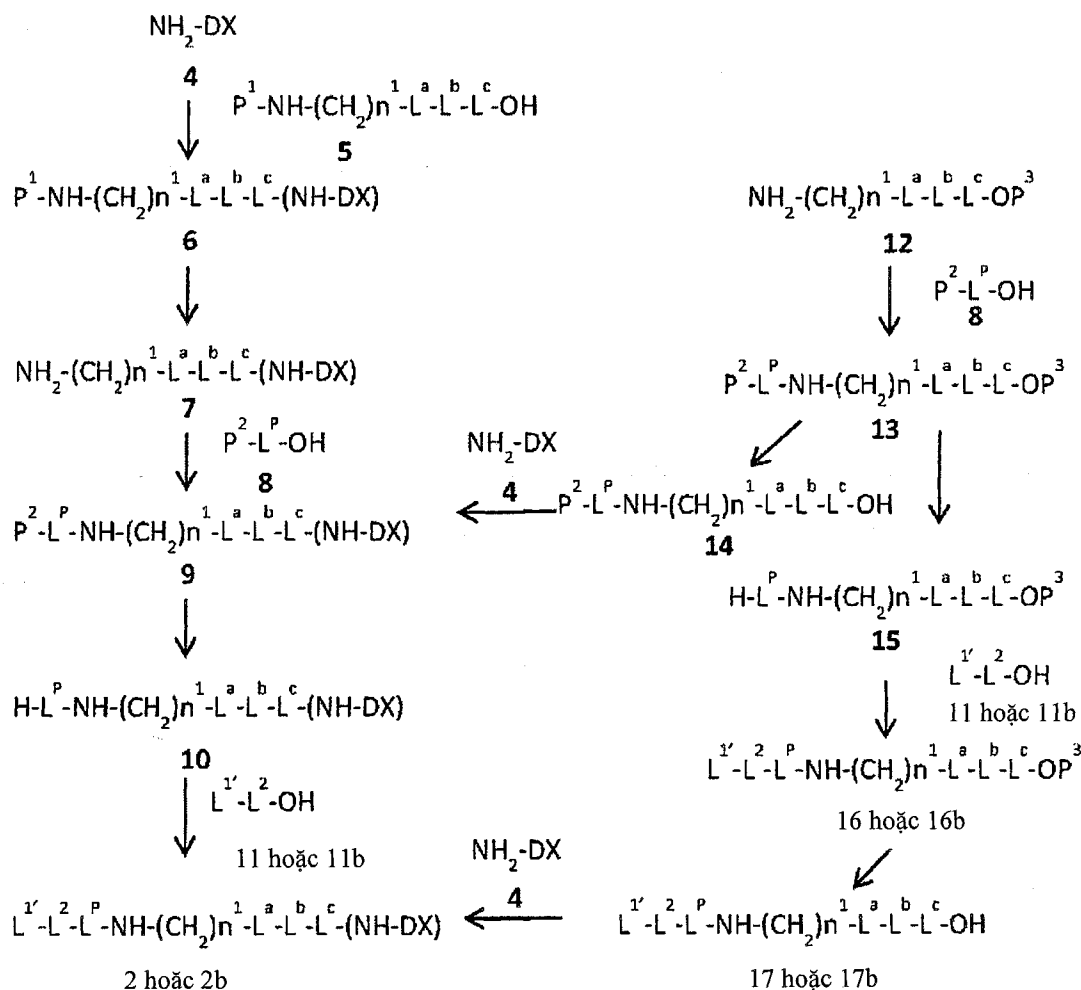
(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

(pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

4. Phương pháp sản xuất 4

Hợp chất có công thức (2) hoặc (2b) làm hợp chất trung gian được sử dụng trong phương pháp sản xuất trước và muối được dùng của chúng có thể được tạo ra theo phương pháp sau, chẳng hạn.

Công thức 60



Trong công thức này, L^c là $-C(=O)-$ và được nối với $-(NH-DX)$ với sự tạo thành của liên kết amit, $L^{1'}$ là cấu trúc L^1 trong đó đầu tận được chuyển hóa thành nhóm maleimidyl hoặc nhóm haloaxetyl, hoặc thành (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)- $O-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-$, và mỗi P^1 , P^2 , và P^3 là nhóm bảo vệ.

Hợp chất (6) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất axit carboxylic (5) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc hợp chất tương tự và cho nó phản ứng với NH_2-DX [chỉ exatecan; tên hóa 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] (4) hoặc muối được dùng của chúng.

Các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit có thể được sử dụng cho phản ứng này. Có các loại este hoạt tính khác nhau. Ví dụ, nó có thể được tạo ra bằng cách cho các phenol như p-nitrophenol, N-hydroxy benzotriazol, N-hydroxy succinimide, hoặc dạng tương tự, phản ứng với axit carboxylic (5) bằng cách sử dụng chất ngưng tụ như N,N'-dicyclohexylcarbodiimide hoặc 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride. Ngoài ra, este hoạt tính cũng có thể được tạo ra bằng phản ứng giữa axit carboxylic (5) với pentafluorophenyl trifluoroacetate hoặc dạng tương tự; phản ứng giữa axit carboxylic (5) với 1-benzotriazolyl oxytripyrrolidinophosphoni hexafluorophosphite; phản ứng giữa axit carboxylic (5) với diethyl xyanophosphonate (phương pháp ướp muối); phản ứng giữa axit carboxylic (5) với triphenylphosphine và 2,2'-dipyridyl disulfide (Phương pháp Mukaiyama); phản ứng giữa axit carboxylic (5) với dẫn xuất triazin như 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM); hoặc dạng tương tự. Ngoài ra, phản ứng này cũng có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phương pháp halogenua axit, bằng cách đó axit carboxylic (5) được xử lý bằng halogenua axit như thionyl chloride và oxalyl chloride 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 theo đó phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ thích hợp trong dung môi trơ ở nhiệt độ nằm trong khoảng -78°C đến 150°C , thì có thể tạo ra hợp chất (6). (Trong khi đó, "dung môi trơ" dùng để chỉ dung môi mà không ức chế phản ứng mà dung môi này được sử dụng cho phản ứng đó.)

Các ví dụ cụ thể về bazơ được sử dụng cho từng bước được mô tả ở trên bao gồm cacbonat của kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ, alkoxit kim loại kiềm, hydroxit hoặc hydrua của kim loại kiềm bao gồm natri cacbonat, kali cacbonat, natri etoxit, kali butoxit, natri hydroxit, kali hydroxit, natri hydrua, và kali hydrua, bazơ cơ kim được thể hiện bằng alkyl lithi bao gồm n-butyl lithi, dialkylamino lithi bao gồm lithi diisopropylamit; bazơ cơ kim của bissilylamin bao gồm lithi bis(trimetylsilyl)amit; và bazơ hữu cơ bao gồm pyridin, 2,6-lutidin, colidin, 4-dimethylaminopyridin, triethylamin, N-metyl morpholin, diisopropyletylamin, và diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU).

Các ví dụ về dung môi trơ mà được sử dụng cho phản ứng này theo sáng chế bao gồm dung môi hydrocacbon được halogen hóa như diclometan, clorofom, và cacbon tetraclorea; dung môi ete như tetrahydrofuran, 1,2-dimetoxyetan, và dioxan; dung môi hydrocacbon thơm như benzen và toluen; và dung môi amit như N,N-dimetylformamit, N,N-dimetyl axetamit, và N-metylpyrrolidin-2-on. Ngoài các dung môi này, dung môi sulfoxit như dimetyl sulfoxit và sulfolan; và dung môi keton như axeton và metyl etyl keton có thể được sử dụng tùy thuộc vào từng trường hợp.

Nhóm hydroxy, nhóm carboxy, nhóm amino, hoặc nhóm tương tự của L^a và L^b trong hợp chất (6) có thể được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ mà thường được sử dụng trong quy trình tổng hợp hợp chất hữu cơ, như được đề cập sau đây. Đặc biệt, các ví dụ về nhóm bảo vệ đối với nhóm hydroxyl bao gồm nhóm alkoxymetyl như nhóm metoxymetyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl, nhóm 4-metoxybenzyl, và nhóm triphenylmetyl; nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm silyl như nhóm tert-butyl diphenylsilyl. Nhóm carboxy có thể được bảo vệ, ví dụ, dưới dạng este bằng nhóm alkyl như nhóm metyl, nhóm etyl, và nhóm tert-butyl, nhóm alyl, hoặc nhóm arylmetyl như nhóm benzyl. Nhóm amino có thể được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ đối với nhóm amino mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit, ví dụ, nhóm alkyloxy cacbonyl như nhóm tert-butyloxy cacbonyl, nhóm metoxycarbonyl, và nhóm etoxycarbonyl; nhóm arylmetyl như alyloxyacarbonyl, nhóm 9-floenylmetyloxy cacbonyl, nhóm benzyloxy cacbonyl, nhóm parametoxibenzyloxy cacbonyl, và nhóm para (hoặc ortho)nitrobenzyloxy cacbonyl; 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. Việc bảo vệ và khử bỏ bảo vệ của nhóm bảo vệ có thể được thực hiện theo phương pháp thường được tiến hành.

Như đối với nhóm bảo vệ P^1 đối với nhóm amino tận cùng của hợp chất (6), nhóm bảo vệ đối với nhóm amino mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit, ví dụ, nhóm tert-butyloxy cacbonyl, nhóm 9-floenylmetyloxy cacbonyl, và nhóm benzyloxy cacbonyl, có thể được sử dụng. Các ví dụ về nhóm bảo vệ khác đối với nhóm amino bao gồm nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm alkoxycarbonyl như nhóm metoxycarbonyl và nhóm etoxycarbonyl; nhóm arylmetoxy cacbonyl như nhóm parametoxibenzyloxy cacbonyl, và nhóm para (hoặc ortho)nitrobenzyloxy cacbonyl; 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 P^1 có thể được chọn tùy thuộc vào, ví dụ, các tính chất của hợp chất có nhóm amino được bảo vệ.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P^1 đối với nhóm amino tận cùng của hợp chất (6) thu được, hợp chất (7) có thể tạo ra. Chất phản ứng và các điều kiện phản ứng có thể được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Hợp chất (9) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất axit carboxylic của peptit (8) có đầu tận N được bảo vệ bằng P^2 thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc dạng tương tự và cho nó phản ứng với hợp chất (7) thu được. Các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ sử dụng để hình thành liên kết peptit giữa axit carboxylic của peptit (8) và hợp chất (7) có thể được chọn một cách thích hợp từ các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ P^2 có thể được chọn một cách thích hợp từ các nhóm được mô tả đối với nhóm bảo vệ của hợp chất (6), và việc lựa chọn có thể được thực hiện dựa vào, ví dụ, các tính chất của hợp chất có nhóm amino cần được bảo vệ. Vì nó thường được sử dụng để tổng hợp peptit, nên bằng cách lặp lại một cách tuần tự bước phản ứng và bước khử bảo vệ của axit amin hoặc peptit cấu thành axit carboxylic của peptit (8) để kéo dài, thì hợp chất (9) cũng có thể được tạo ra.

Bằng cách khử bảo vệ P^2 là nhóm bảo vệ đối với nhóm amino của hợp chất (9) thu được, hợp chất (10) có thể được tạo ra. Chất phản ứng và các điều kiện phản ứng có thể được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

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

Hợp chất (9) cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp sau, chẳng hạn.

Hợp chất (13) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất axit carboxylic của peptit (8) có đầu tận N được bảo vệ bằng P^2 thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc dạng tương tự và cho nó phản ứng với amin hợp chất (12) có nhóm carboxy được bảo vệ bằng P^3 với sự có mặt của bazơ. Các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để hình thành liên kết peptit giữa axit carboxylic của peptit (8) và hợp chất (12) có thể được chọn một cách thích hợp từ các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ P^2 đối với nhóm amino của hợp chất (13) có thể được chọn một cách thích hợp từ các nhóm được mô tả đối với nhóm bảo vệ của hợp chất (6). Đối với nhóm bảo vệ P^3 đối với nhóm carboxy, nhóm bảo vệ thường được dùng làm nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy trong hóa học tổng hợp hữu cơ, cụ thể, tổng hợp peptit có thể được sử dụng. Đặc biệt, nó có thể được chọn một cách thích hợp từ các nhóm được mô tả đối với nhóm bảo vệ của hợp chất (6), ví dụ, este với nhóm alkyl như nhóm metyl, nhóm etyl, hoặc tert-butyl, allyl este, và benzyl este. Trong trường hợp này, cần thiết rằng nhóm bảo vệ đối với nhóm amino và nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy có thể được loại bỏ bằng phương pháp khác nhau hoặc các điều kiện khác nhau. Chẳng hạn, các ví dụ tiêu biểu bao gồm tổ hợp trong đó P^2 là nhóm tert-butyloxy carbonyl và P^3 là nhóm benzyl. 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 cần được bảo vệ. Để loại bỏ các nhóm

bảo vệ, các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng có thể được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P³ đối với nhóm carboxy của hợp chất (13) thu được, hợp chất (14) có thể được tạo ra. Chất phản ứng và các điều kiện được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

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

Hợp chất (2) hoặc (2b) có thể cũng được tạo ra bằng phương pháp sau, chẳng hạn.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P² đối với nhóm amino của hợp chất (13), hợp chất (15) có thể được tạo ra. Chất phản ứng và các điều kiện phản ứng có thể được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

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

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy của hợp chất (16) hoặc (16b) thu được, hợp chất (17) hoặc (17b) có thể được tạo ra. Quy trình này có thể được tiến hành tương tự với quy trình khử bảo vệ nhóm carboxy để tạo ra hợp chất (14).

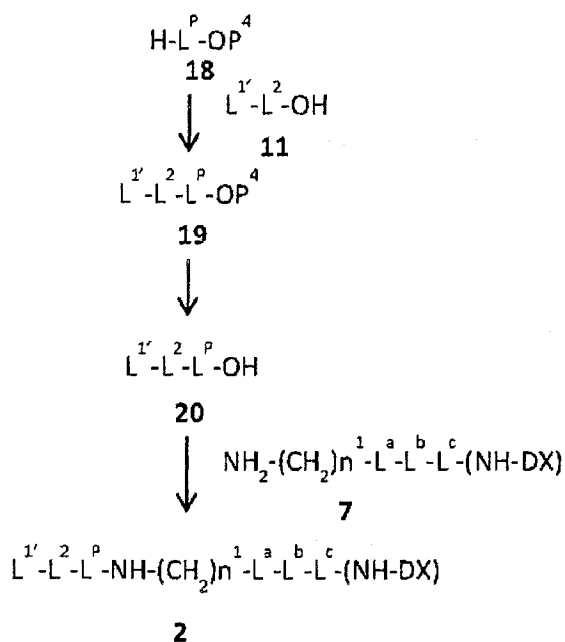
Hợp chất (2) hoặc (2b) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất hợp chất (17) hoặc (17b) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc dạng tương tự

và cho nó phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ. Đối với phản ứng này, các chất phản ứng và các điều kiện mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng này có thể được chọn một cách thích hợp từ các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

5. Phương pháp sản xuất 5

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

Công thức 61



Trong công thức này, $\text{L}^{1'}$ tương ứng với L^1 có cấu trúc trong đó đầu tận được chuyển hóa thành nhóm maleimidyl hoặc nhóm haloaxetyl, và P^4 là nhóm bảo vệ.

Hợp chất (19) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất hợp chất (11) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc dạng tương tự và cho nó phản ứng với axit carboxylic của peptit (18) có đầu tận C được bảo vệ bằng P^4 với sự có mặt của bazơ. Các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để hình thành liên kết peptit giữa axit carboxylic của peptit (18) và hợp chất (11) có thể được chọn một cách thích hợp từ các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ P^4 đối với nhóm carboxy của

hợp chất (18) có thể được chọn một cách thích hợp từ các nhóm được mô tả đối với nhóm bảo vệ của hợp chất (6).

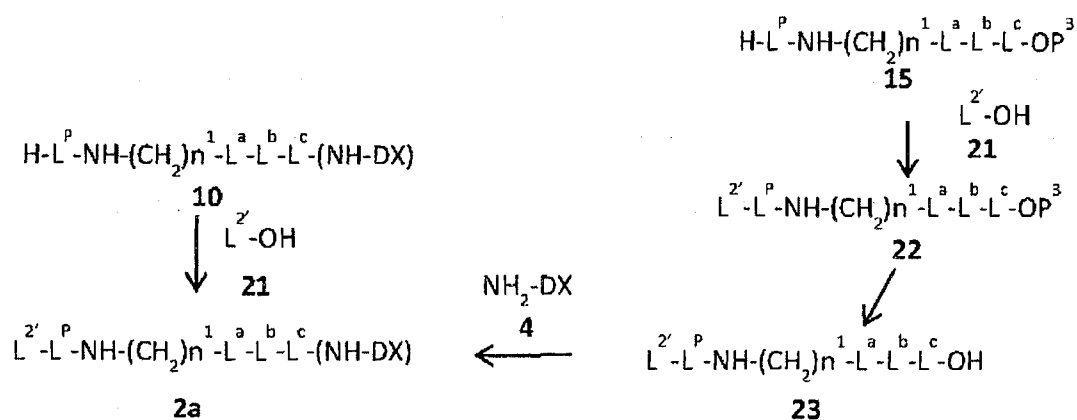
Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy của hợp chất (19) thu được, hợp chất (20) có thể được tạo ra. Quy trình này có thể được thực hiện tương tự với quy trình khử nhóm bảo vệ carboxy để tạo ra hợp chất (14).

Hợp chất (2) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất hợp chất (20) thu được thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc dạng tương tự và cho nó phản ứng với hợp chất (7). Đối với phản ứng này, các chất phản ứng và các điều kiện mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng này có thể được chọn một cách thích hợp từ các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

6. Phương pháp sản xuất 6

Hợp chất trung gian sản xuất (2a) được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 trong đó $L^{2'}$ tương ứng với L^2 có cấu trúc trong đó đầu tận được chuyển hóa thành nhóm mercaptoalkanoyl có thể được tạo ra theo phương pháp sau.

Công thức 62



Hợp chất (2a) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất axit carboxylic (21) có nhóm mercapto tận cùng thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc dạng tương tự và cho nó phản ứng với hợp chất (10). Đối với phản ứng này, các chất phản ứng và các điều kiện mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng

này có thể được chọn một cách thích hợp từ các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (4).

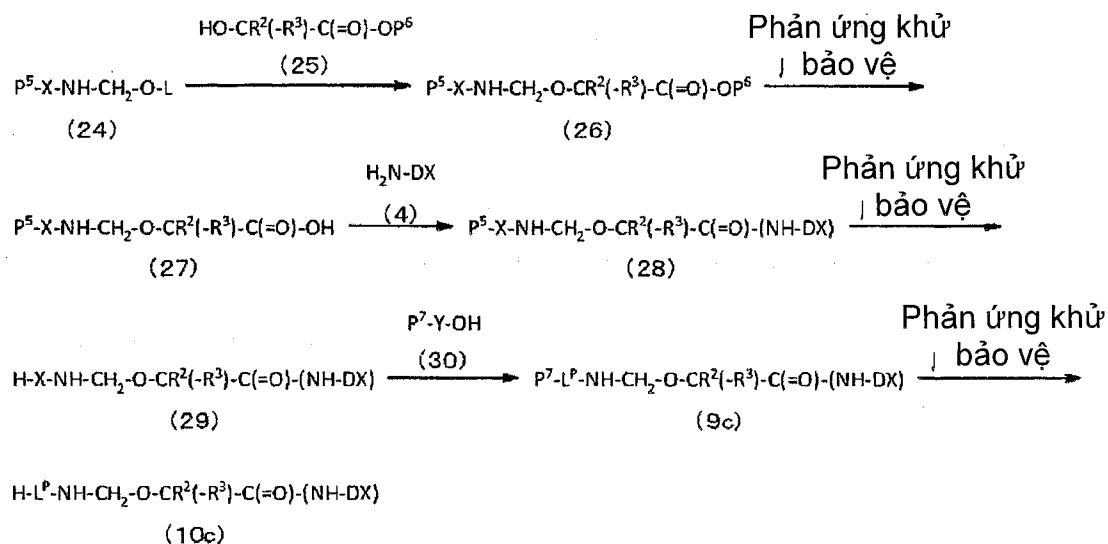
Ngoài ra, hợp chất (23) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất hợp chất (21) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc dạng tương tự, cho nó phản ứng với hợp chất (15), và khử bảo vệ nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy của hợp chất (22) thu được.

Hợp chất (2a) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất hợp chất (23) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc dạng tương tự và cho nó phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ. Đối với phản ứng này, các chất phản ứng và các điều kiện mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng, và các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng này có thể được chọn một cách thích hợp từ các điều kiện phản ứng, chất phản ứng, bazơ, và dung môi trợ được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

7. Phương pháp sản xuất 7

Dưới đây, phương pháp sản xuất hợp chất (10c) có $n^1 = 1$, $L^a = O$, và $L^b = CR^2(-R^3)$ trong hợp chất trung gian sản xuất (10) được mô tả trong phương pháp sản xuất 4 được mô tả chi tiết. Hợp chất có công thức (10c), muối hoặc solvat của chúng có thể tạo ra theo phương pháp sau, chẳng hạn.

Công thức 63



Trong công thức, L^P , R^2 , và R^3 được xác định như nêu trên đây, L biểu thị nhóm axetyl, nguyên tử hydro, hoặc dạng tương tự, mỗi X và Y biểu thị oligopeptit bao gồm từ 1 tới 3 axit amin, mỗi P^5 và P^7 là nhóm bảo vệ đối với nhóm amino, và P^6 là nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy.

Hợp chất có công thức (24) có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hoặc áp dụng phương pháp được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2002-60351 hoặc tài liệu: (J. Org. Chem., Vol. 51, trang 3196, 1986), và nếu cần, bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ hoặc làm biến đổi các nhóm chức. Theo cách khác, hợp chất này cũng có thể thu được bằng cách xử lý axit amin bằng nhóm amino tận cùng được bảo vệ hoặc axit amit của oligopeptit bằng nhóm aminbo được bảo vệ bằng aldehyt hoặc keton.

Bằng cách cho hợp chất (24) phản ứng với hợp chất (25) có nhóm hydroxyl ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ làm lạnh đến nhiệt độ trong phòng trong dung môi trơ với sự có mặt của axit hoặc bazơ, hợp chất (26) có thể được tạo ra. Các ví dụ về axit mà có thể được sử dụng bao gồm axit vô cơ như axit flohydric, axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và axit boric; axit hữu cơ như axit axetic, axit xitric, axit paratoluen sulfonic, và axit metan sulfonic; và axit Lewis như tetrafloroborat, kẽm clorua, thiếc clorua, nhôm clorua, và sắt clorua. Axit paratoluen sulfonic đặc biệt được ưu tiên. Như đối với bazơ được sử dụng, bazơ bất kỳ trong số các bazơ nêu trên có thể được chọn một cách thích hợp và được sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên về chúng 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 cơ kim được đại diện bởi dialkylamino lithi như lithi diisopropylamit; và bazơ cơ kim của bissilylamin như lithi bis(trimetylsilyl)amit. Các ví dụ về dung môi được 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 đối với nhóm amino như được minh họa bằng P^5 không bị giới hạn cụ thể nếu nó là nhóm thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ minh họa bao gồm nhóm bảo vệ đối với nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 4. Tuy nhiên, trong phản ứng này, nhóm bảo vệ đối

với nhóm amino như được minh họa bằng P⁵ có thể được phân tách ra. Trong trường hợp này, cần phải thực hiện phản ứng với chất phản ứng thích hợp cho nhóm bảo vệ amino khi cần.

Hợp chất (27) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P⁶ của hợp chất (26). Trong bản mô tả này, mặc dù các ví dụ tiêu biểu về nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy như được minh họa bằng P⁶ được mô tả trong phương pháp sản xuất 4, trong trường hợp này lại mong muốn là nhóm bảo vệ P⁵ đối với nhóm amino và nhóm bảo vệ P⁶ đối với nhóm carboxy là nhóm bảo vệ mà có thể được loại bỏ bằng phương pháp khác nhau hoặc các điều kiện khác nhau. Chẳng hạn, một ví dụ tiêu biểu bao gồm tổ hợp trong đó P⁵ là nhóm 9-floenylmethyloxy cacbonyl và P⁶ là nhóm benzyl. Nhóm bảo vệ có thể được chọn tùy thuộc vào, ví dụ, các tính chất của hợp chất có nhóm amino và nhóm carboxy được bảo vệ. Để loại bỏ các nhóm bảo vệ, chất phản ứng và các điều kiện được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Hợp chất (29) có thể được tạo ra bằng cách dẫn xuất axit carboxylic (27) thành este hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, halogenua axit, hoặc dạng tương tự và cho nó phản ứng với hợp chất (4) và muối được dụng của nó để tạo ra hợp chất (28) tiếp đó là loại bỏ nhóm bảo vệ P⁵ của hợp chất (28) thu được. Đối với phản ứng giữa hợp chất (4) và axit carboxylic (27) và phản ứng để loại bỏ nhóm bảo vệ P⁶, có thể sử dụng các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng giống như các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng được mô tả đối với Phương pháp sản xuất 4.

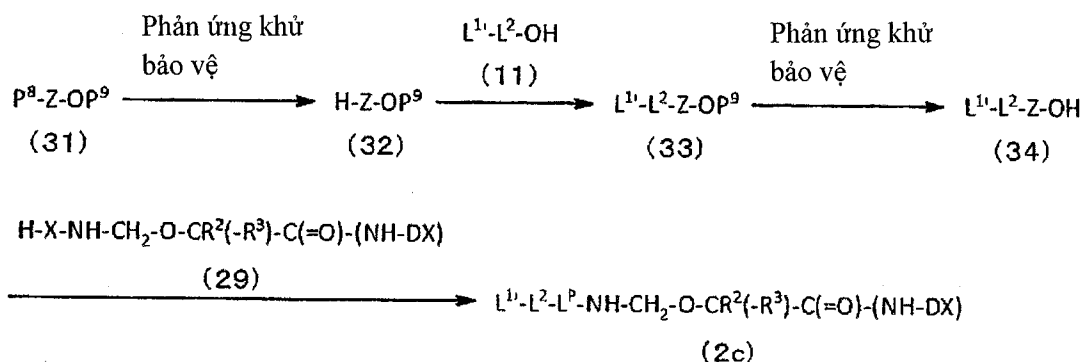
Hợp chất (10c) có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất (29) phản ứng với axit amin có nhóm amino tận cùng được bảo vệ hoặc cho oligopeptit (30) phản ứng với nhóm amino được bảo vệ để tạo ra hợp chất (9c) và loại bỏ nhóm bảo vệ P⁷ của hợp chất (9c) thu được. Nhóm bảo vệ đối với nhóm amino như được minh họa bằng P⁷ không bị giới hạn cụ thể nếu nhóm đó thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ tiêu biểu về chúng bao gồm nhóm bảo vệ đối với nhóm amino mà được mô tả trong phương pháp sản xuất 4. Để loại bỏ nhóm bảo vệ, chất phản ứng và các điều kiện được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ. Đối với phản ứng giữa hợp chất (29) và hợp chất (30), có thể sử dụng các chất phản ứng và các điều kiện mà thường được sử

dùng để tổng hợp peptit. Hợp chất (10c) được tạo ra bằng phương pháp nêu trên có thể được dẫn xuất thành hợp chất (1) theo sáng chế theo phương pháp được mô tả trên đây.

8. Phương pháp sản xuất 8

Dưới đây, phương pháp sản xuất hợp chất (2c) có $n^1 = 1$, $L^a = O$, và $L^b = CR^2(-R^3)$ trong hợp chất trung gian sản xuất (2) được mô tả trong phương pháp sản xuất 4 được mô tả chi tiết. Hợp chất có công thức (2c), muối hoặc solvat của chúng có thể tạo ra theo phương pháp sau, chẳng hạn.

Công thức 64



Trong công thức này, L^1 , L^2 , L^P , R^2 , và R^3 là như được xác định ở trên, Z biểu thị oligopeptit bao gồm từ 1 tới 3 axit amin, P^8 là nhóm bảo vệ đối với nhóm amino, và P^9 là nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy.

Hợp chất (33) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P^8 của axit amin hoặc oligopeptit (31) với nhóm amino và nhóm carboxy tận cùng được bảo vệ để tạo ra hợp chất (32) và cho dạng amin thu được (32) phản ứng với hợp chất (11). Nhóm bảo vệ đối với nhóm amino như được minh họa bằng P^8 không bị giới hạn cụ thể nếu nhóm đó là nhóm thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ tiêu biểu bao gồm nhóm bảo vệ đối với nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 4. Ngoài ra, để loại bỏ nhóm bảo vệ P^8 , chất phản ứng và các điều kiện phản ứng có thể được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ. Đối với phản ứng giữa hợp chất (32) và axit carboxylic (11), có thể sử dụng các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng giống như các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng được mô tả đối với Phương pháp sản xuất 4.

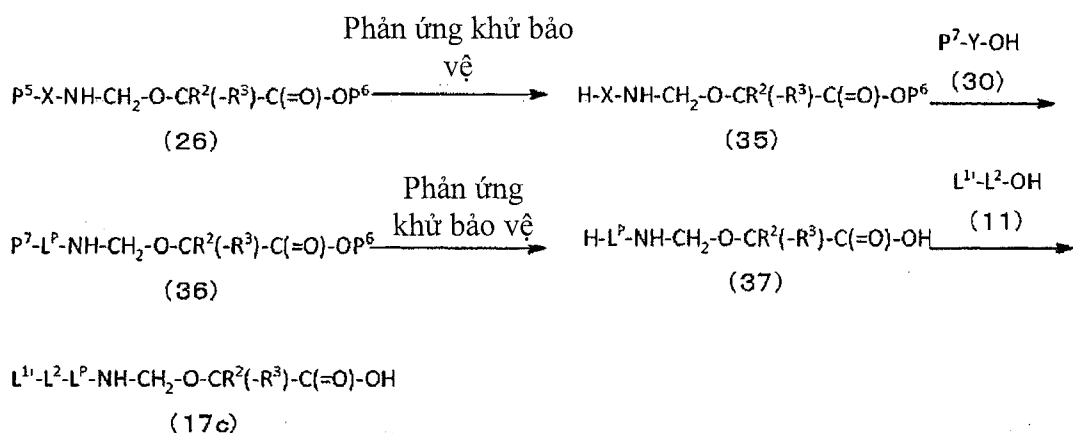
Hợp chất trung gian sản xuất (2c) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P^9 của hợp chất (33) để tạo ra hợp chất (34) và cho axit carboxylic thu được (34)

phản ứng với hợp chất (29). Các ví dụ minh họa về nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy như được minh họa bằng P⁹ được mô tả trong phương pháp sản xuất 4. Đối với phản ứng khử bảo vệ của chúng, có thể sử dụng các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng giống như các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng được mô tả đối với Phương pháp sản xuất 4. Đối với phản ứng giữa hợp chất (29) và axit carboxylic (34), các chất phản ứng và các điều kiện mà thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể được sử dụng. Hợp chất (2c) được tạo ra bằng phương pháp nêu trên có thể được dẫn xuất thành hợp chất (1) theo sáng chế theo phương pháp được mô tả trên đây.

9. Phương pháp sản xuất 9

Dưới đây, phương pháp sản xuất hợp chất (17c) có n¹ = 1, L^a = O, và L^b = CR²(-R³) trong hợp chất trung gian sản xuất (17) được mô tả trong phương pháp sản xuất 4 được mô tả chi tiết. Hợp chất có công thức (17c), muối hoặc solvat của nó cũng có thể được tạo ra theo phương pháp sau, chẳng hạn.

Công thức 65



Trong công thức này, L¹, L², L^p, R², R³, X, Y, P⁵, P⁶, và P⁷ là như được xác định ở trên.

Hợp chất (36) có thể được tạo ra bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ P⁵ đối với nhóm amino của hợp chất (26) với nhóm tận cùng amino được bảo vệ và nhóm carboxy để tạo ra hợp chất (35) và cho dạng amin thu được phản ứng với (35) với oligopeptit (30) với nhóm tận cùng amino được bảo vệ hoặc nhóm amino được bảo vệ. Nhóm bảo vệ đối với nhóm amino như được minh họa bằng P⁵ không bị giới hạn cụ thể nếu nhóm đó là nhóm thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ tiêu biểu bao gồm

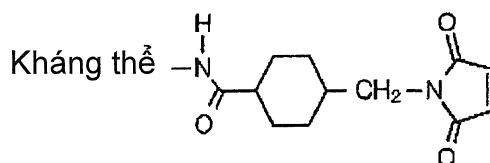
nhóm bảo vệ đối với nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 4. Ngoài ra, để loại bỏ nhóm bảo vệ P⁵, các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng có thể được chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ. Trong bản mô tả này, mặc dù các ví dụ tiêu biểu về nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy như được minh họa bằng P⁶ và nhóm bảo vệ đối với nhóm amino như được minh họa bằng P⁷ bao gồm nhóm bảo vệ đối với nhóm carboxy và nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 4, vẫn mong muốn rằng nhóm bảo vệ P⁶ đối với nhóm carboxy và nhóm bảo vệ P⁷ đối với nhóm amino là các nhóm bảo vệ mà có thể được loại bỏ theo cùng một phương pháp hoặc các điều kiện giống nhau. Chẳng hạn, một ví dụ tiêu biểu bao gồm tổ hợp trong đó P⁶ là nhóm benzyl este và P⁷ là nhóm benzyloxy cacbonyl.

Hợp chất (37) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P⁶ đối với nhóm carboxy của hợp chất (36) và nhóm bảo vệ P⁷ đối với nhóm amino của hợp chất (36). Hợp chất (37) cũng có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ lần lượt nhóm bảo vệ P⁶ đối với nhóm carboxy và nhóm bảo vệ P⁷ đối với nhóm amino, hoặc hợp chất (37) có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ cả hai nhóm bảo vệ P⁶ và P⁷ mà có thể được loại bỏ theo cùng một phương pháp hoặc các điều kiện giống nhau.

Hợp chất (17c) có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất thu được (37) phản ứng với hợp chất (11). Đối với phản ứng giữa hợp chất (37) và hợp chất (11), có thể sử dụng các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng giống như các chất phản ứng và các điều kiện phản ứng được mô tả đối với Phương pháp sản xuất 4.

Theo như trên đây, hợp chất này có công thức sau:

Công thức 66



được mô tả là hợp chất trung gian sản xuất hữu ích để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế. Ngoài ra, nhóm các hợp chất có công thức sau:



cũng là các hợp chất nhằm làm hợp chất trung gian sản xuất hữu ích để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế.

Đặc biệt, trong công thức trên đây, Q là (maleimide-N-yl)-, HS-, X-CH₂-C(=O)-NH-, hoặc (pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-,

X là nguyên tử brom hoặc nguyên tử iot,

n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8,

L^{2a} biểu thị -NH-(CH₂-CH₂-O)^{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)- hoặc liên kết đơn,

trong đó n⁵ là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P biểu thị gốc peptit bao gồm từ 2 đến 7 axit amin,

n¹ là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^a biểu thị -C(=O)-NH-, -NR¹-(CH₂)^{n⁷}-, -O-, hoặc liên kết đơn,

trong đó n⁷ là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, R¹ biểu thị nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, -(CH₂)^{n⁸}-COOH, hoặc -(CH₂)^{n⁹}-OH, n⁸ là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n⁹ là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

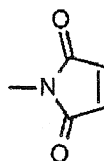
L^b biểu thị -CR²(-R³)-, -O-, -NR⁴-, hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R² và R³ độc lập là nguyên tử hydro, nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, -(CH₂)^{n^a}-NH₂, -(CH₂)^{n^b}-COOH, hoặc -(CH₂)^{n^c}-OH, R⁴ biểu thị nguyên tử hydro hoặc nhóm alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, n^a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6, n^b là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, n^c là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, với điều kiện khi n^a bằng 0, thì R² và R³ không giống nhau,

L^c biểu thị -CH₂- hoặc -C(=O)-,

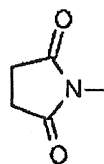
(maleimide-N-yl)- là nhóm có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 67



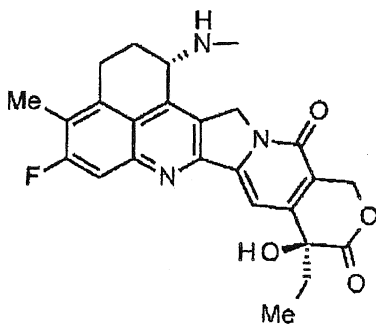
(trong công thức này, nguyên tử nitơ là vị trí nối), (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)- là nhóm có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 68



(trong công thức này, nguyên tử nitơ là vị trí nối), -(NH-DX) là nhóm có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:

Công thức 69



(trong công thức này, nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí nối).

Hợp chất trong đó L^c là $-C(=O)-$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất.

Như đối với gốc peptit của L^P , hợp chất của gốc axit amin bao gồm axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitruilin, serin, axit glutamic, và axit aspartic được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Trong số các gốc peptit này, hợp chất trong đó L^P là gốc peptit bao gồm 4 axit amin được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Đặc biệt hơn, hợp chất trong đó L^P là $-GGFG-$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất.

Ngoài ra, như đối với $-NH-(CH_2)_n-L^a-L^b-$, hợp chất của $-NH-CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, hoặc $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Hợp chất của $NH-CH_2CH_2CH_2-$, $-NH-CH_2-O-CH_2-$, hoặc $-NH-(CH_2)_2-O-CH_2-C(=O)-$ được ưu tiên hơn.

Như đối với n^Q , hợp chất trong đó nó là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 6 được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất.

Hợp chất trong đó L^{2a} là liên kết đơn hoặc n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 4 được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất.

Khi Q là (maleimide-N-yl)-, hợp chất trong đó n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, L^{2a} là liên kết đơn, và $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ là $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Hợp chất trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ là $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ được ưu tiên hơn. Hợp chất trong đó n^Q là số nguyên bằng 2 hoặc 5 cũng được ưu tiên.

Ngoài ra, khi Q là (maleimide-N-yl)-, hợp chất trong đó n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, L^{2a} là $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})n^5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 4, và $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ là $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Hợp chất trong đó n^5 là số nguyên bằng 2 hoặc 4 được ưu tiên hơn. Hợp chất trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ là $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ cũng được ưu tiên.

Khi Q là HS-, hợp chất trong đó n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, L^{2a} là liên kết đơn, và $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ là $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Hợp chất trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ là $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ được ưu tiên hơn.

Khi Q là $\text{X}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$, hợp chất trong đó X là nguyên tử brom được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Hợp chất trong đó n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8 được ưu tiên, đồng thời hợp chất trong đó L^{2a} là liên kết đơn được ưu tiên, và hợp chất trong đó $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-L^b-$ là $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NH}-$

$\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, hoặc $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất.

Khi Q là (pyrrolidin-2,5-dion-N-yl)-O-C(=O)-, hợp chất trong đó n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, L^{2a} là liên kết đơn, và $\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$ là $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, hoặc $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất. Hợp chất trong đó $\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-}$ là $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, hoặc $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ được ưu tiên hơn.

Đặc biệt hơn, các hợp chất sau là hợp chất được ưu tiên dùng làm hợp chất trung gian sản xuất.

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

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

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

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

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

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

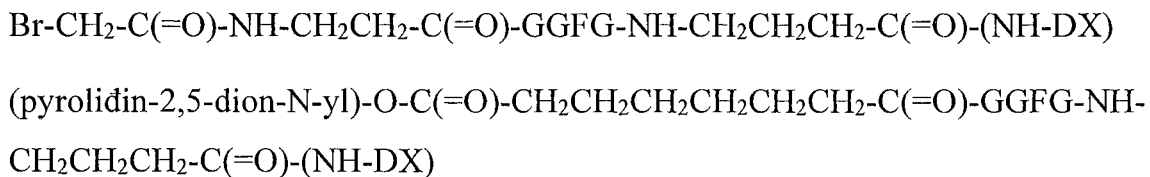
(maleimit-N-yl)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-(NH-DX)}$

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

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

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

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



Trong khi đó, nếu thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế còn trong không khí hoặc được tái kết tinh, thì nó có thể hấp thu hơi ẩm để có sự hấp thu nước hoặc biến đổi thành hydrat, và sáng chế cũng bao gồm hợp chất như vậy và muối chứa nước.

Sáng chế cũng bao gồm hợp chất đã đánh dấu bằng các chất đồng vị phóng xạ hoặc không phóng xạ khác nhau. Một hoặc nhiều nguyên tử cấu thành thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế có thể chứa chất đồng vị nguyên tử với tỷ lệ không tự nhiên. Các ví dụ về chất đồng vị nguyên tử bao gồm đơteri (^2H), triti (^3H), iot-125 (^{125}I), và cacbon-14 (^{14}C). Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được đánh dấu phóng xạ bằng chất đồng vị phóng xạ như triti (^3H), iot-125 (^{125}I), cacbon-14 (^{14}C), đồng-64 (^{64}Cu), zirconi -89 (^{89}Zr), iot-124 (^{124}I), flo-18 (^{18}F), indi-111 (^{111}I), cacbon-11 (^{11}C) và iot-131 (^{131}I). Hợp chất đã đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ hữu ích làm chất điều trị hoặc phòng ngừa bệnh, chất phản ứng dùng cho nghiên cứu như chất phản ứng thử nghiệm và chất dùng cho chẩn đoán như chất hiện ảnh chẩn đoán *in vivo*. Không liên quan tới tính phóng xạ, loại biến thể đồng vị bất kỳ của thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuốc

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

Ví dụ về các loại bệnh ung thư mà thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế được áp dụng vào bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư đường tiết niệu, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư vú, u hắc sắc tố, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, hoặc bệnh ung thư thực quản, tuy nhiên, các loại bệnh ung thư không bị giới hạn ở các bệnh này, miễn là nó là tế bào

ung thư biểu hiện, trong tế bào ung thư để làm đối tượng điều trị, protein mà kháng thể trong thể liên hợp kháng thể-thuốc có thể nhận diện.

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

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

Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế có thể được dùng để làm dược phẩm chứa ít nhất một dược chất thích hợp.

Ví dụ, dược phẩm nêu trên thường chứa ít nhất một chất mang dược (ví dụ, chất lỏng dược khử trùng). Ví dụ, nước và dầu (dầu mỏ và dầu có nguồn gốc từ động vật, có nguồn gốc từ thực vật, hoặc có nguồn gốc tổng hợp (dầu này có thể là, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, dầu vừng hoặc dầu tương tự). Nước là chất mang đặc thù hơn khi dược phẩm nêu trên được sử dụng qua tĩnh mạch. Dung dịch nước muối, dung dịch nước dextroza, và dung dịch nước glyxerol cũng có thể được dùng ở dạng chất mang dạng lỏng, đặc biệt là, dùng cho dung dịch tiêm. Chất dẫn dược thích hợp là đã biết trong lĩnh vực này. Nếu muốn, dược phẩm trên đây còn có thể chứa một lượng nhỏ chất làm ẩm, chất nhũ hóa, hoặc chất đệm pH. Các ví dụ về chất mang dược thích hợp được bộc lộ trong "Remington's Pharmaceutical Sciences" của E. W. Martin. Các dược phẩm này tương ứng với chế độ sử dụng.

Các hệ phân phối khác nhau là đã biết và chúng có thể được sử dụng để dùng thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế. Các ví dụ về đường dùng bao gồm các đường dùng trong da, trong màng nhầy, trong màng bụng, qua tĩnh mạch, và dưới da, nhưng không bị giới hạn ở đó. Việc dùng có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, tiêm hoặc tiêm liều cao. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, việc dùng thể liên hợp kháng thể-thuốc được thực hiện bằng cách tiêm. Dùng ngoài đường tiêu hóa là đường dùng được ưu tiên.

Theo một phương án tiêu biểu, dược phẩm được kê, dưới dạng dược phẩm thích hợp để cho người dùng qua tĩnh mạch, theo các quy trình thông thường. Dược phẩm để dùng qua tĩnh mạch thường là dung dịch trong dung dịch đệm chứa nước vô trùng và đẳng trương. Nếu cần, thuốc có thể chứa chất làm hòa tan và chất gây mê cục bộ để làm giảm đau ở vị trí tiêm (ví dụ, lignocain). Thông thường, thành phần trên đây được cấp riêng biệt ở dạng bất kỳ trong số bột đông khô nhanh hoặc phần cô khan được chứa trong bình chứa thu được bằng cách bịt kín trong ống thuốc tiêm hoặc gói nhỏ có một lượng hoạt chất hoặc ở dạng hỗn hợp ở dạng đơn vị liều lượng. Khi thuốc được dùng bằng cách tiêm, nó có thể được sử dụng từ ống tiêm chứa nước hoặc nước muối có bậc dược vô trùng. Khi thuốc được dùng bằng cách tiêm, ống thuốc tiêm chứa nước hoặc nước muối vô trùng dùng để tiêm có thể được cấp sao cho các thành phần nêu trên được trộn lẫn với với nhau trước khi dùng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể là dược phẩm chỉ chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc và ít nhất một chất điều trị bệnh ung thư khác với thể liên hợp này. Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với chất điều trị bệnh ung thư khác. Do đó, tác dụng kháng ung thư có thể được tăng cường. Một chất kháng ung thư khác được dùng nhằm mục đích này có thể được cho từng cá thể dùng một cách đồng thời, riêng rẽ, hoặc tuần tự với thể liên hợp kháng thể-thuốc, và nó có thể được sử dụng trong khi thay đổi khoảng cách dùng đối với từng cá thể. Các ví dụ về chất điều trị bệnh ung thư gồm abraxan, carboplatin, xisplatin, gemxitabin, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinorelbin, các thuốc được mô tả trong Công bố quốc tế số WO 2003/038043, các chất đồng đẳng LH-RH (leuprorelin, goserelin, hoặc chất tương tự), estramustin phosphat, chất đối kháng estrogen (tamoxifen, raloxifen, hoặc chất tương tự), và chất ức chế aromataza (anastrozol, letrozol, exemestan, hoặc chất tương tự), nhưng chúng không bị giới hạn, miễn là chúng là thuốc có hoạt tính kháng khối u.

Dược phẩm có thể được bào chế thành chế phẩm đông khô nhanh hoặc chế phẩm dạng lỏng để làm dược phẩm có hợp phần được mong đợi và độ tinh khiết được yêu cầu. Khi được bào chế dưới dạng chế phẩm đông khô nhanh, nó có thể là chế phẩm chứa các chất phụ gia bào chế thích hợp mà được sử dụng trong lĩnh vực này. Tương

tự đối với chế phẩm dạng lỏng, nó có thể được bào chế thành chế phẩm dạng lỏng chứa các chất phụ gia bào chế khác nhau được sử dụng trong lĩnh vực này.

Hợp phần và nồng độ của dược phẩm có thể thay đổi tùy thuộc vào phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thể liên hợp kháng thể-thuốc có trong dược phẩm theo sáng chế có thể có tác dụng dược lý ngay cả với liều lượng nhỏ khi thể liên hợp kháng thể-thuốc có ái lực cao hơn đối với kháng nguyên, tức là, ái lực cao hơn (= trị số Kd thấp hơn) theo hằng số phân ly (tức là, trị số Kd) đối với kháng nguyên. Do vậy, để xác định liều lượng thể liên hợp kháng thể-thuốc, liều lượng này có thể được xác định theo tình trạng liên quan đến ái lực giữa thể liên hợp kháng thể-thuốc và kháng nguyên. Khi thể liên hợp kháng thể-thuốc theo sáng chế được dùng cho người, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100 mg/kg có thể được dùng một lần hoặc được dùng vài lần trong khoảng thời gian từ 1 đến 180 ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả cụ thể trên cơ sở các ví dụ được thể hiện dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, sáng chế không bao giờ giải thích theo nghĩa giới hạn. Ngoài ra, trừ khi có quy định khác, chất phản ứng, dung môi, và nguyên liệu ban đầu được mô tả trong bản mô tả này có thể thu được một cách dễ dàng từ nhà cung cấp thương mại.

Ví dụ tham chiếu 1: kháng thể M30-H1-L4

Trong số các kháng thể được biến đổi giống như của người của kháng thể kháng B7-H3, kháng thể bao gồm chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được mô tả trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 16 được sản xuất theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra kháng thể kháng B7-H3 được biến đổi giống như của người được ký hiệu là kháng thể M30-H1-L4 (hoặc gọi tắt là "M30-H1-L4").

Ví dụ tham chiếu 2: kháng thể M30-H1-L4P

Điều hòa sự cải biến của glycan liên kết với kháng thể M30-H1-L4 thu được ở trên bằng cách khử fucoza hóa theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra

kháng thể có cải biến đã được điều hòa của glycan được ký hiệu là kháng thể M30-H1-L4P (hoặc gọi tắt là "M30-H1-L4P").

Ví dụ tham chiếu 3: Kháng thể kháng CD30

Kháng thể kháng CD30 được sản xuất dựa theo Công bố pha quốc gia của đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số 2005-506035. Trình tự của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28.

Ví dụ tham chiếu 4: Kháng thể kháng CD33

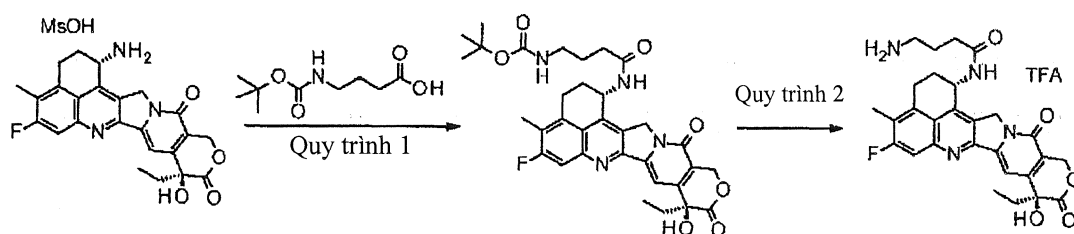
Kháng thể kháng CD33 được sản xuất dựa theo Công bố xin cấp patent Nhật Bản số 8-48637. Trình tự của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Ví dụ tham chiếu 5: Kháng thể kháng CD70

Kháng thể kháng CD70 được sản xuất dựa theo công bố pha quốc gia của đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số 2008-538292. Trình tự của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 31 và SEQ ID NO: 32.

Ví dụ 1: 4-Amino-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]butanamit

Công thức 70



Quy trình 1: Tert-butyl (4-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-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

Hòa tan axit 4-(Tert-butoxycarbonylamino)butanoic (0,237g, 1,13mmol) trong điclorometan (10mL), bổ sung N-hydroxysuccinimit (0,130g, 1,13mmol) và 1-etyl-3-(3-đimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua (0,216g, 1,13mmol) vào, và khuấy trong 1 giờ. Bổ sung từng giọt dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit

(10mL) đã nạp mesylat của hợp chất (4) (0,500g, 0,94mmol) và triethylamin (0,157mL, 1,13mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 ngày. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,595g, định lượng).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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), 1,82-1,89 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t, J=6,5 Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, J=6,3 Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,40 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (APCI) m/z: 621 (M+H)⁺

Quy trình 2: 4-Amino-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]butanamit

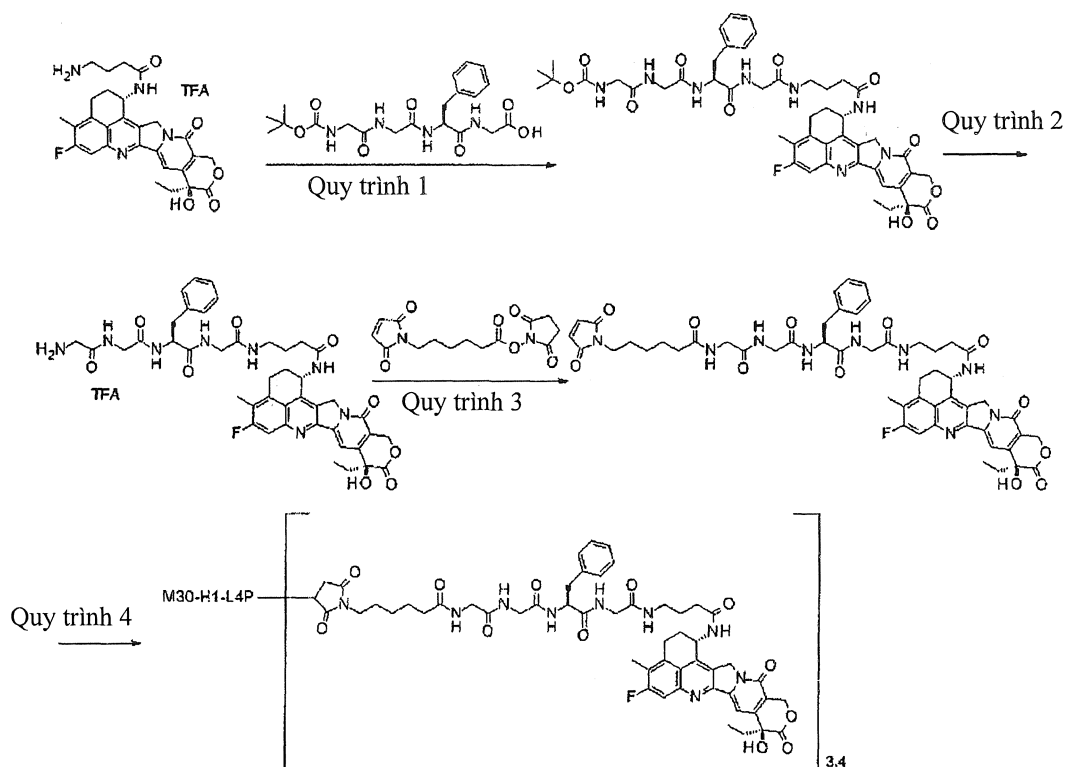
Hòa tan hợp chất (0,388g, 0,61mmol) thu được trong quy trình 1 nêu trên trong điclometan (9mL). Bổ sung axit trifloaxetic (9mL) vào và khuấy nó trong 4 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - lớp hữu cơ được tách của clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] để tạo ra trifloaxetat của hợp chất nêu trong tiêu đề (0,343g, định lượng). Hợp chất này được xác nhận trong khối u của chuột nhắt mang bệnh ung thư nhận thể liên hợp kháng thể-thuốc (13) hoặc (14).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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)⁺

Ví dụ 2: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (1)

Công thức 71



Quy trình 1: N-(tert-butoxycacbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-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

Hòa tan N-(Tert-butoxycacbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanylglyxin (0,081g, 0,19mmol) trong điclometan (3mL), bổ sung N-hydroxysuccinimit (0,021g, 0,19mmol) và 1-etyl-3-(3-đimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua (0,036g, 0,19mmol) vào và sau đó khuấy trong 3,5 giờ. Bổ sung từng giọt dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (1,5mL) đã nạp hợp chất (0,080g, 0,15mmol) trong Ví dụ 1, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cần thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,106g, 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 2: 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 trifloaxetat

Hòa tan hợp chất (1,97g, 2,10mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên trong điclorometan (7mL). Sau khi bổ sung axit trifloaxetic (7mL), khuấy nó trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, và hỗn hợp được nạp toluen để chưng cất đồng sôi. Tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - lớp hữu cơ được tách của clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (1,97g, 99%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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 3: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]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

Bổ sung trietylamin (44,3mL, 0,318mmol) và N-succinimidyl 6-maleimit hexanoat (119,7mg, 0,388mmol) vào dung dịch N,N-dimetyl-formamit (1,2mL) chứa

hợp chất (337mg, 0,353mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 5 : 1 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (278,0mg, 76%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,66-1,76 (2H, m), 1,80-1,91 (2H, m), 2,05-2,21 (6H, m), 2,39 (3H, s), 2,79 (1H, dd, J=14,0, 9,8 Hz), 2,98-3,21 (5H, m), 3,55-3,77 (8H, m), 4,41-4,48 (1H, m), 5,15 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,9 Hz), 5,40 (1H, d, J=17,1 Hz), 5,44 (1H, d, J=17,1 Hz), 5,54-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,20-7,27 (5H, m), 7,30 (1H, s), 7,70 (1H, t, J=5,5 Hz), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,8 Hz), 8,08 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,14 (1H, d, J=7,9 Hz), 8,25 (1H, t, J=6,1 Hz), 8,46 (1H, d, J=8,5 Hz).

MS (APCI) m/z: 1032 (M+H)⁺

Quy trình 4: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (1)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,025mL; 3,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là 7,4 ± 0,1, thì khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,109mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 ở trên (0,039mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung

dung dịch nước (0,008mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy ở nhiệt độ trong phòng để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc trong 20 phút nữa.

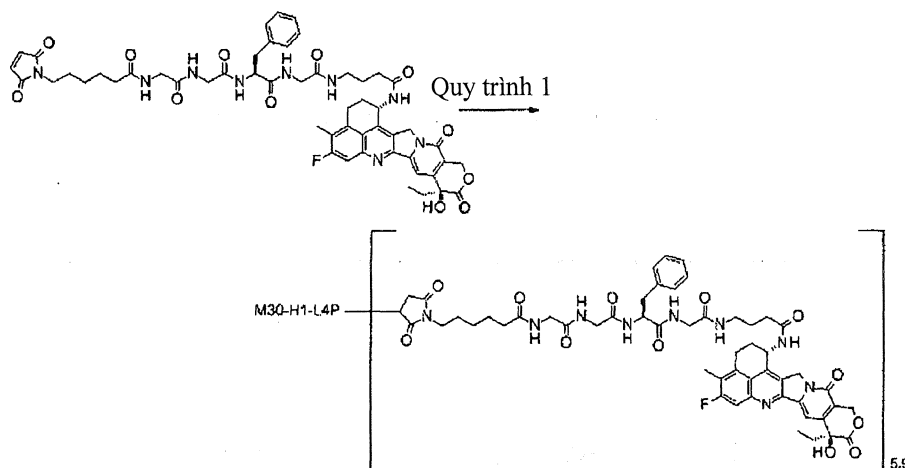
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 13,02mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,1mg (73%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 3: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (2)

Công thức 72



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (2)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch

(4,0mL) vào ống 15mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,118mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,200mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, thì khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút ở nhiệt độ 22°C , bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit (0,236mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 trong Ví dụ 2 vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,00471mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

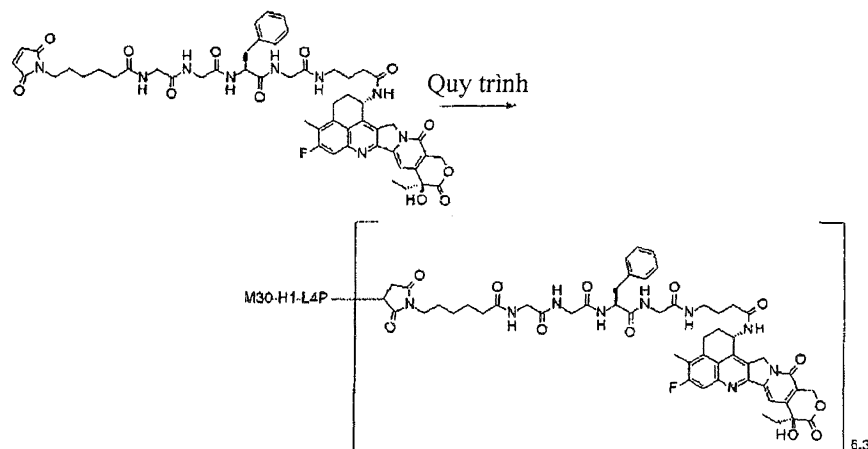
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 17,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,80mg/mL, hiệu suất kháng thể: 26,1mg (65%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,9.

Ví dụ 4: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (3)

Công thức 73



Quy trình 1: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (3)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ làm hệ số hấp thu ở 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,051mL; 6,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là 7,4 ± 0,1, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,067mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 (0,085mL; 10,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,013mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

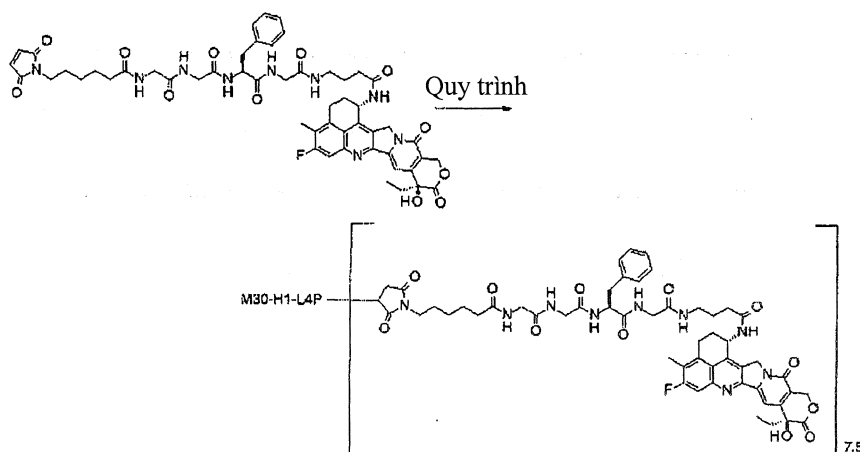
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,67mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,02mg (80%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,3.

Ví dụ 5: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (4)

Công thức 74



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (4)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thụ ở 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,051mL; 6,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydrophosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có

độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,025mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 (0,127mL; 15,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,019mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

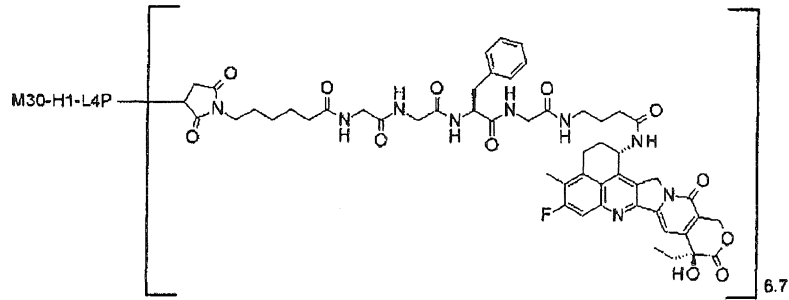
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,19mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,14mg (57%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,5.

Ví dụ 6: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (5)

Công thức 75

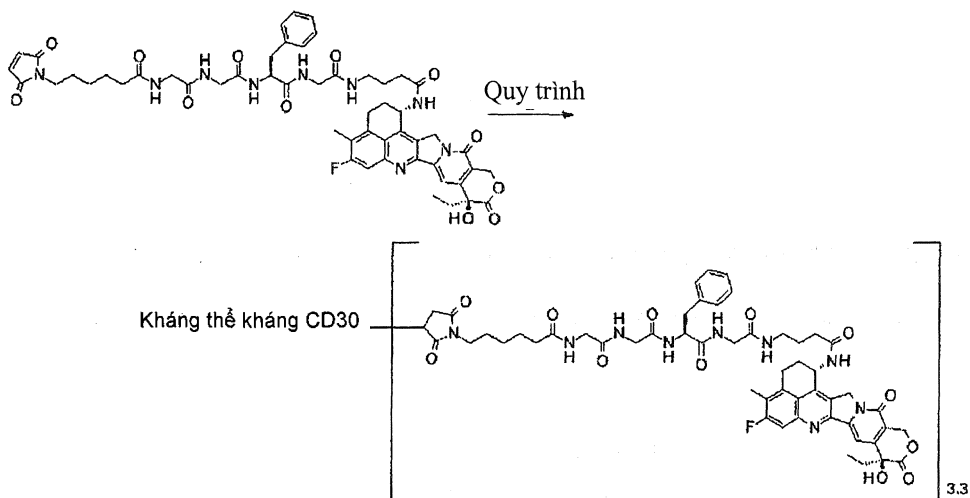


Trộn hầu như toàn bộ lượng thể liên hợp kháng thể-thuốc của Ví dụ 4 và 5 và cô đọng dịch theo Quy trình chung A để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 15,37mg, và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,7.

Ví dụ 7: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (6)

Công thức 76



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (6)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD30 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,75 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gôm dung dịch (1,0mL) vào ống 2mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0297mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác

nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch ở nhiệt độ 22°C trong 10 phút, bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit (0,0593mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0119mL; 18,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

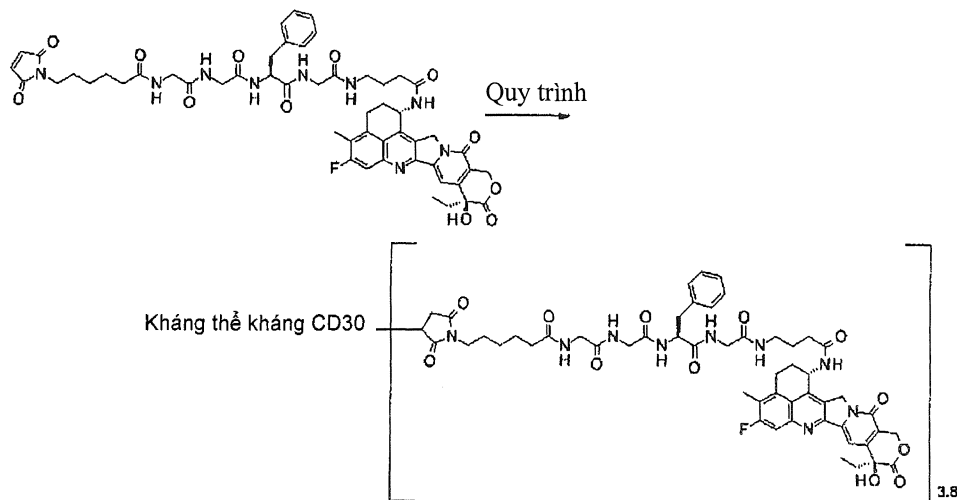
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 270400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,99mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,94mg (59%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,3.

Ví dụ 8: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (7)

Công thức 77



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

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD30 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,75 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch (1,0mL) vào ống 2mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 30mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0148mL; 6,9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch trong 10 phút ở nhiệt độ 22°C, bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit (0,0297mL; 13,8 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 30mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 vào và ủ trong 40 phút ở nhiệt độ 22°C để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0178mL; 27,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

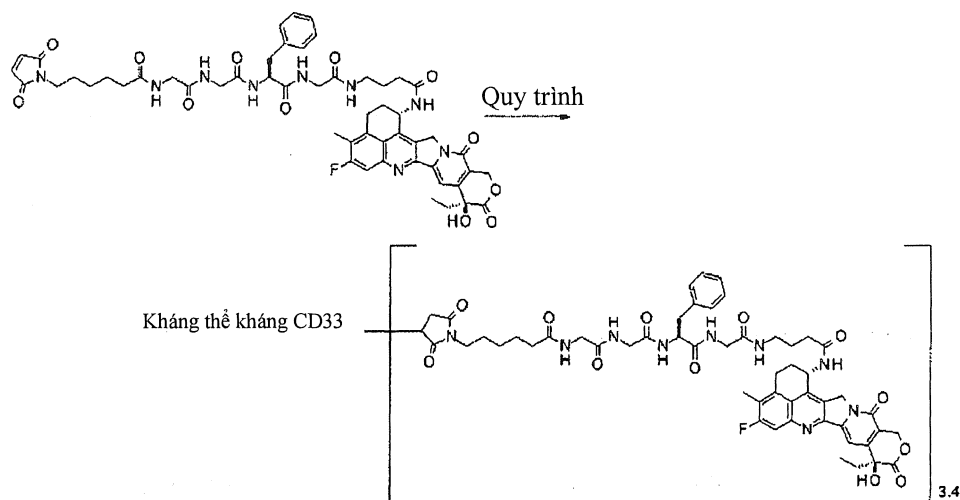
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 270400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,99mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,94mg (59%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,8.

Ví dụ 9: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (8)

Công thức 78



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (8)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD33 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 4 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,66 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch (1,0mL) vào ống 2mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0297mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút ở nhiệt độ 22°C, bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit (0,0593mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0119mL; 18,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

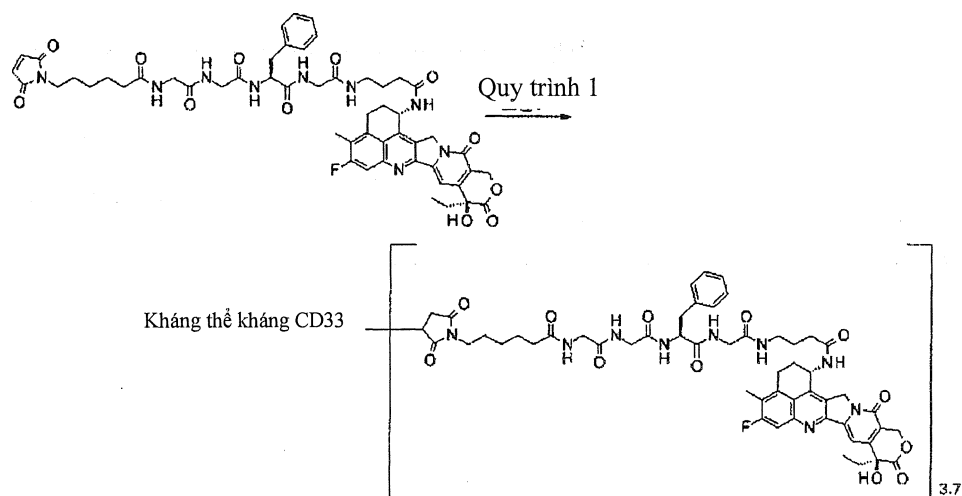
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 256400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,06mg/mL, hiệu suất kháng thể: 6,36mg (64%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 10: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (9)

Công thức 79



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (9)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD33 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 4 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,66 để làm hệ số hấp thụ ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gôm dung dịch (1,0mL) vào ống 2mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 30mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0148mL; 6,9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch ở trên trong 10 phút ở nhiệt độ 22°C, bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit (0,0297mL; 13,8 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 30mM của hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0178mL; 27,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

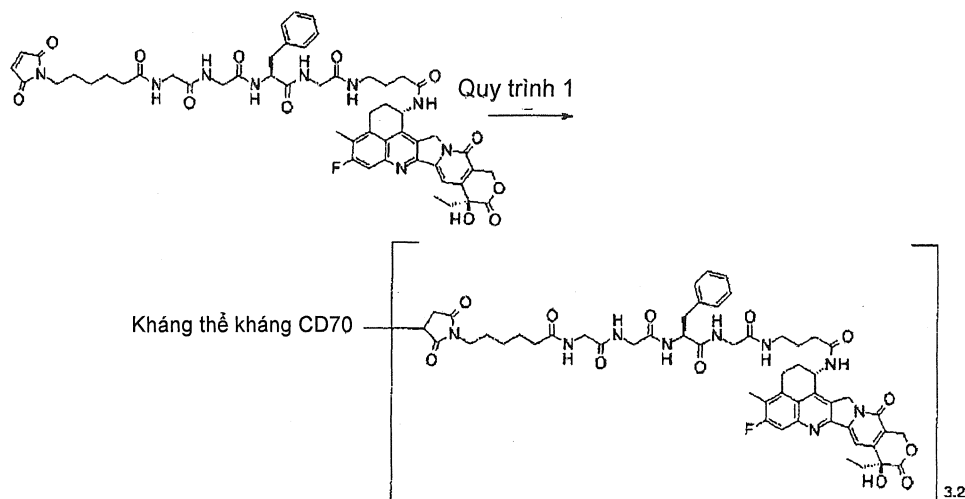
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 256400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,95mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,70mg (57%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

Ví dụ 11: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (10)

Công thức 80



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

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD70 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 5 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,69 để làm hệ số hấp thụ ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch (1,0mL) vào ống 2mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0297mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch nêu trên ở nhiệt độ 22°C trong 10 phút, bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit (0,0593mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0119mL; 18,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

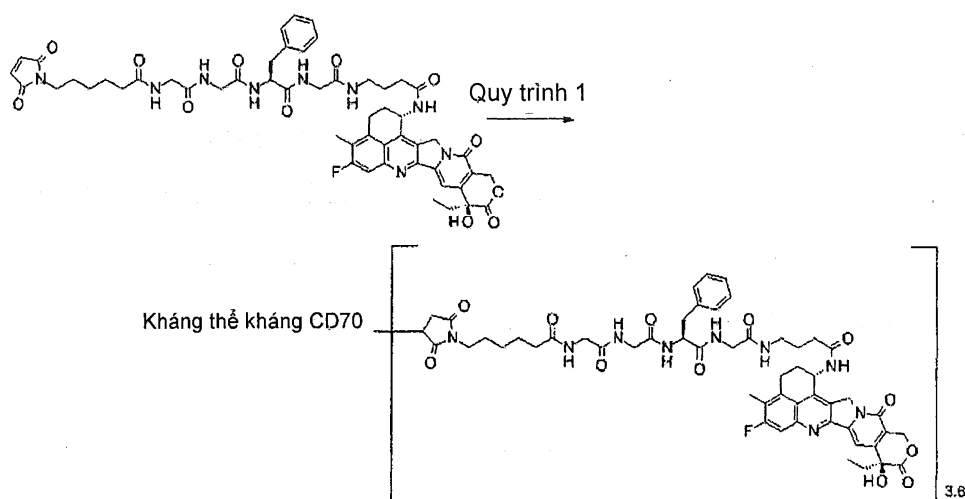
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 262400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,00mg/mL, hiệu suất kháng thể: 6,00mg (60%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,2.

Ví dụ 12: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (11)

Công thức 81



Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (11)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD70 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 5 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,69 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch (1,0mL) vào ống 2mL và nạp dung dịch nước chứa TCEP 30mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0148mL; 6,9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch nêu trên ở nhiệt độ 22°C trong 10 phút, bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit (0,0297mL; 13,8 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 30mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 2 vào và ủ trong 40 phút ở nhiệt độ 22°C để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0178mL; 27,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

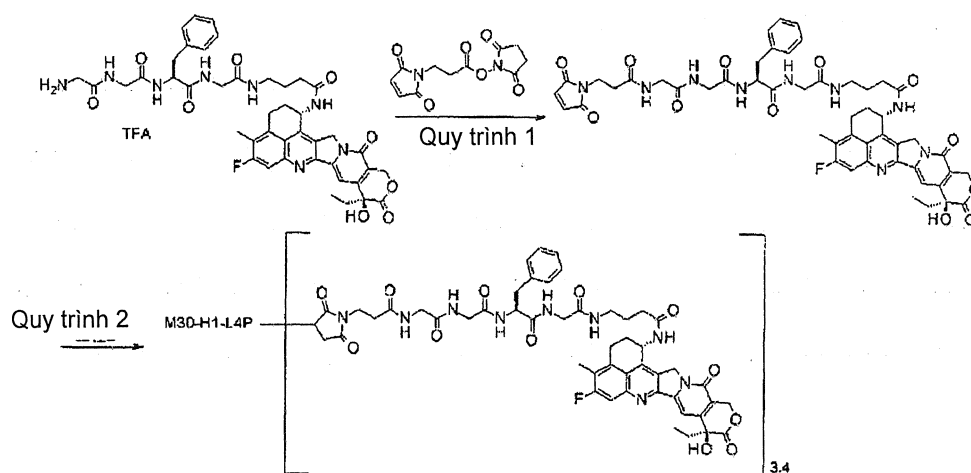
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 262400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,96mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,76mg (58%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,6.

Ví dụ 13: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (12)

Công thức 82



Quy trình 1: N-[3-(2,5-đioxo-2,5-đihydro-1H-pyrol-1-yl)propanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-

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

Cho hợp chất (80mg, 0,084mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 2 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-succinimidyl 3-maleiminit propioat (24,6mg, 0,0924mmol) thay cho N-succinimidyl 6-maleiminit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (60,0mg, 73%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,89 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,70-1,78 (2H, m), 1,81-1,94 (2H, m), 2,12-2,23 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,81 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,01-3,15 (3H, m), 3,16-3,23 (2H, m), 3,30-3,35 (1H, m), 3,58-3,71 (6H, m), 3,71-3,79 (1H, m), 4,44-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,0 Hz), 5,27 (1H, d, J=19,0 Hz), 5,43 (1H, d, J=17,6 Hz), 5,47 (1H, d, J=17,6 Hz), 5,57-5,63 (1H, m), 6,56 (1H, s), 7,02 (2H, s), 7,17-7,22 (1H, m), 7,22-7,30 (5H, m), 7,34 (1H, s), 7,73 (1H, t, J=5,6 Hz), 7,83 (1H, d, J=10,7 Hz), 8,08 (1H, t, J=5,6 Hz), 8,15 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,30 (2H, dt, J=18,7, 5,7 Hz), 8,49 (1H, d, J=8,8 Hz).

MS (APCI) m/z: 990 (M+H)⁺

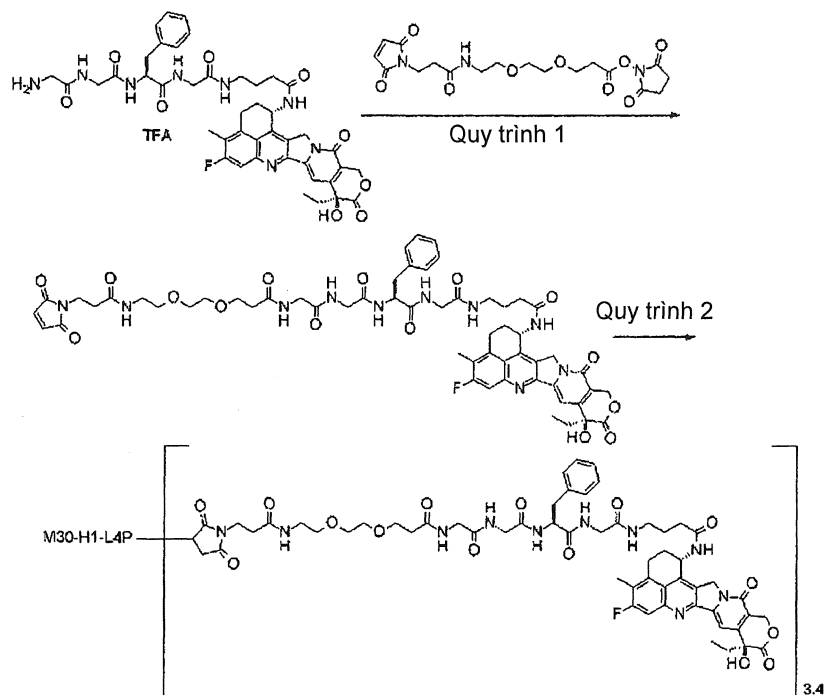
Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (12)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 1 nêu trên, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 4 của Ví dụ 2.

Nồng độ kháng thể: 12,16mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,5mg (68%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 14: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (13)

Công thức 83



Quy trình 1: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-đioxa-2,5-đihydro-1H-pyrol-1-yl)propanoyl]amino}etoxy)etoxy]propanoyl}glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxa-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

Cho hợp chất (100mg, 0,119mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 2 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng diisopropyletylamin (20,8μL, 0,119mmol) thay cho trietylamin và N-succinimidyl 3-(2-(2-(3-maleinimitpropanamit)etoxy)etoxy)propanoat (50,7mg, 0,119mmol) thay cho N-succinimidyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (66,5mg, 48%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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 ($M+H$)⁺

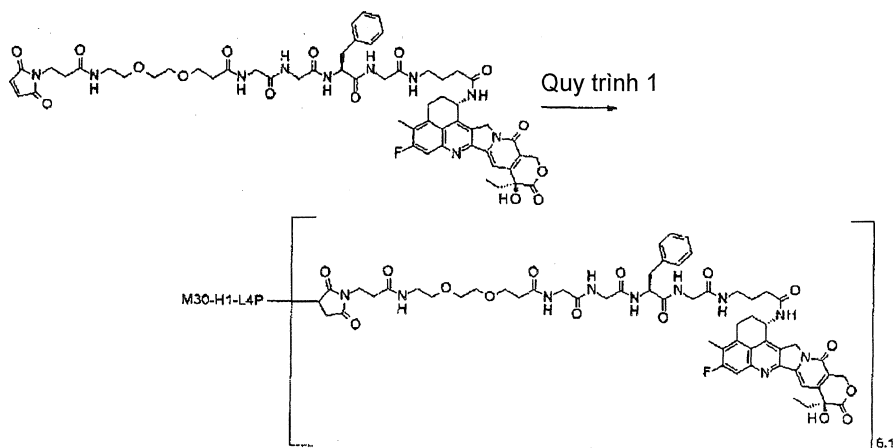
Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (13)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 1, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 4 của Ví dụ 2.

Nồng độ kháng thể: 12,76mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,9mg (71%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 15: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (14)

Công thức 84



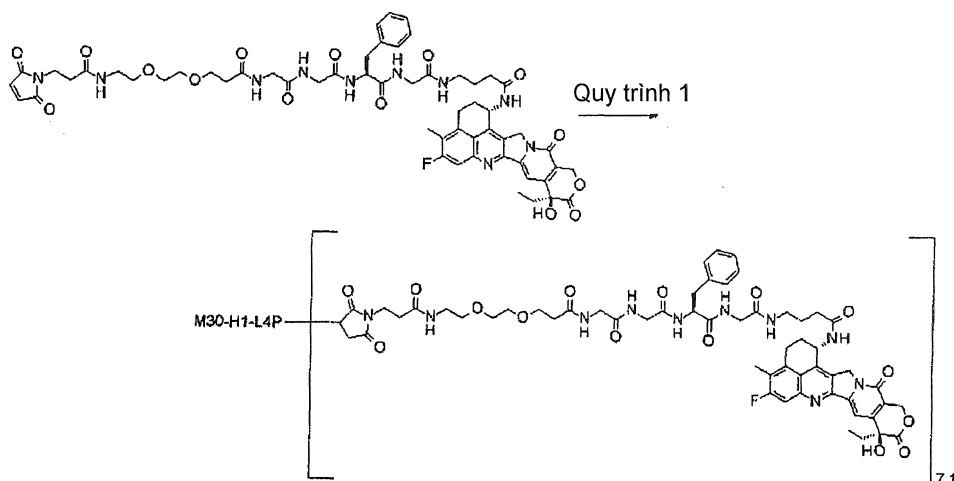
Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (14)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 4.

Nồng độ kháng thể: 1,60mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,60mg (77%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,1.

Ví dụ 16: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (15)

Công thức 85



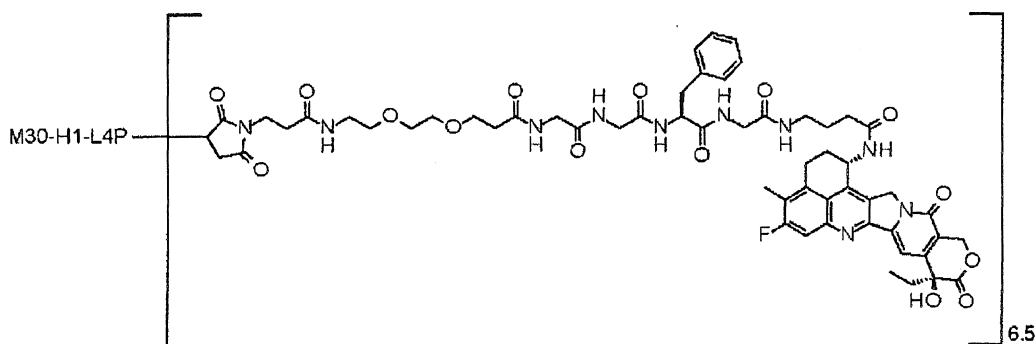
Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (15)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 5.

Nồng độ kháng thể: 1,64mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,84mg (79%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,1.

Ví dụ 17: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (16)

Công thức 86

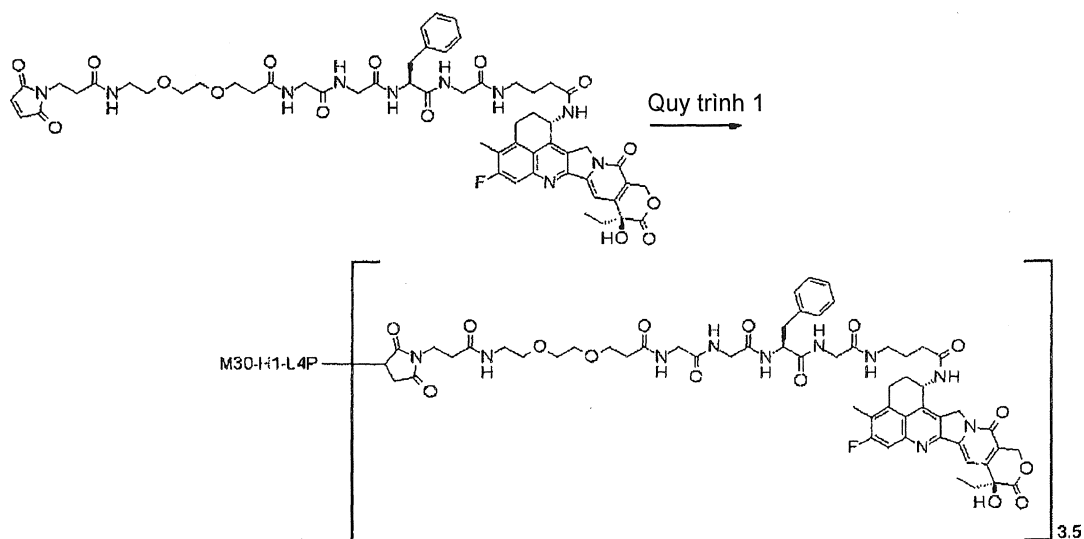


Trộn đều như toàn bộ lượng thể liên hợp kháng thể-thuốc của Ví dụ 15 và 16 và cô dung dịch theo Quy trình chung A để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 17,30mg, và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,5.

Ví dụ 18: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (17)

Công thức 87



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (17)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (100mL, 1g kháng thể) được đặt trong bình cầu 250mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (2,43mL; 3,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và còn được nạp dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (5mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH gần bằng 7,4 bằng cách sử dụng máy đo độ pH, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (2,14mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (3,51mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng máy khuấy để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 130 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,547mL) chứa NAC 100mM vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

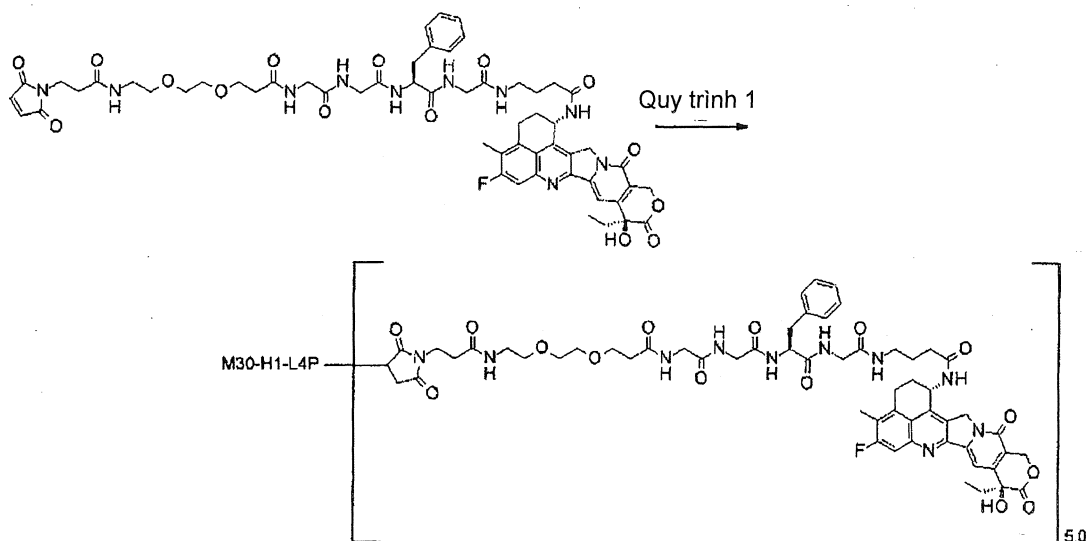
Tinh chế: tinh chế siêu lọc dung dịch trên đây bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc bao gồm màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), bơm dạng ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, Pump Head model 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Đặc biệt, trong khi bổ sung từng giọt ABS (tổng cộng là 800mL) để làm dung dịch đậm để tinh chế vào dung dịch phản ứng, tiến hành tinh chế siêu lọc để loại bỏ chất liên kết thuốc không được liên hợp và các chất phản ứng có phân tử lượng thấp khác, ngoài ra còn thay thế dung dịch đậm bằng ABS, và còn cô dung dịch, để tạo ra khoảng 70ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 14,5mg/mL, hiệu suất kháng thể: 1,0g (khoảng 100%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,5.

Ví dụ 19: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (18)

Công thức 88



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (18)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng

dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (5mL, 50mg kháng thể) được đặt trong ống 15mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,135mL; 4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH gần bằng 7,4 bằng cách sử dụng máy đo độ pH, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (0,064mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,219mL; 6,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 90 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,033mL; 9,8 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

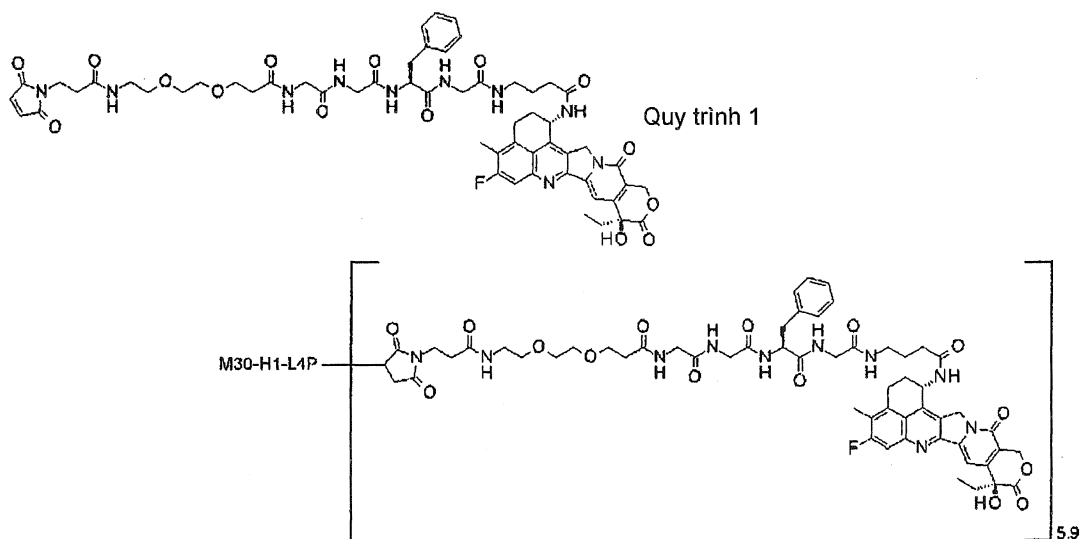
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 19ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 2,17mg/mL, hiệu suất kháng thể: 41mg (82%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,0.

Ví dụ 20: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (19)

Công thức 89



Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (19)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (4mL, 40mg kháng thể) được đặt trong ống 15mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,140mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH gần bằng 7,4 bằng cách sử dụng máy đo độ pH, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,232mL; 8,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 90 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,035mL; 12,9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

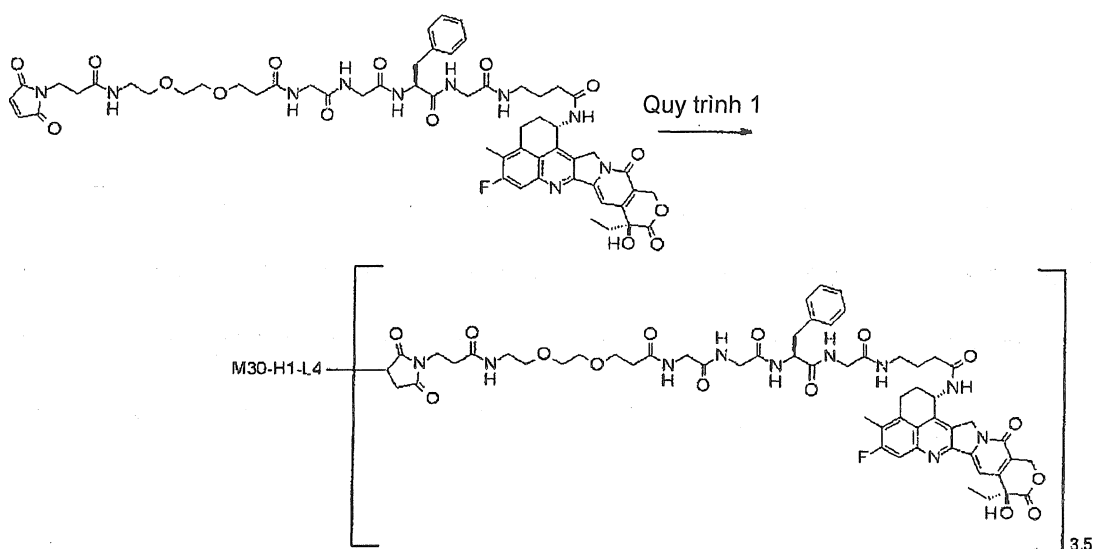
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 13ml dung dịch chứa thử liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 2,36mg/mL, hiệu suất kháng thể: 31mg (77%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,9.

Ví dụ 21: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (20)

Công thức 90



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (20)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL, 12,5mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0287mL; 3,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề ở kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (0,0267mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,0439mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0066mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

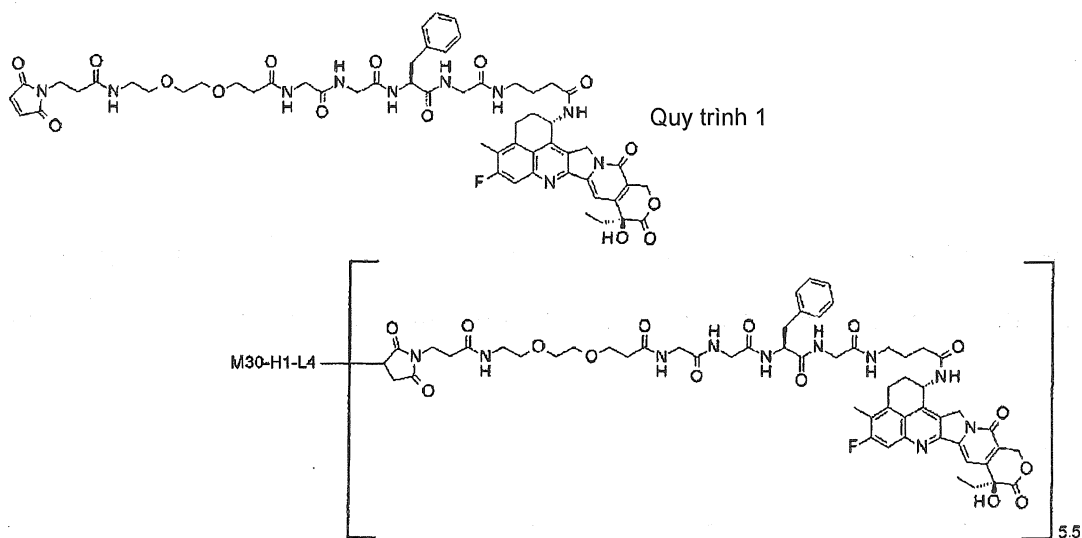
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,7mg (70%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,5.

Ví dụ 22: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (21)

Công thức 91



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (21)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL, 12,5mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0439mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) (0,0287mL; 3,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,0726mL; 8,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,011mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

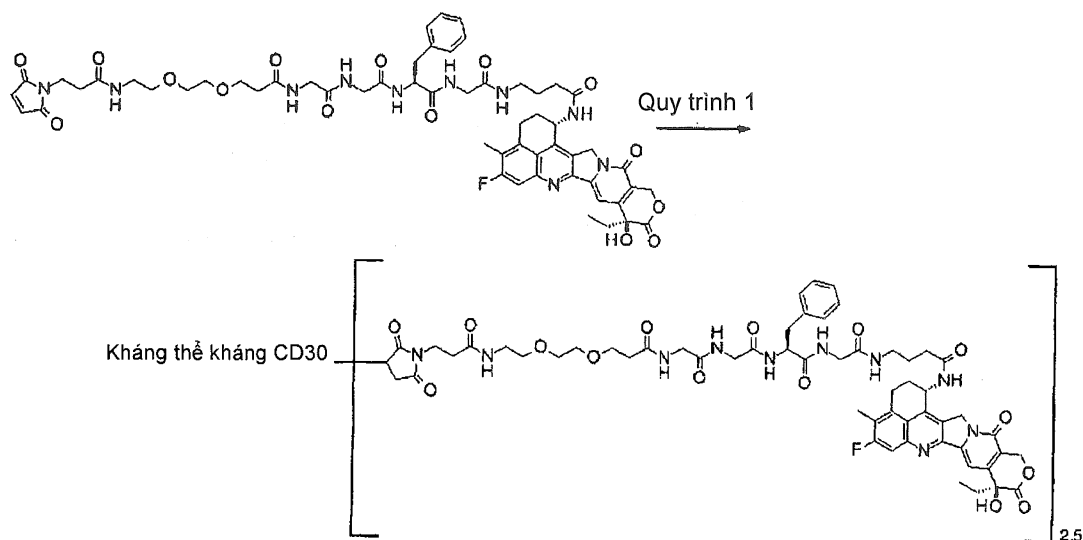
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,3mg (66%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,5.

Ví dụ 23: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (22)

Công thức 92



Quy trình 1: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (22)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD30 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,75\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0065mL; 2,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể). Khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (0,0098mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,0116mL; 4,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0017mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc của phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

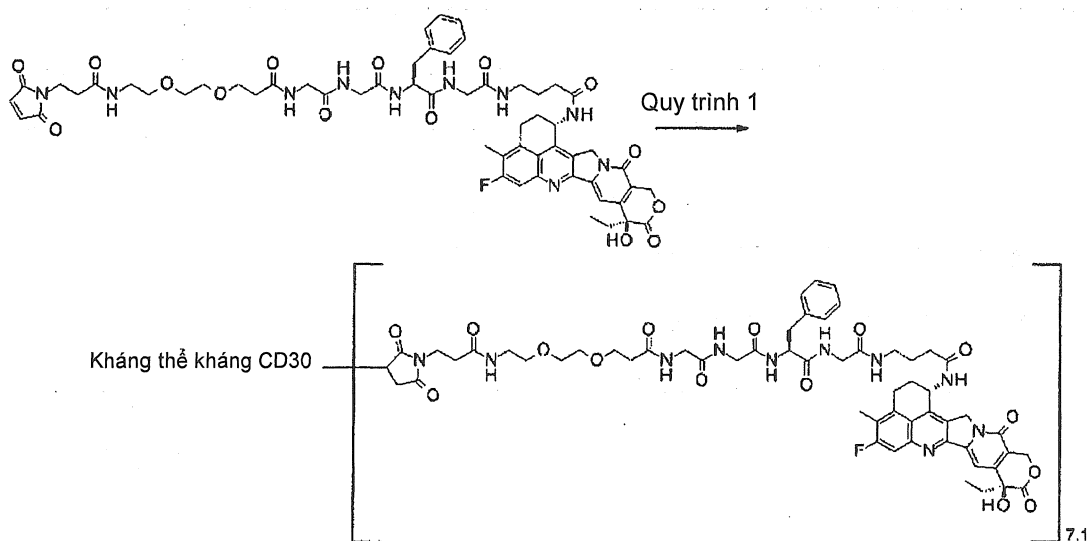
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 270400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,86mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,2mg (54%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 2,5.

Ví dụ 24: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (23)

Công thức 93



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (23)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD30 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,75\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,35mL, 3,5mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0113mL; 5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể). Khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,0204mL; 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và propylen glycol (Kanto Chemical Co., Inc., 0,18mL) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0031mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

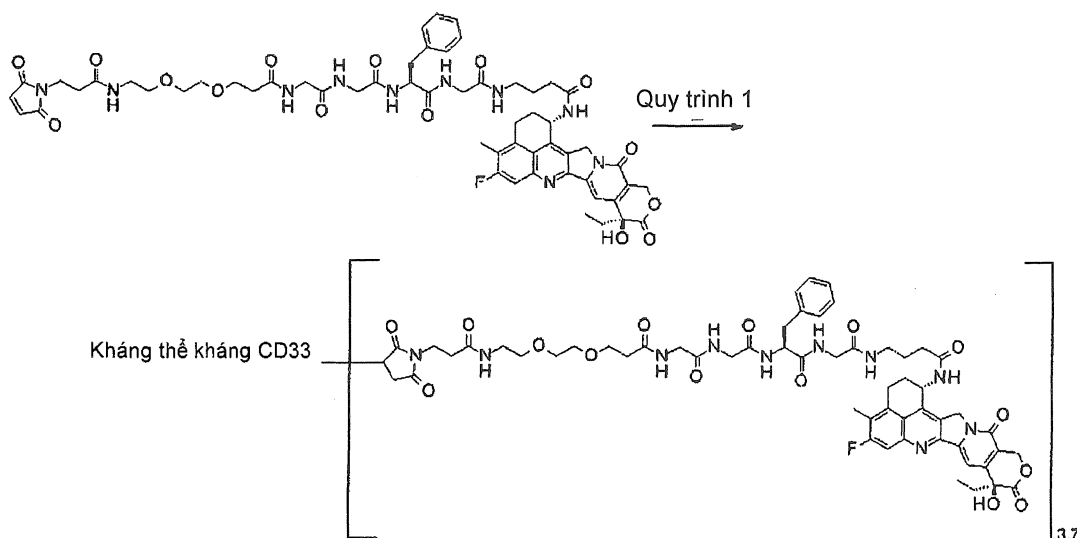
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 270400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,41mg/mL, hiệu suất kháng thể: 1,0mg (29%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,1.

Ví dụ 25: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (24)

Công thức 94



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (24)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD33 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 4 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,66\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industrial Co., Ltd.) (0,0065mL; 2,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (0,0101mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,0116mL; 4,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0017mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

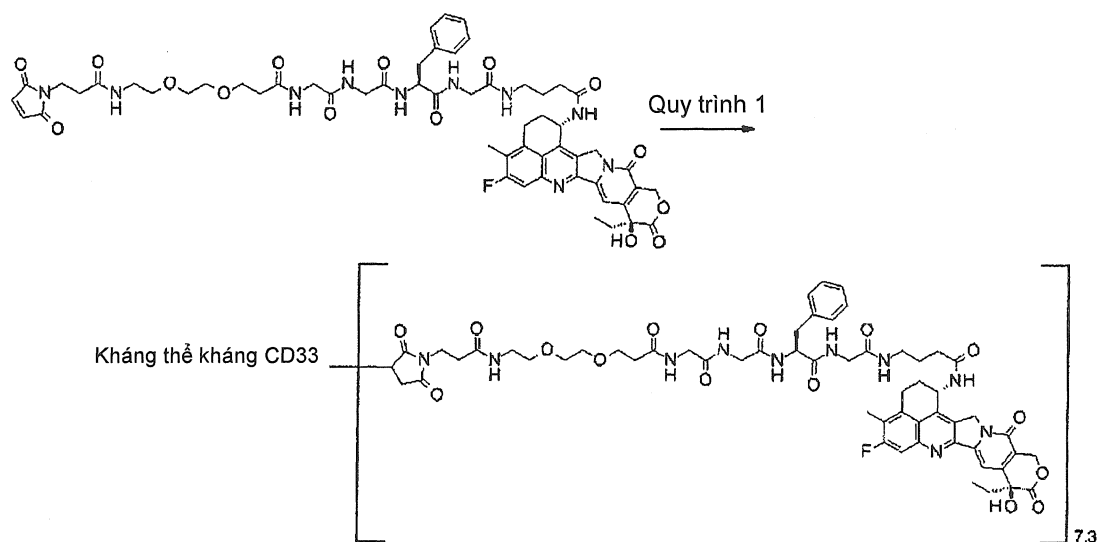
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 256400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,25mg/mL, hiệu suất kháng thể: 3,1mg (78%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

Ví dụ 26: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (25)

Công thức 95



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (25)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD33 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 4 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,66\text{mL.mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129mL; 5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai

Tesque, Inc.; 0,006mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,0233mL; 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0035mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

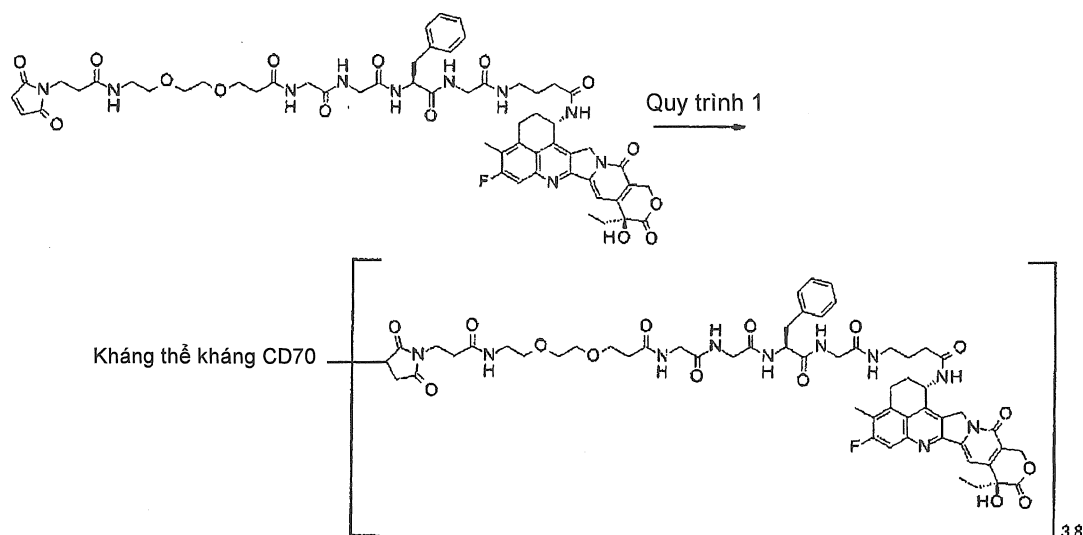
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 256400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,17mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,9mg (73%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,3.

Ví dụ 27: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (26)

Công thức 96



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (26)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD70 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 5 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,69mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065mL; 2,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là 7,0 ± 0,1, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (0,0101mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 (0,0116mL; 4,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0017mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

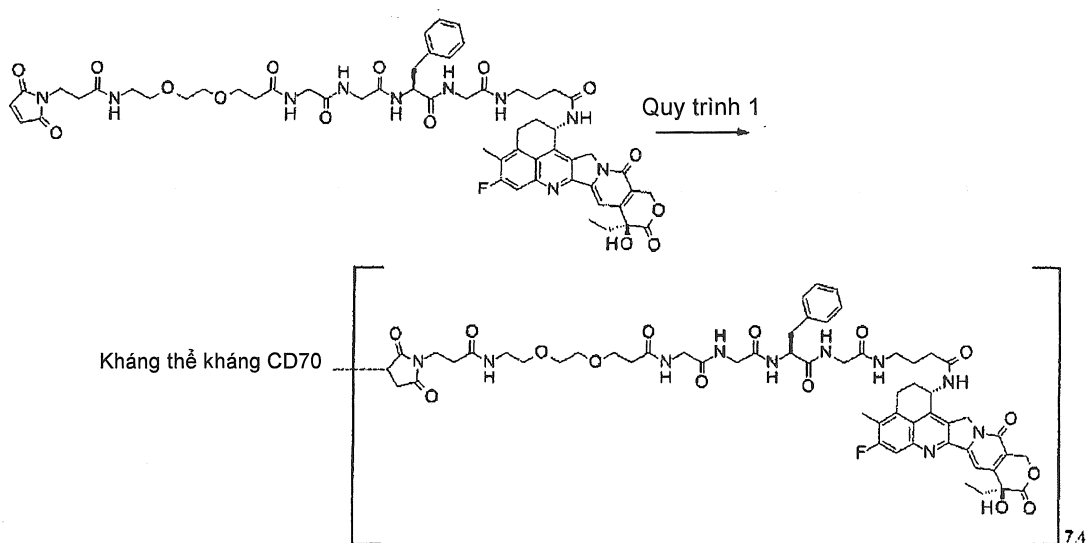
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 262400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,14mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,9mg (71%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,8.

Ví dụ 28: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (27)

Công thức 97



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (27)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD70 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 5 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,69\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129mL; 5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai

Tesque, Inc.; 0,006mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit (0,0233mL; 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 14 vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0035mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

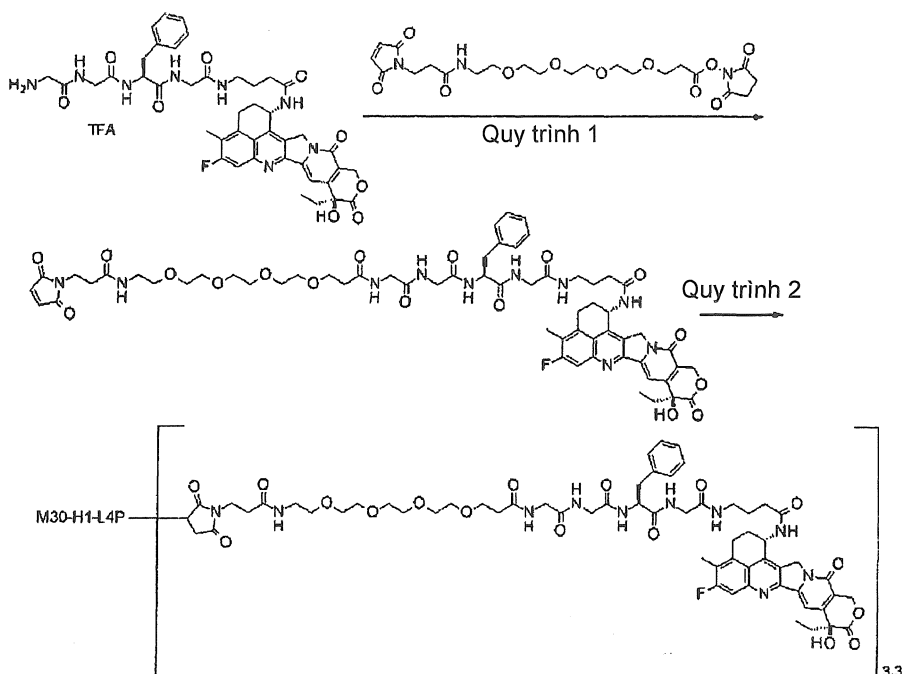
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 262400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 4964$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 18982$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,13mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,8mg (71%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,4.

Ví dụ 29: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (28)

Công thức 98



Quy trình 1: N-[19-(2,5-đioxo-2,5-đihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxo-16-azanonadecan-1-oyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-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

Cho hợp chất (90mg, 0,107mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 2 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng diisopropyletylamin (18,7μL, 0,107mmol) thay cho trietylamin và N-succinimidyl 1-maleinimit-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oat (55,1mg, 0,107mmol) thay cho N-succinimidyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (50mg, 37%).

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

8,10 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,16 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,23 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,44 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (APCI) m/z: 1237 (M+H)⁺

Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (28)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,025mL; 3,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là 7,4 ± 0,1, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,102mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên (0,047mL; 5,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,009mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

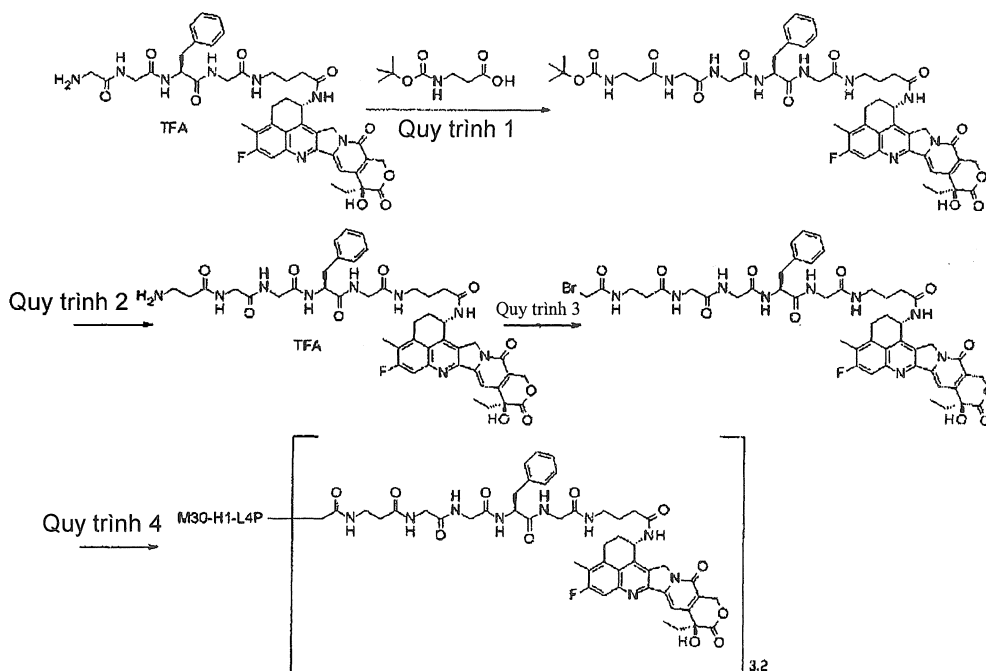
Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước

tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 13,60mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,5mg (76%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,3.

Ví dụ 30: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (29)

Công thức 99



Quy trình 1: N-(tert-butoxycarbonyl)-β-alanyl-glyxyl-glyxyl-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

Cho hợp chất (0,839g, 1,00mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 2 phản ứng theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng N-(tert-butoxycarbonyl)-β-alanin thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic. Sử dụng sản phẩm thô thu được trong quy trình tiếp theo mà không cần tinh chế.

Quy trình 2: β-Alanyl-glyxyl-glyxyl-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

Cho sản phẩm thô thu được trong quy trình 1 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,610g, 67%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,67-1,77 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,09-2,22 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,46-2,55 (2H, m), 2,82-2,73 (1H, m), 2,95-3,13 (5H, m), 3,14-3,21 (2H, m), 3,55-3,80 (6H, m), 4,44-4,52 (1H, m), 5,20 (2H, dd, J=35,0, 19,0 Hz), 5,42 (2H, s), 5,53-5,60 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,14-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,67 (2H, brs), 7,72-7,78 (1H, m), 7,80 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,10-8,17 (2H, m), 8,29 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,42 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,47 (1H, d, J=8,6 Hz).

Quy trình 3: N-(bromaxetyl)-β-alanylglyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-di-oxo-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

Bổ sung N-hydroxysuccinimit (79,7mg, 0,693mmol) và 1,3-diisopropylcarbodiimit (0,107mL, 0,693mmol) vào dung dịch diclometan (4,5mL) chứa axit 2-bromaxetic (96,3mg, 0,693mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-dimetyl-formamit (4,5mL) chứa hợp chất (473mg, 0,462mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên và trietylamin (0,154mL, 1,11mmol) ở nhiệt độ 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tinh chế dung dịch phản ứng bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [dung môi rửa giải: clorofom - clorofom : metanol = 85 : 15 (thể tích/thể tích)]. Rửa chất rắn thu được bằng dung môi hỗn hợp clorofom : metanol : dietyl ete để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (191mg, 40%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,67-1,77 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,08-2,22 (4H, m), 2,33 (2H, t, J=7,0 Hz), 2,40 (3H, s), 2,74-2,83 (1H, m), 2,99-3,12 (3H, m), 3,14-3,21 (2H, m), 3,24-3,30 (2H, m), 3,56-3,77 (6H, m), 3,82 (2H, s), 4,41-4,51 (1H, m), 5,20 (2H, q, J=18,9 Hz), 5,42 (2H, s), 5,54-5,60 (1H, m), 6,54

(1H, s), 7,15-7,27 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,69-7,74 (1H, m), 7,80 (1H, d, $J=10,9$ Hz), 8,06 (1H, t, $J=5,7$ Hz), 8,13 (1H, d, $J=7,8$ Hz), 8,21-8,34 (3H, m), 8,46 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (ESI) m/z : 1030, 1032 ($M+H$)⁺

Quy trình 4: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (29)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,025mL; 3,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimetyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,09mL) và dung dịch dimetyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 (0,059mL; 7,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,009mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thẻ liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

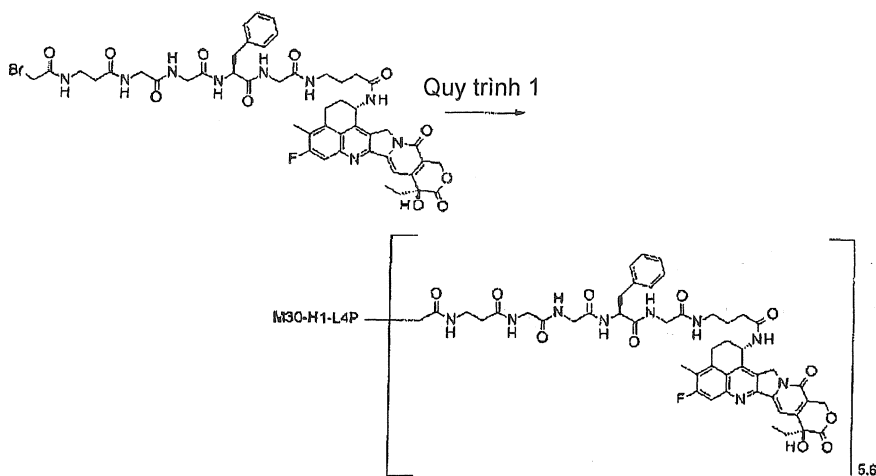
Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước

tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng, thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 13,9mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,7mg (78%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,2.

Ví dụ 31: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (30)

Công thức 100

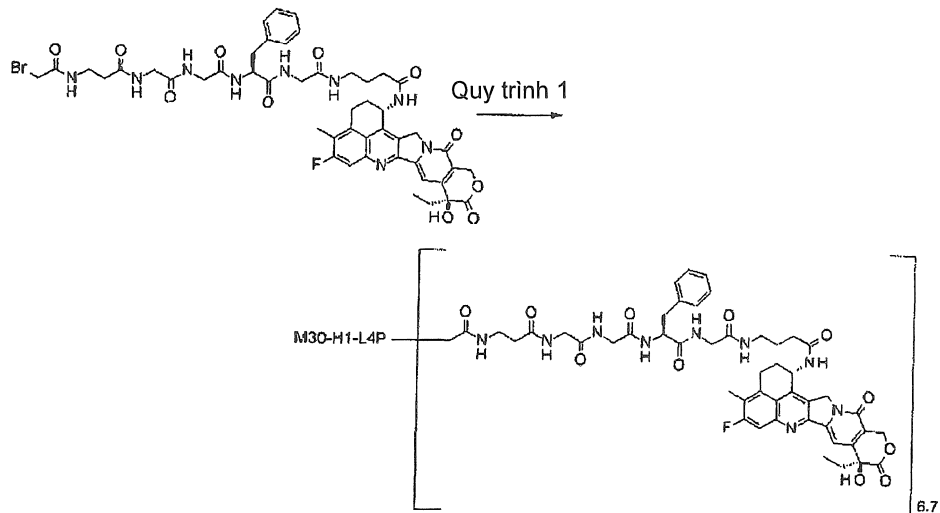


Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 30, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 4.

Nồng độ kháng thể: 1,94mg/mL, hiệu suất kháng thể: 11,64mg (93%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,6.

Ví dụ 32: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (31)

Công thức 101



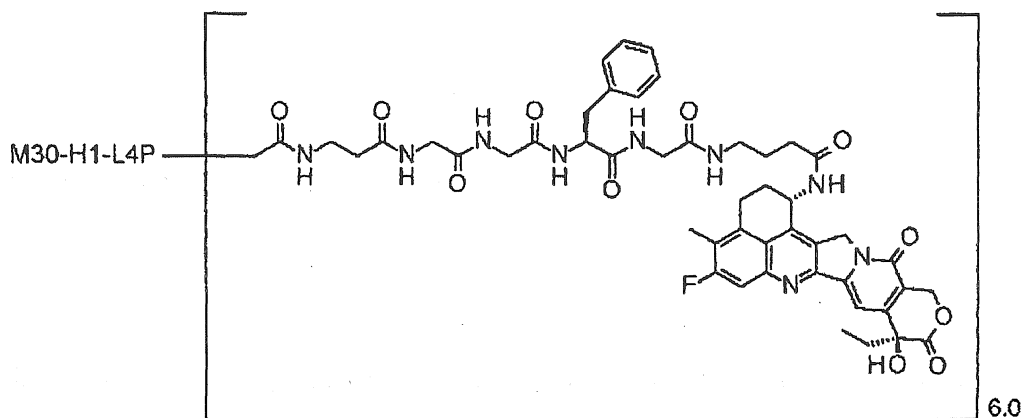
Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (31)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 30, thu được thử liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 5.

Nồng độ kháng thể: 1,90mg/mL, hiệu suất kháng thể: 11,40mg (91%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,7.

Ví dụ 33: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (32)

Công thức 102

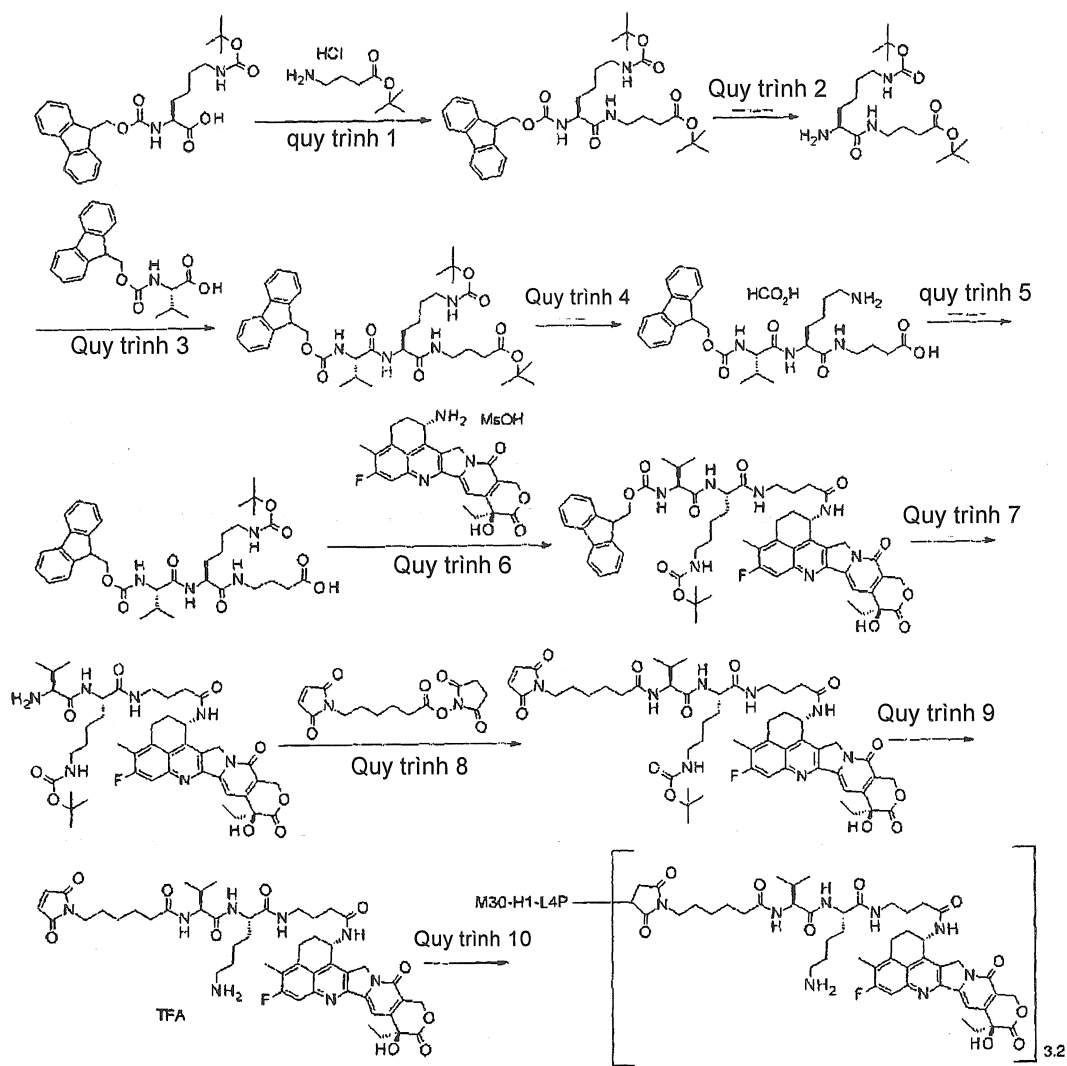


Trộn hỗn hợp như toàn bộ lượng thử liên hợp kháng thể-thuốc của Ví dụ 31 và 32 và cô dung dịch này theo Quy trình chung A để tạo ra thử liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 21,06mg, và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,0.

Ví dụ 34: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (33)

Công thức 103



Quy trình 1: Tert-butyl 4-({N⁶-(tert-butoxycarbonyl)-N²-[(9H-floren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-lysyl}amino)butanoat

Bổ sung 1-ethyl-3-(3-đimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua (0,610g, 3,20mmol) và N,N-điisopropyletylamin (0,410ml, 2,35mmol) vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (10,0mL) chứa N⁶-(tert-butoxycarbonyl)-N^α-[(9H-floren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-lysine (1,00g, 2,14mmol), N-hydroxysuccinimide (0,370g, 3,20mmol), và este hydroclorua của axit tert-butyl 4-aminobutanoic (0,830g,

4,27mmol) vào và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Pha loãng dung dịch phản ứng bằng etyl axetat và rửa bằng dung dịch nước chứa axit xitric 10% và dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat, và nước muối bão hòa, và sau đó làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (1,35g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,14-1,42 (4H, m), 1,36 (9H, s), 1,37 (9H, s), 1,48-1,67 (4H, m), 2,18 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 2,84-2,93 (2H, m), 2,99-3,11 (2H, m), 3,84-3,94 (1H, m), 4,18-4,30 (3H, m), 6,76 (1H, t, $J=5,4$ Hz), 7,33 (2H, t, $J=7,3$ Hz), 7,39-7,45 (3H, m), 7,73 (2H, dd, $J=7,3, 2,7$ Hz), 7,85-7,92 (3H, m).

Quy trình 2: Tert-butyl 4- $\{[\text{N}^6\text{-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysyl}]\text{amino}\}$ butanoat

Bổ sung piperidin (2,00mL) vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (8,00mL) chứa hợp chất (1,35g, 2,22mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1,5 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hỗn hợp chứa hợp chất nêu trong tiêu đề. Hỗn hợp được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không tiến hành tinh chế thêm.

Quy trình 3: N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]-L-valyl- $\text{N}^6\text{-(tert-butoxycarbonyl)-N-(4-tert-butoxy-4-oxobutyl)-L-lysynamit}$

Bổ sung N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]-L-valin (1,13g, 3,32mmol), N-hydroxysuccinimit (0,310g, 2,66mmol), và 1-etyl-3-(3-đimetylaminopropyl)carbodiimitt hydroclorua (0,550g, 2,88mmol) vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (30,0mL) chứa hỗn hợp (2,22mmol) thu được trong quy trình 2, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Pha loãng dung dịch phản ứng bằng etyl axetat và rửa bằng dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat và nước muối bão hòa, và sau đó làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (0,363g, 23%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,84 (6H, t, $J=6,0$ Hz), 1,12-1,64 (8H, m), 1,34 (9H, s), 1,38 (9H, s), 1,90-2,04 (1H, m), 2,17 (2H, t, $J=7,3$ Hz), 2,79-2,90 (2H, m), 2,99-3,09

(2H, m), 3,83-3,91 (1H, m), 4,08-4,44 (4H, m), 6,71 (1H, t, $J=5,4$ Hz), 7,32 (2H, t, $J=7,3$ Hz), 7,42 (3H, t, $J=7,3$ Hz), 7,74 (2H, t, $J=7,0$ Hz), 7,85-7,91 (4H, m).

MS (ESI) m/z : 709 ($M+H$)⁺

Quy trình 4: N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]-L-valyl-N-(3-carboxypropyl)-L-lysinit format

Bổ sung axit formic (10,0ml) vào hợp chất (0,363mg, 0,512mmol) thu được trong quy trình 3 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề. Hợp chất được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Quy trình 5: N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]-L-valyl-N⁶-(tert-butoxycacbonyl)-N-(3-carboxypropyl)-L-lysinit

Bổ sung dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat (20,0ml) và di-tert-butyl dicacbonat (0,178ml, 0,769mmol) vào hỗn dịch 1,4-đioxan (5,00mL) chứa hợp chất (0,512mmol) thu được trong quy trình 4 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Pha loãng dung dịch phản ứng bằng etyl axetat và rửa bằng dung dịch nước chứa axit xitric 10% và nước muối bão hòa, và sau đó làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (0,295g, 88%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,84 (6H, t, $J=6,7$ Hz), 1,13-1,39 (4H, m), 1,35 (9H, s), 1,48-1,62 (4H, m), 1,91-2,04 (1H, m), 2,20 (2H, t, $J=7,3$ Hz), 2,80-2,89 (2H, m), 2,99-3,11 (2H, m), 3,87 (1H, dd, $J=8,5, 6,7$ Hz), 4,06-4,35 (4H, m), 6,71 (1H, t, $J=6,0$ Hz), 7,32 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 7,39-7,46 (3H, m), 7,74 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 7,83-7,94 (4H, m).

MS (ESI) m/z : 653 ($M+H$)⁺

Quy trình 6: N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]-L-valyl-N⁶-(tert-butoxycacbonyl)-N-(4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-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)-L-lysinit

Cho mesylat của hợp chất (4) (0,240g, 0,452mmol) phản ứng theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng hợp chất (0,295g, 0,452mmol) thu được trong quy trình 5 ở trên thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu cam nhạt (0,208g, 43%).

MS (ESI) m/z: 1071 (M+H)⁺

Quy trình 7: L-Valyl-N⁶-(tert-butoxycarbonyl)-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)-L-lysinit

Cho hợp chất (0,208g, 0,194mmol) thu được trong quy trình 6 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 2 để tạo ra hỗn hợp chứa hợp chất nêu trong tiêu đề. 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]-L-valyl-N⁶-(tert-butoxycarbonyl)-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)-L-lysinit

Cho hỗn hợp (0,194mmol) thu được trong quy trình 7 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,133g, 56%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,77 (6H, t, J=5,7 Hz), 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,14-1,71 (10H, m), 1,35 (9H, s), 1,77-1,95 (3H, m), 2,02-2,23 (7H, m), 2,40 (3H, s), 2,84 (3H, q, J=6,4 Hz), 3,05 (2H, d, J=6,7 Hz), 3,17 (2H, s), 3,26-3,39 (3H, m), 4,01-4,16 (2H, m), 5,15 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,36-5,48 (2H, m), 5,51-5,60 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,72 (1H, t, J=6,0 Hz), 6,99 (2H, s), 7,31 (1H, s), 7,71-7,85 (5H, m), 8,41 (1H, d, J=9,1 Hz).

MS (ESI) m/z: 1041 (M+H)⁺

Quy trình 9: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-

1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)-L-lysinamit trifloaxetat

Bổ sung axit trifloaxetic (4,00ml) vào dung dịch điclometan (10,0ml) chứa hợp chất (0,110mg, 0,106mmol) thu được trong quy trình 8 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (70,0mg, 64%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,76-0,81 (6H, m), 0,87 (3H, t, J=7,3 Hz), 1,12-1,31 (4H, m), 1,39-1,56 (8H, m), 1,57-1,74 (3H, m), 1,79-1,96 (3H, m), 2,06-2,18 (7H, m), 2,40 (3H, s), 2,70-2,80 (2H, m), 3,01-3,10 (2H, m), 3,13-3,22 (2H, m), 4,04 (1H, t, J=7,6 Hz), 4,10-4,20 (1H, m), 5,15 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,24 (1H, d, J=18,7 Hz), 5,36-5,47 (2H, m), 5,52-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,32 (1H, s), 7,61 (3H, brs), 7,75-7,88 (4H, m), 8,43 (1H, d, J=8,5 Hz).

MS (ESI) m/z: 941 (M+H)⁺

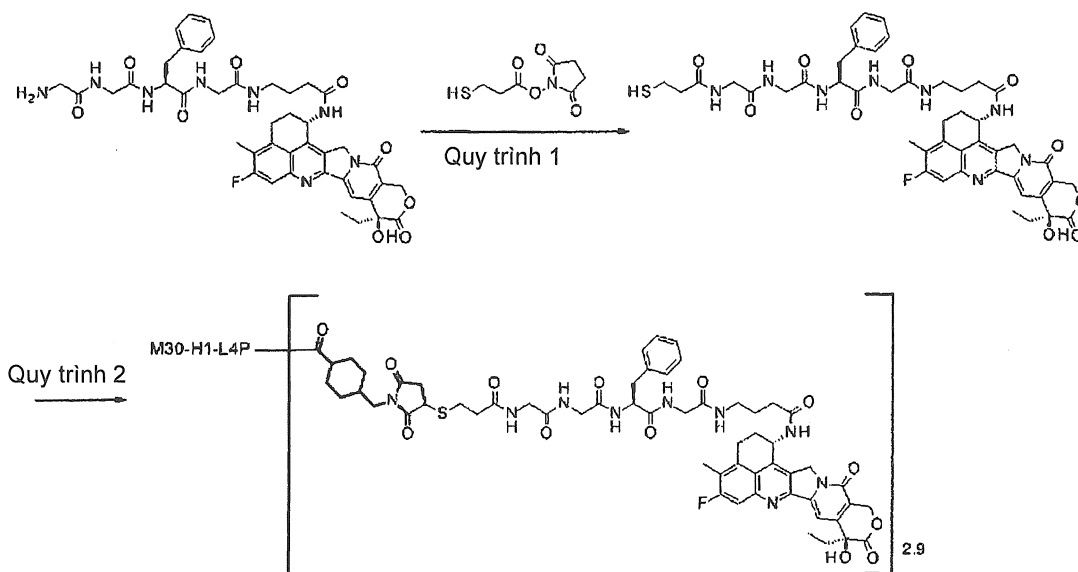
Quy trình 10: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (33)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 9 ở trên, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 29.

Nồng độ kháng thể: 12,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,4mg (67%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,2.

Ví dụ 35: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (34)

Công thức 104



Quy trình 1: N-(3-sulfanylpropanoyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-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

Cho hợp chất (84,0mg, 0,100mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 2 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-succinimidyl 3-mercaptopropionat thay cho N-succinimidyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (61,2mg, 66%).

¹H-NMR (DMSO-D₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,77-1,66 (2H, m), 1,79-1,92 (2H, m), 2,07-2,24 (4H, m), 2,31-2,47 (3H, m), 2,40 (3H, s), 2,59-2,69 (2H, m), 2,78 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 2,98-3,13 (3H, m), 3,14-3,23 (2H, m), 3,54-3,79 (6H, m), 4,40-4,50 (1H, m), 5,20 (2H, dd, J=36,8, 19,2 Hz), 5,36-5,47 (2H, m), 5,52-5,63 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,14-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,68-7,74 (1H, m), 7,80 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,03-8,09 (1H, m), 8,13 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,19-8,29 (2H, m), 8,46 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 927 (M+H)⁺

Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (34)

Điều chế dẫn xuất SMCC của kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 20mg/mL bằng

cách thay thế môi trường bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-2 và Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm). Dung dịch (0,25mL) được đặt trong ống 1,5mL, được nạp dung dịch DMSO (0,0063mL; tương ứng với khoảng 2,55 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa succinimidyl-4-(N-maleimimidomethyl)xyclohexan-1-carboxylat 27,6mM (SMCC, Thermo Fisher Scientific Inc.) ở nhiệt độ trong phòng, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Tinh chế dung dịch phản ứng này bằng cách sử dụng Quy trình chung D-2 để tạo ra 0,7ml dung dịch chứa khoảng 5mg kháng thể thu được từ SMCC.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung DMSO (0,045mL) và dung dịch DMSO chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 (0,015mL; tương ứng với khoảng 2,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ.

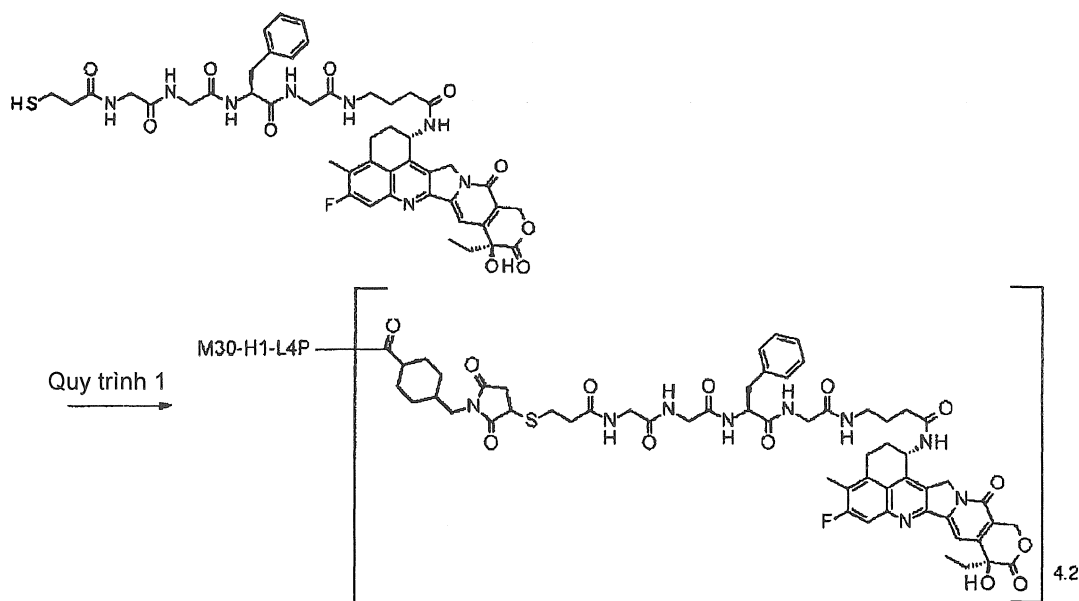
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) để tạo ra 3,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 3,85mg/mL, hiệu suất kháng thể: 0,8mg (16%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 2,9.

Ví dụ 36: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (35)

Công thức 105



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (35)

Điều chế dẫn xuất SMCC của kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 20mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-2 và Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm). Dung dịch (0,25mL) được đặt trong ống 1,5mL, được nạp dung dịch DMSO (0,0125mL; tương ứng với khoảng 5,1 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa succinimidyl-4-(N-maleimitometyl)xyclohexan-1-carboxylat 27,6mM (SMCC, Thermo Fisher Scientific Inc.) ở nhiệt độ trong phòng, và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Tinh chế dung dịch phản ứng này bằng cách sử dụng Quy trình chung D-2 để tạo ra 0,7ml dung dịch chứa khoảng 5mg kháng thể thu được từ SMCC.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung DMSO (0,03mL) và dung dịch DMSO chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 35 (0,03mL; tương ứng với khoảng 4,8 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ.

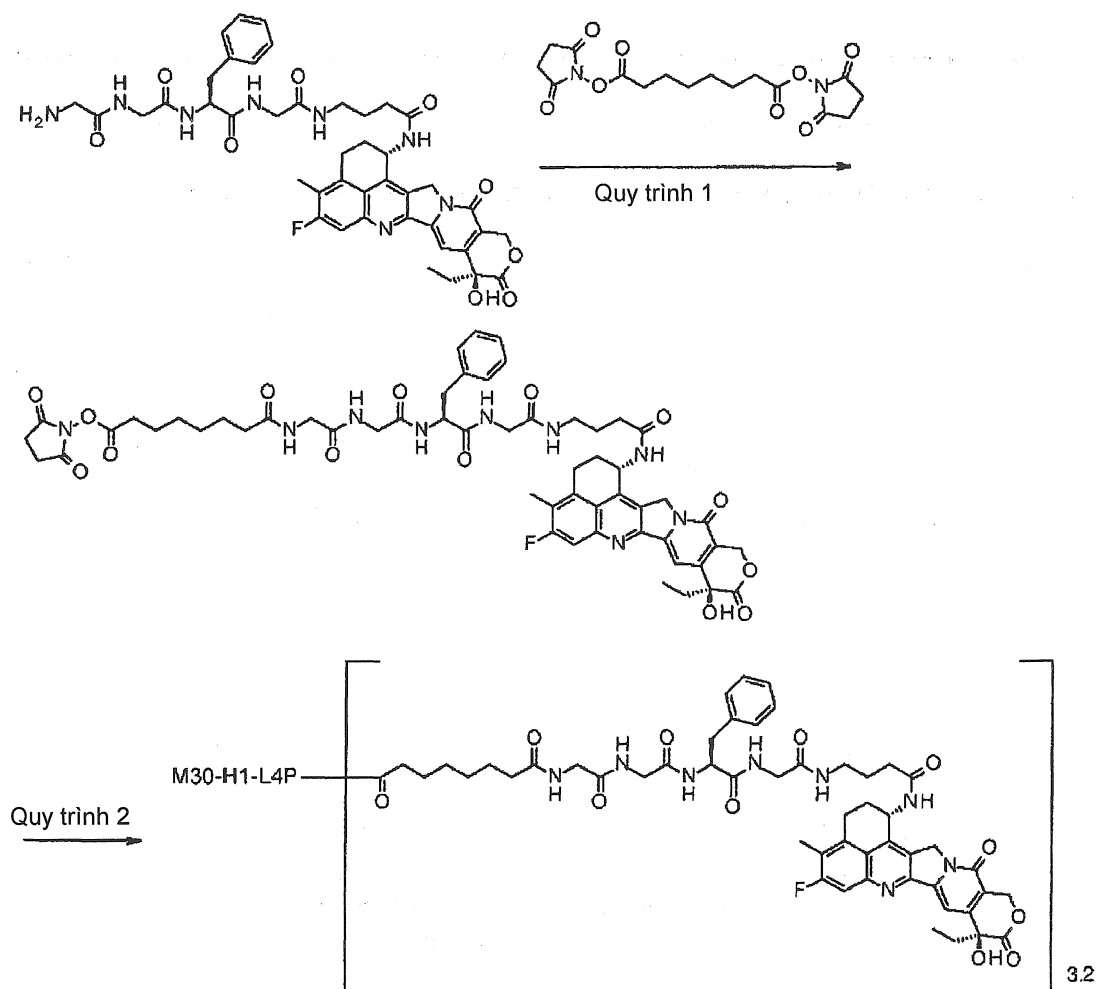
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) để tạo ra 3,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 2,43mg/mL, hiệu suất kháng thể: 0,5mg (10%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 4,2.

Ví dụ 37: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (36)

Công thức 106



Quy trình 1: N-{8-[(2,5-đioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-8-oxooctanoyl}glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-đioxo-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

Cho hợp chất (84,0mg, 0,100mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 2 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng di(N-succinimidyl) suberat thay cho N-succinimidyl 6-maleimide hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (77,1mg, 71%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,2$ Hz), 1,21-1,38 (4H, m), 1,43-1,50 (2H, m), 1,55-1,63 (2H, m), 1,68-1,76 (2H, m), 1,80-1,91 (2H, m), 2,07-2,22 (6H, m), 2,40 (3H, s), 2,60-2,67 (2H, m), 2,76-2,84 (5H, m), 2,97-3,22 (5H, m), 3,56-3,76 (6H, m), 4,40-4,50 (1H, m), 5,20 (2H, q, $J=18,8$ Hz), 5,37-5,48 (2H, m), 5,53-5,62 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,15-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t, $J=5,5$ Hz), 7,80 (1H, d, $J=10,9$ Hz), 8,04 (1H, t, $J=5,9$ Hz), 8,09 (1H, t, $J=5,9$ Hz), 8,14 (1H, d, $J=7,8$ Hz), 8,26 (1H, t, $J=5,9$ Hz), 8,47 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (ESI) m/z : 1092 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (36)

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 20mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-2 và Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thụ ở bước sóng 280nm). Dung dịch (0,25mL) được đặt trong ống 1,5mL, được nạp dung dịch DMSO chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 (0,025mL; tương ứng với khoảng 3,7 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ.

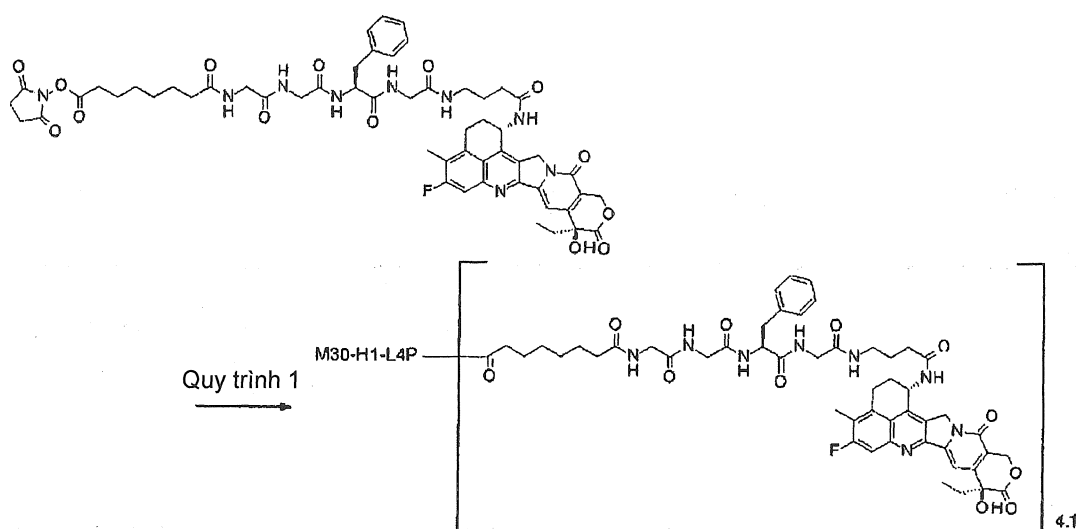
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) để tạo ra 3,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 6,25mg/mL, hiệu suất kháng thể: 1,3mg (26%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,2.

Ví dụ 38: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (37)

Công thức 107



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (37)

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 20mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-2 và Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm). Dung dịch (0,5mL) được đặt trong ống 1,5mL, sau đó được nạp dung dịch DMSO chứa DMSO (0,025mL) và 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 37 (0,025mL; tương ứng với khoảng 7,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ.

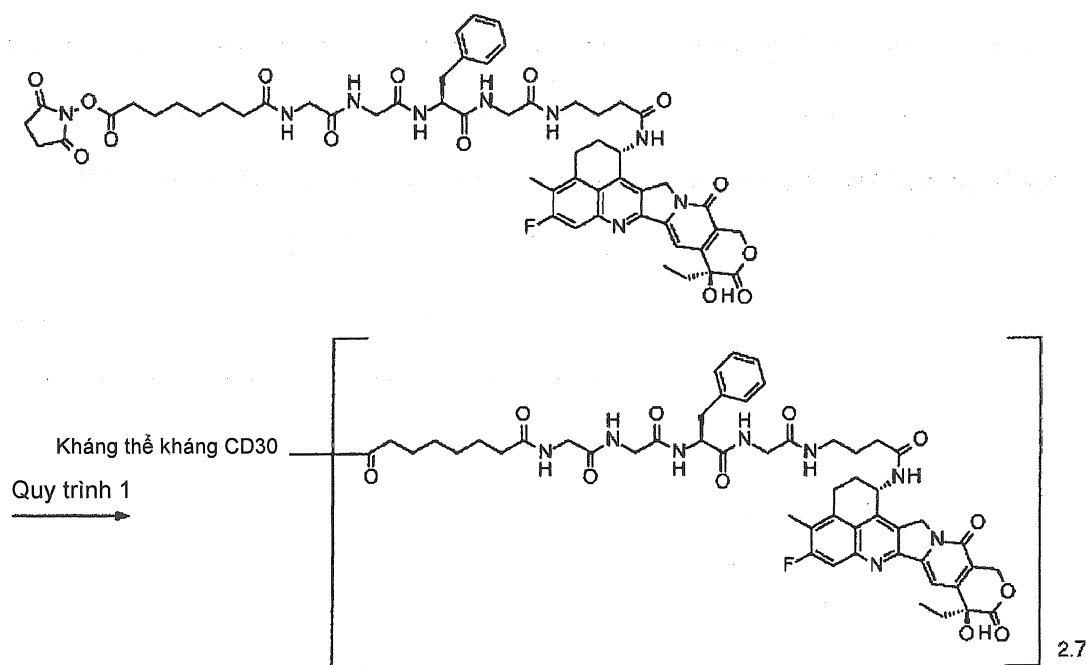
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) để tạo ra 3,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 4,36mg/mL, hiệu suất kháng thể: 0,9mg (18%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 4,1.

Ví dụ 39: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (38)

Công thức 108



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (38)

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: kháng thể kháng CD30 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-2 và Quy trình chung B (sử dụng 1,75mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm). Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL, sau đó được

nạp DMSO (0,017mL) và dung dịch DMSO chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 37 (0,023mL; tương ứng với 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ.

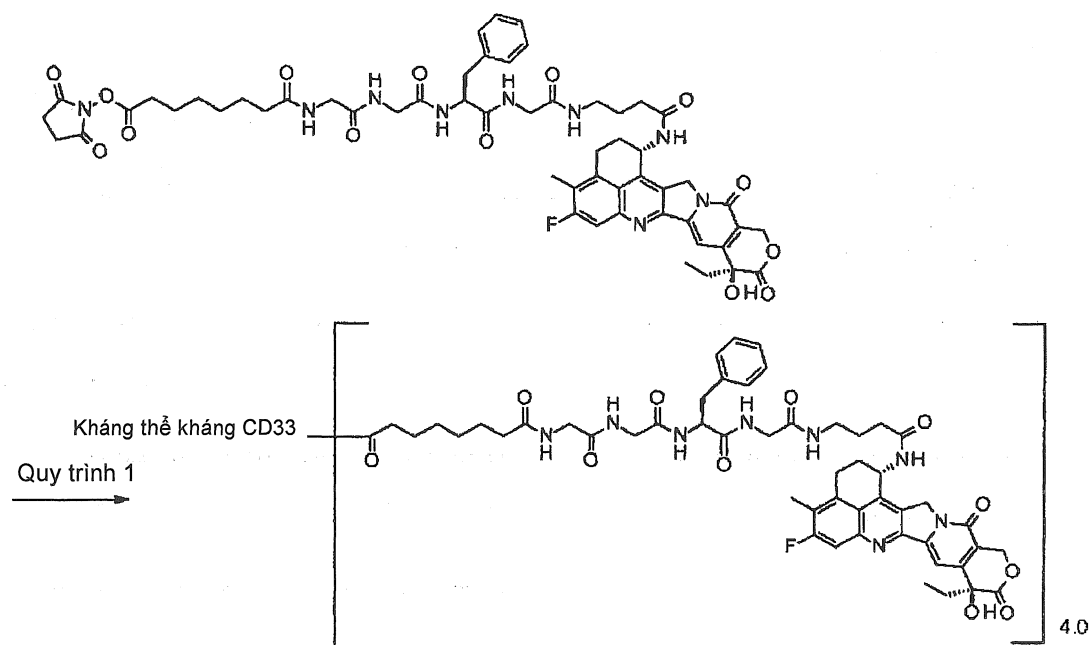
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 270400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 2670$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 15820$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,55mg/mL, hiệu suất kháng thể: 1,4mg (34%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 2,7.

Ví dụ 40: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (39)

Công thức 109



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (39)

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: kháng thể kháng CD33 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 4 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-2 và Quy trình chung B (sử dụng $1,66\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm). Dung dịch (0,4mL, 4 mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL, sau đó đã nạp DMSO (0,017mL) và dung dịch DMSO chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 37 (0,023mL; tương ứng với 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ.

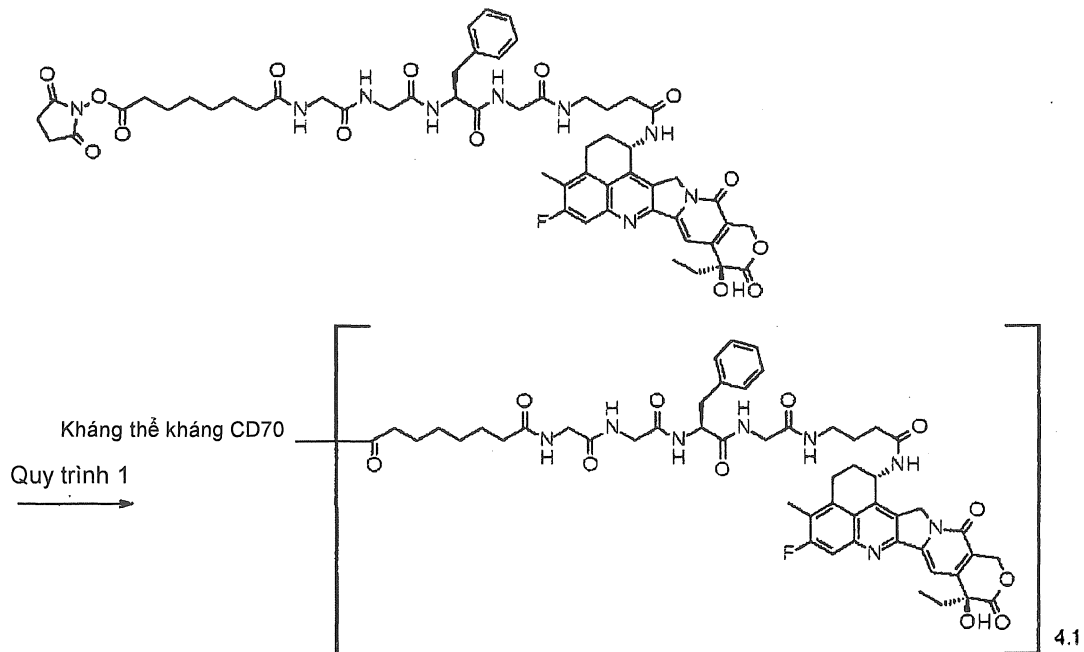
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 256400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 2670$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 15820$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,93mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,3mg (58%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 4,0.

Ví dụ 41: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (40)

Công thức 110



Quy trình 1: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (40)

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: kháng thể kháng CD70 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 5 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-2 và Quy trình chung B (sử dụng $1,69\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm). Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL, sau đó được nạp DMSO (0,017mL) và dung dịch DMSO chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 1 (0,023mL; tương ứng với 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) của Ví dụ 37 ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ.

Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thẻ liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

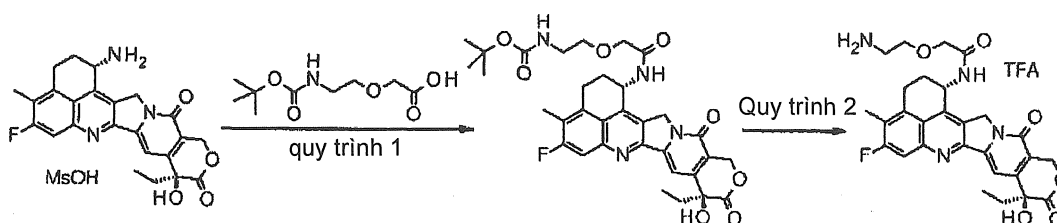
Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 262400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính),

$\epsilon_{D,280} = 2670$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 15820$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,04mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,6mg (65%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 4,1.

Ví dụ 42: 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

Công thức 111



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

Cho mesylat của hợp chất (4) (3,10g, 5,47mol) phản ứng theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit {2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]etoxy}axetic (J. Med. Chem., 1992, vol. 35, trang 2928) (1,55g, 6,01mmol) thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (2,56g, 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 ($M+H$) $^+$

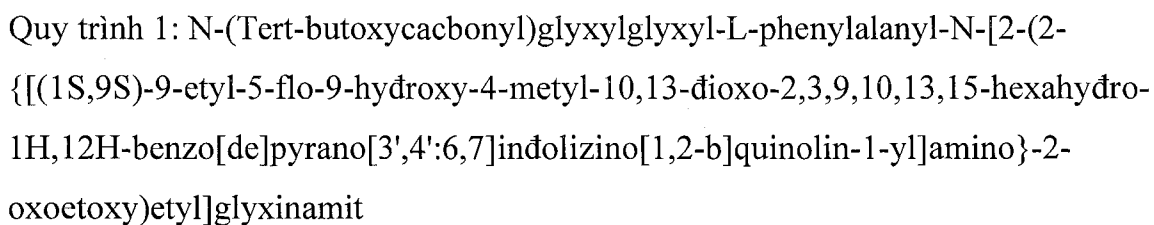
Quy trình 2: 2-(2-Aminoetoxy)-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-di-oxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]axetamit

Cho hợp chất (1,50g, 2,36mol) thu được trong quy trình 1 phản ứng theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 1 để tạo ra triflohydroclorua của hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (1,50g, định lượng). Hợp chất này được xác nhận trong khối u của chuột nhắt mang bệnh ung thư mà nhận thể liên hợp kháng thể-thuốc (41).

$^1\text{H-NMR}$ (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 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

Ví dụ 43: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (41)



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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 2: 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

Cho hợp chất (630mg, 0,659mmol) thu được trong quy trình 1 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (588mg, 92%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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 3: 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)etyl]glyxinamit

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

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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)⁺

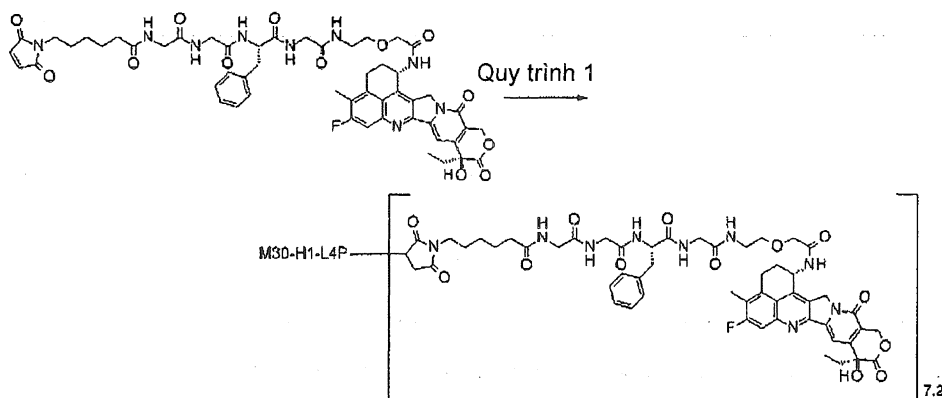
Quy trình 4: Thở liên hợp kháng thể-thuốc (41)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 3 ở trên, thu được thở liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 29.

Nồng độ kháng thể: 12,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,4mg (67%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,5.

Ví dụ 44: Thở liên hợp kháng thể-thuốc (42)

Công thức 113



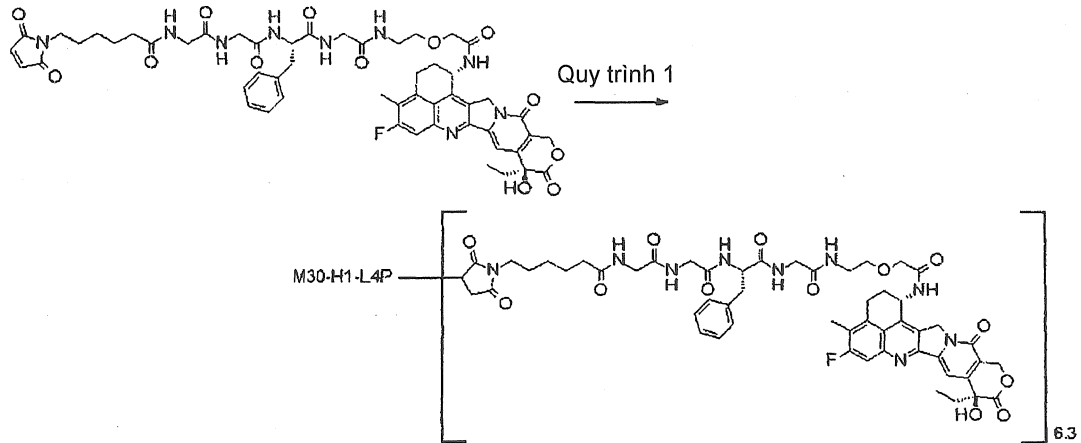
Quy trình 1: Thở liên hợp kháng thể-thuốc (42)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 43, thu được thở liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 5.

Nồng độ kháng thể: 0,83mg/mL, hiệu suất kháng thể: 4,98mg (40%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,2.

Ví dụ 45: Thở liên hợp kháng thể-thuốc (43)

Công thức 114



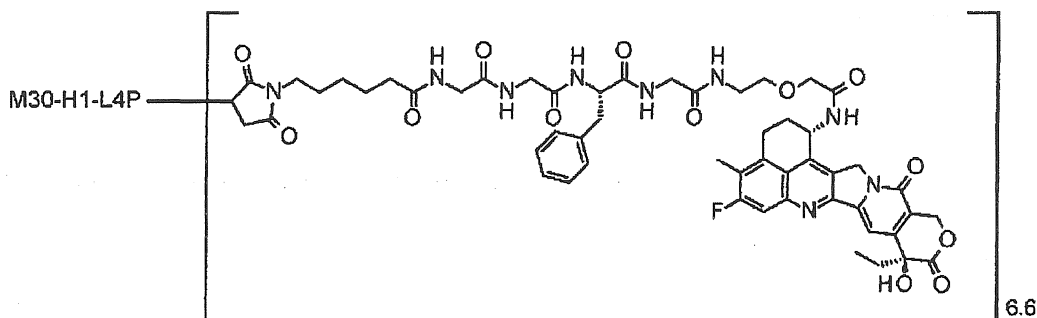
Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (43)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 43, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 4.

Nồng độ kháng thể: 1,06mg/mL, hiệu suất kháng thể: 6,36mg (51%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,3.

Ví dụ 46: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (44)

Công thức 115

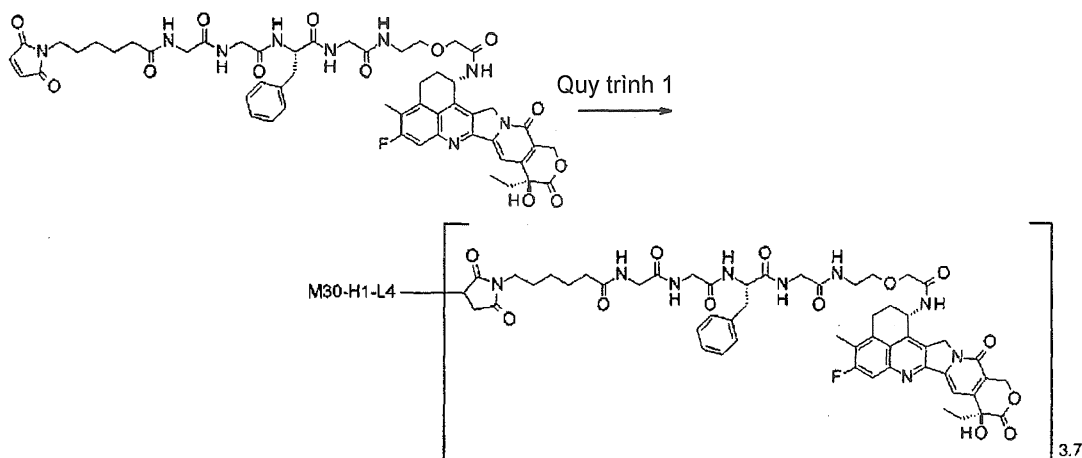


Trộn hầu hết toàn bộ lượng thể liên hợp kháng thể-thuốc của Ví dụ 44 và 45 và cô dung dịch này theo Quy trình chung A để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,21mg, và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,6.

Ví dụ 47: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (45)

Công thức 116



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (45)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 kháng thể được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL, 12,5mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0287mL; 3,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là 7,4 ± 0,1, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimetyl sulfoxit (0,0267mL) và dung dịch dimetyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 43 (0,0439mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0066mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

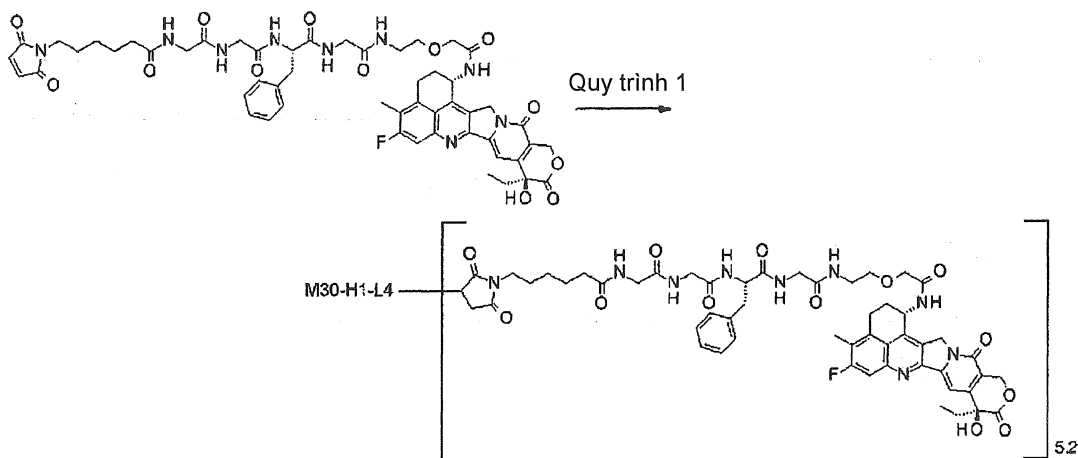
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5193$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20347$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,3mg (74%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

Ví dụ 48: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (46)

Công thức 117



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (46)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL, 12,5mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0439mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) (0,0287mL; 3,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.;

0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit (0,0726mL; 8,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 3 của Ví dụ 43 vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,011mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

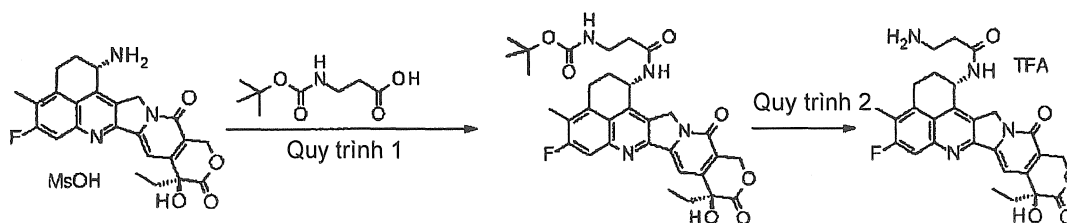
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5193$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20347$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,8mg (62%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,2.

Ví dụ 49: N-[(1S,9S)-9-Etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]- β -alaninamit

Công thức 118



Quy trình 1: Tert-butyl (3-{[(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}-3-oxopropyl)carbamate

Cho mesylat của hợp chất (4) (500mg, 0,941mmol) phản ứng theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng N-(tert-butoxycarbonyl)- β -alanin thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng-nâu (616mg, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,2$ Hz), 1,29 (9H, s), 1,86 (2H, dt, $J=15,1, 7,3$ Hz), 2,04-2,22 (2H, m), 2,31 (2H, t, $J=6,8$ Hz), 2,40 (3H, s), 3,10-3,26 (4H, m), 5,15 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,26 (1H, d, $J=19,2$ Hz), 5,42 (2H, dd, $J=18,8, 16,4$ Hz), 5,57 (1H, dt, $J=8,5, 4,2$ Hz), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t, $J=5,5$ Hz), 7,30 (1H, s), 7,80 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 8,46 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (ESI) m/z : 607 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

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

Cho hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 1 để tạo ra trifloaxetat của hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng (499mg, 86%).

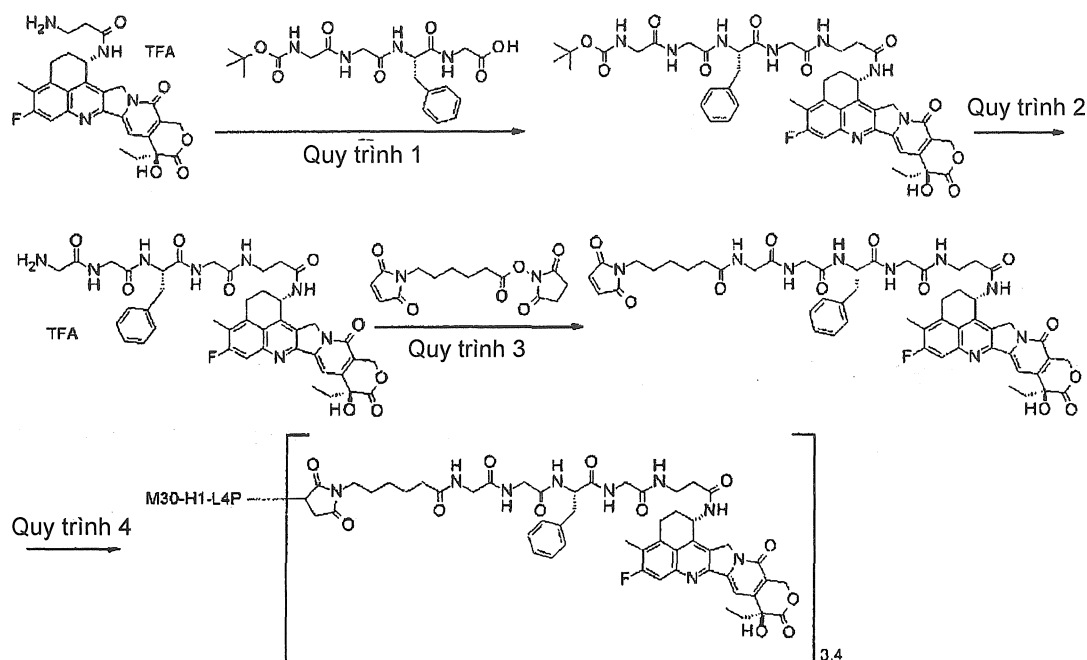
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,2$ Hz), 1,86 (2H, dq, $J=14,6, 7,2, 7,2, 7,2, 7,2$ Hz), 2,06-2,27 (1H, m), 2,41 (3H, s), 2,46-2,57 (2H, m), 3,08 (2H, t, $J=6,8$ Hz), 3,14-3,24 (2H, m), 5,22 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,29 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,43 (2H, s),

5,58 (1H, dt, J=8,5, 4,5 Hz), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,74 (3H, brs), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 8,67 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 507 (M+H)⁺

Ví dụ 50: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (47)

Công thức 119



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

Cho hợp chất (484mg, 0,780mmol) của Ví dụ 49 phản ứng theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (626mg, 87%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,27-1,42 (9H, m), 1,77-1,93 (2H, m), 2,06-2,22 (2H, m), 2,36 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3H, d, J=1,6 Hz), 2,44-2,54 (2H, m), 2,76 (1H, dd, J=14,5, 10,2 Hz), 3,02 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,12-3,22 (2H, m), 3,52 (6H, d, J=6,3 Hz), 4,42-4,54 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,4 Hz), 5,42 (1H, dd, J=18,4, 16,4 Hz), 5,57 (1H, dt, J=8,7, 4,4 Hz), 6,53 (1H, s),

6,98 (1H, t, J=5,9 Hz), 7,14-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,77-7,84 (1H, m), 7,91 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,16 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=5,1 Hz), 8,52 (1H, d, J=9,0 Hz).

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

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

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,86 (2H, tt, J=14,5, 7,2 Hz), 2,07-2,22 (2H, m), 2,36 (2H, t, J=7,2 Hz), 2,40 (3H, s), 2,44-2,54 (2H, m), 2,75 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,04 (1H, dd, J=13,7, 4,3 Hz), 3,12-3,22 (2H, m), 3,58 (2H, d, J=4,7 Hz), 3,69 (3H, td, J=11,2, 5,7 Hz), 3,87 (1H, dd, J=17,0, 5,7 Hz), 4,54 (1H, m, J=17,8, 4,5 Hz), 5,19 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,26 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,43 (2H, s), 5,51-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,14-7,29 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,81 (1H, d, J=10,9 Hz), 7,88 (1H, t, J=5,7 Hz), 7,97 (3H, brs), 8,29-8,38 (2H, m), 8,50 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,55 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 825 (M+H)⁺

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

Cho hợp chất (60,0mg, 0,0646mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn (14,0mg, 21%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,12-1,22 (2H, m), 1,39-1,51 (4H, m), 1,79-1,91 (2H, m), 2,02-2,20 (2H, m), 2,07 (2H, t, J=7,4 Hz), 2,30-2,42 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,78 (1H, dd, J=14,1, 9,4 Hz), 3,02 (1H, dd, J=14,7, 4,9 Hz), 3,12-3,21 (2H, m), 3,26-3,42 (2H, m), 3,50-3,80 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=19,6 Hz), 5,26 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,51-5,62 (1H, m), 6,53 (1H, s),

6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,84 (2H, m), 8,01 (1H, t, $J=5,3$ Hz), 8,06 (1H, t, $J=5,7$ Hz), 8,14 (1H, d, $J=8,2$ Hz), 8,25 (1H, t, $J=5,7$ Hz), 8,53 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (ESI) m/z : 1018 (M+H)⁺

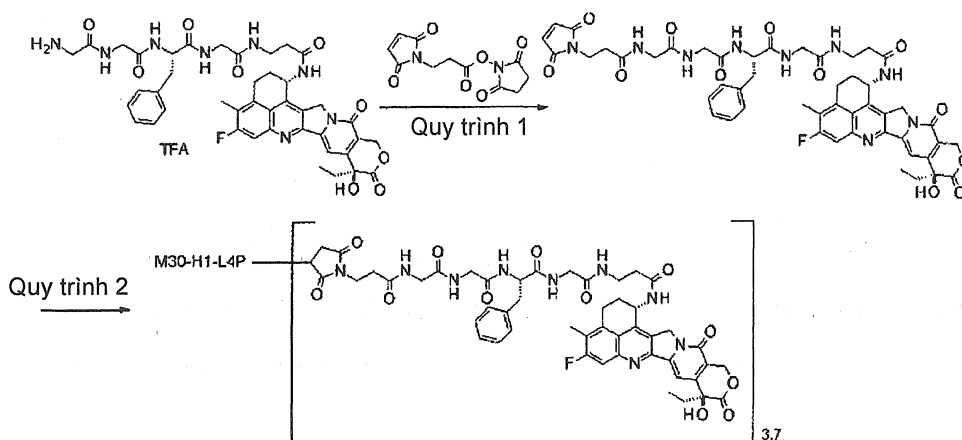
Quy trình 4: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (47)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 3 ở trên, thu được thẻ liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 4 của Ví dụ 2.

Nồng độ kháng thể: 12,27mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,6mg (69%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 51: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (48)

Công thức 120



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

Cho hợp chất (60,0mg, 0,0646mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 50 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-succinimidyl 3-maleimit propionat thay cho N-succinimidyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (36,0mg, 57%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,86 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,85 (2H, dt, $J=14,4, 7,5$ Hz), 2,05-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,30-2,44 (5H, m), 2,73-2,84 (1H, m), 3,02 (1H, dd, $J=13,9, 4,5$ Hz), 3,17 (3H, d, $J=5,1$ Hz), 3,26-3,40 (2H, m), 3,41-3,81 (6H, m), 4,40-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, $J=19,2$ Hz), 5,26 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,42 (2H, brs), 5,52-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,80 (2H, d, $J=10,2$ Hz), 8,03 (1H, t, $J=5,5$ Hz), 8,12 (1H, d, $J=8,2$ Hz), 8,20-8,31 (2H, m), 8,52 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (ESI) m/z : 976 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

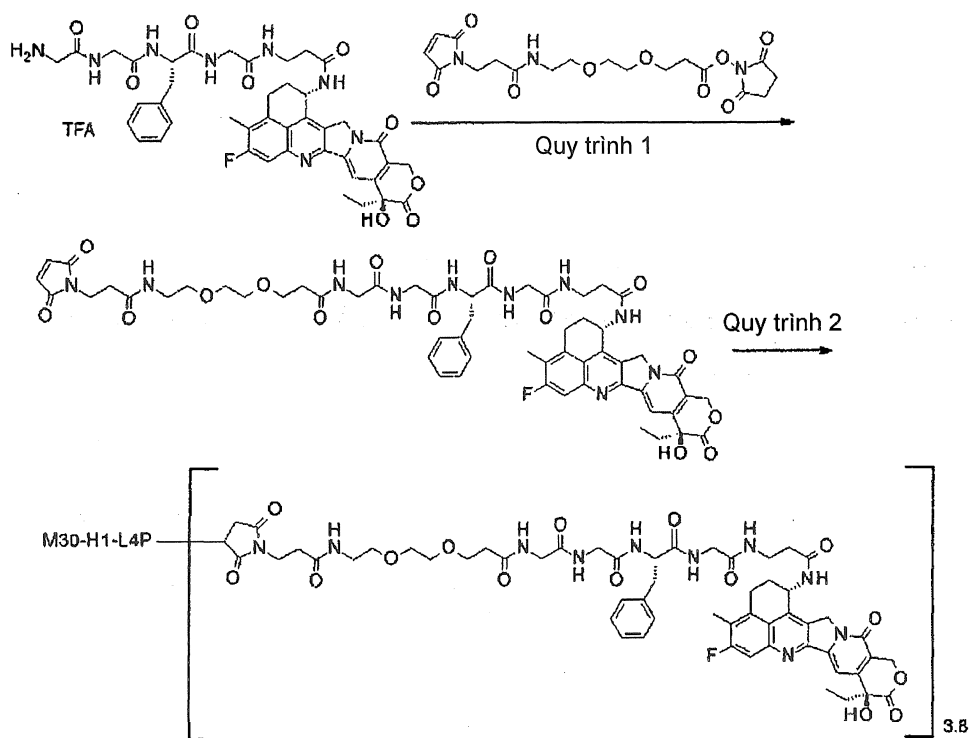
Quy trình 2: Thở liên hợp kháng thể-thuốc (48)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên, thu được thở liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 4 của Ví dụ 2.

Nồng độ kháng thể: 11,59mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,1mg (65%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

Ví dụ 52: Thở liên hợp kháng thể-thuốc (49)

Công thức 121



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

Cho hợp chất (60,0mg, 0,0646mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 50 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-succinimidyl 3-(2-(2-(3-maleinimitpropanamit)etoxy)etoxy)propanoat thay cho N-succinimidyl 6-maleimit hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn (23,0mg, 31%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 0,86 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,77-1,92 (2H, m), 2,07-2,21 (2H, m), 2,27-2,42 (6H, m), 2,40 (3H, s), 2,74-2,84 (1H, m), 2,97-3,06 (1H, m), 3,09-3,21 (4H, m), 3,25-3,39 (6H, m), 3,45 (4H, s), 3,50-3,80 (8H, m), 4,41-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, J=18,4 Hz), 5,26 (1H, m, J=18,4 Hz), 5,42 (2H, brs), 5,51-5,61 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,13-7,28 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,87 (2H, m), 7,93-8,07 (2H, m), 8,09-8,21 (2H, m), 8,26 (1H, brs), 8,54 (1H, d, J=8,6 Hz).

MS (ESI) m/z: 1135 (M+H)⁺

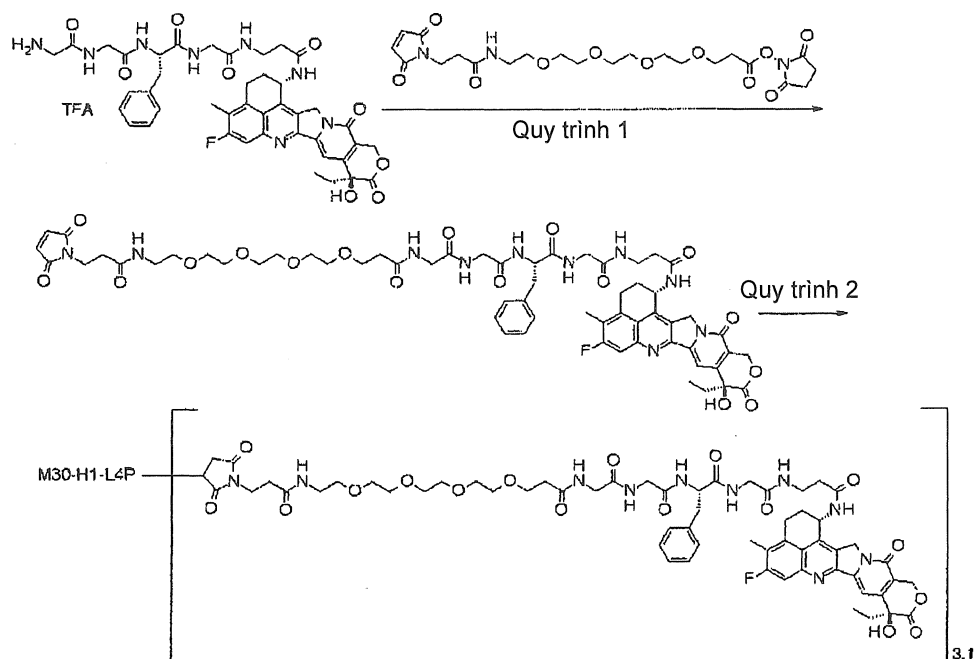
Quy trình 2: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (49)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên, thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 29.

Nồng độ kháng thể: 14,50mg/mL, hiệu suất kháng thể: 10,2mg (82%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,8.

Ví dụ 53: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (50)

Công thức 122



Quy trình 1: N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanylglyxyl-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]-β-alaninamit

Cho hợp chất (60,0mg, 0,0646mmol) thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 50 phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 bằng cách sử dụng N-succinimidyl 1-maleinimide-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecanoat thay cho N-succinimidyl 6-maleimide hexanoat để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn (23,0mg, 29%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,86 (3H, t, $J=7,0$ Hz), 1,85 (2H, tt, $J=14,6, 7,1$ Hz), 2,06-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,28-2,43 (6H, m), 2,78 (1H, dd, $J=13,7, 9,4$ Hz), 3,02 (1H, dd, $J=14,1, 3,9$ Hz), 3,09-3,22 (4H, m), 3,27-3,41 (4H, m), 3,47 (12H, d, $J=8,6$ Hz), 3,53-3,81 (10H, m), 4,41-4,51 (1H, m), 5,19 (1H, d, $J=19,2$ Hz), 5,26 (1H, d, $J=18,8$ Hz), 5,42 (2H, brs), 5,53-5,61 (1H, m), 6,54 (1H, s), 7,00 (2H, s), 7,12-7,29 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,85 (2H, m), 8,03 (2H, d, $J=6,6$ Hz), 8,11-8,21 (2H, m), 8,27 (1H, t, $J=5,9$ Hz), 8,54 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (ESI) m/z : 1224 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

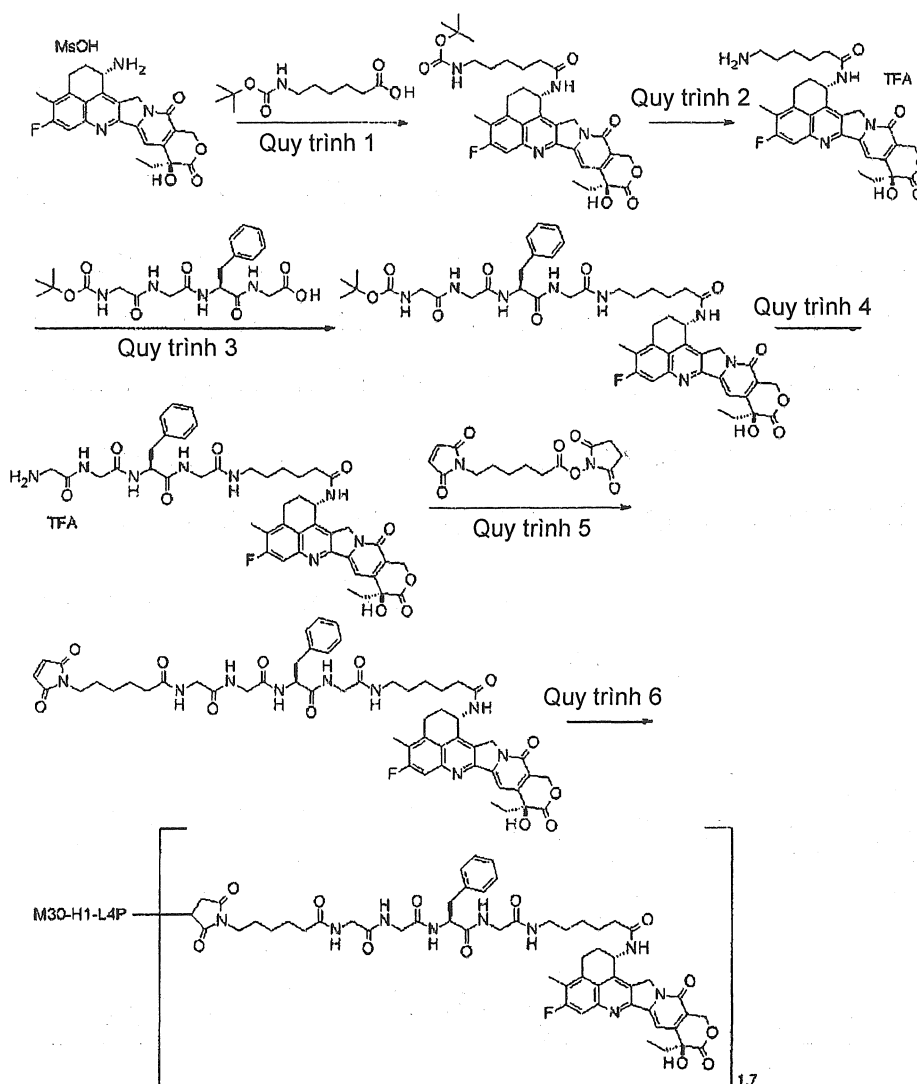
Quy trình 2: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (50)

Bằng cách sử dụng kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 và hợp chất thu được trong quy trình 1 ở trên, thu được thử liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề theo cách giống như Quy trình 4 của Ví dụ 2.

Nồng độ kháng thể: 13,47mg/mL, hiệu suất kháng thể: 9,4mg (75%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,1.

Ví dụ 54: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (51)

Công thức 123



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

Cho mesylat của hợp chất (4) (0,500g, 0,882mmol) phản ứng theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit 6-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoic thay cho axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,620g, định lượng).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,83 (3H, t, J=7,8 Hz), 1,14-1,28 (2H, m), 1,31 (9H, s), 1,47-1,61 (2H, m), 1,75-1,89 (2H, m), 2,04-2,17 (4H, m), 2,35 (3H, s), 2,81-2,88 (2H, m), 3,09-3,16 (2H, m), 5,10 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,16 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,39 (2H, s), 5,48-5,55 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,73-6,78 (1H, m), 7,26 (1H, s), 7,74 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,39 (1H, d, J=9,0 Hz).

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

Cho hợp chất (0,397g, 0,611mmol) thu được trong quy trình 1 phản ứng theo cách giống như Quy trình 2 ở trên của Ví dụ 1 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,342g, 84%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,88 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,31-1,41 (2H, m), 1,52-1,70 (4H, m), 1,80-1,94 (2H, m), 2,05-2,18 (2H, m), 2,21 (2H, t, J=7,4 Hz), 2,40 (3H, s), 2,81 (2H, t, J=7,4 Hz), 3,10-3,25 (2H, m), 3,33 (2H, brs), 5,18 (1H, d, J=19,8 Hz), 5,22 (1H, d, J=19,8 Hz), 5,41 (2H, d, J=16,6 Hz), 5,45 (2H, d, J=16,6 Hz), 5,53-5,60 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, J=10,9 Hz), 8,49 (1H, d, J=9,2 Hz).

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

Cho hợp chất (0,170g, 0,516mmol) thu được trong quy trình 2 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 1 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,225g, 91%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,88 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,43-1,70 (6H, m), 1,87 (2H, td, J=15,0, 7,4 Hz), 2,10-2,22 (3H, m), 2,28-2,37 (1H, m), 2,42 (3H, s), 2,78-2,85 (1H, m), 3,01-

3,10 (3H, m), 3,15-3,22 (2H, m), 3,54-3,61 (5H, m), 3,62-3,69 (1H, m), 4,44-4,53 (1H, m), 5,17 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,45 (2H, s), 5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,02 (1H, t, J=6,1 Hz), 7,11-7,28 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,63-7,69 (1H, m), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,90-7,96 (1H, m), 8,17 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,28 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,46 (1H, d, J=9,0 Hz).

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

Cho hợp chất (0,105g, 0,108mmol) thu được trong quy trình 3 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 2 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (0,068mg, 65%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,89 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,15-1,67 (6H, m), 1,79-1,97 (2H, m), 2,08-2,24 (4H, m), 2,42 (3H, s), 2,76-2,82 (1H, m), 3,00-3,10 (5H, m), 3,19 (1H, s), 3,50-3,63 (2H, m), 3,64-3,76 (3H, m), 3,84-3,92 (1H, m), 4,51-4,59 (1H, m), 5,17 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,24 (1H, d, J=19,4 Hz), 5,44 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, brs), 7,15-7,29 (5H, m), 7,33 (1H, s), 7,72-7,78 (1H, m), 7,82 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,96-8,08 (2H, m), 8,30-8,38 (2H, m), 8,46-8,56 (2H, m).

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

Cho hợp chất (58mg, 0,060mmol) thu được trong quy trình 4 ở trên phản ứng theo cách giống như Quy trình 3 của Ví dụ 2 để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề (39mg, 62%).

¹H-NMR (CD₃OD) δ: 0,99 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,27 (2H, td, J=11,6, 6,1 Hz), 1,38-1,44 (2H, m), 1,50-1,63 (6H, m), 1,65-1,80 (2H, m), 1,89-1,98 (2H, m), 2,17-2,25 (3H, m), 2,26-2,36 (3H, m), 2,40 (3H, s), 2,95 (1H, dd, J=14,3, 9,2 Hz), 3,12 (1H, dd, J=13,7, 5,7 Hz), 3,15-3,25 (4H, m), 3,44 (2H, t, J=7,2 Hz), 3,65 (1H, d, J=17,2 Hz), 3,76 (1H,

d, $J=17,2$ Hz), 3,79-3,86 (4H, m), 4,43 (1H, dd, $J=8,9$, 6,0 Hz), 5,10 (1H, d, $J=18,9$ Hz), 5,25 (1H, d, $J=18,9$ Hz), 5,35 (1H, d, $J=16,6$ Hz), 5,56 (1H, d, $J=16,0$ Hz), 5,60-5,64 (1H, m), 6,76 (2H, s), 7,12-7,24 (6H, m), 7,58 (1H, s), 7,60 (1H, d, $J=10,9$ Hz), 7,68 (1H, t, $J=5,7$ Hz).

MS (ESI) m/z : 1060 ($M+H$)⁺

Quy trình 6: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (51)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gôm dung dịch (1,0mL) vào ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0147mL; 2,3 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch ở nhiệt độ 22°C trong thời gian 10 phút, bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 5 ở trên (0,0295mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,00590mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (PBS7,4 được sử dụng để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

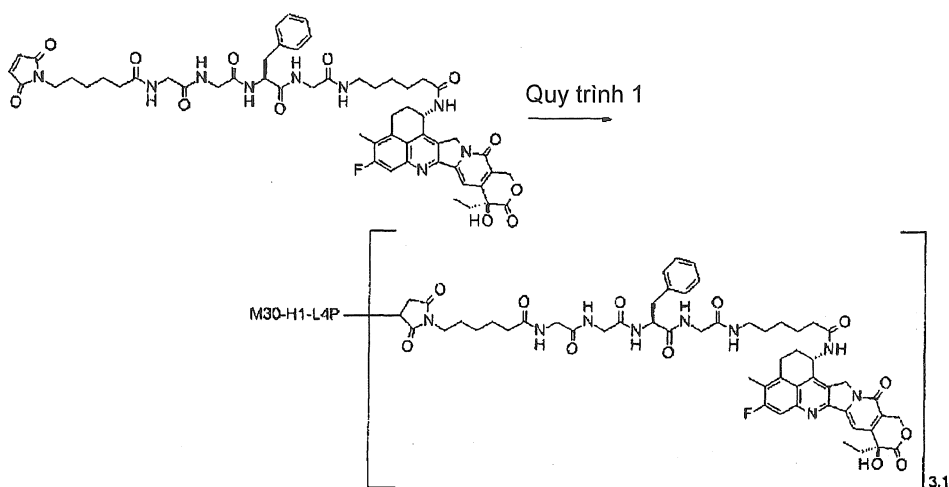
Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo),

và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,97mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,82mg (58%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 1,7.

Ví dụ 55: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (52)

Công thức 124



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (52)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch (1,0mL) vào ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0295mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch nêu trên ở nhiệt độ 22°C trong thời gian 10 phút, bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 5 của Ví dụ 54 (0,0590mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt

độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0118mL; 18,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

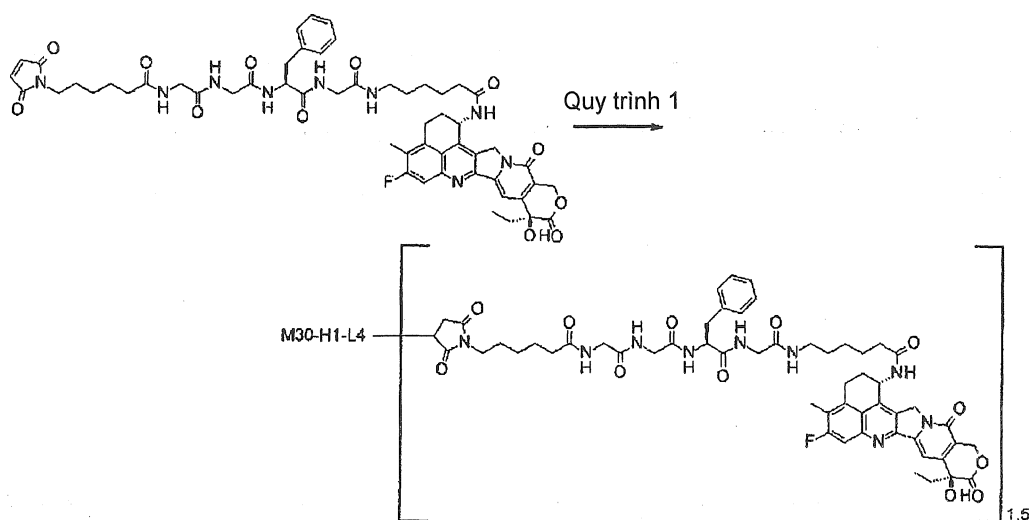
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (PBS7,4 được sử dụng để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,94mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,64mg (56%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,1.

Ví dụ 56: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (53)

Công thức 125



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (53)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và

Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch (1,0mL) vào ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0147mL; 2,3 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch ở nhiệt độ 22°C trong 10 phút, bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 5 của Ví dụ 54 (0,0295mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,00590mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa.

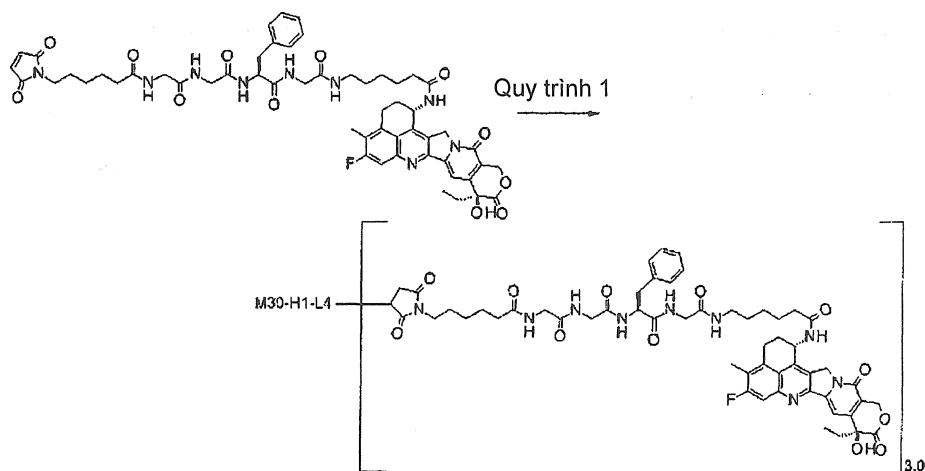
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (PBS7,4 được sử dụng để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,22mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,32mg (73%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 1,5.

Ví dụ 57: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (54)

Công thức 126



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (54)

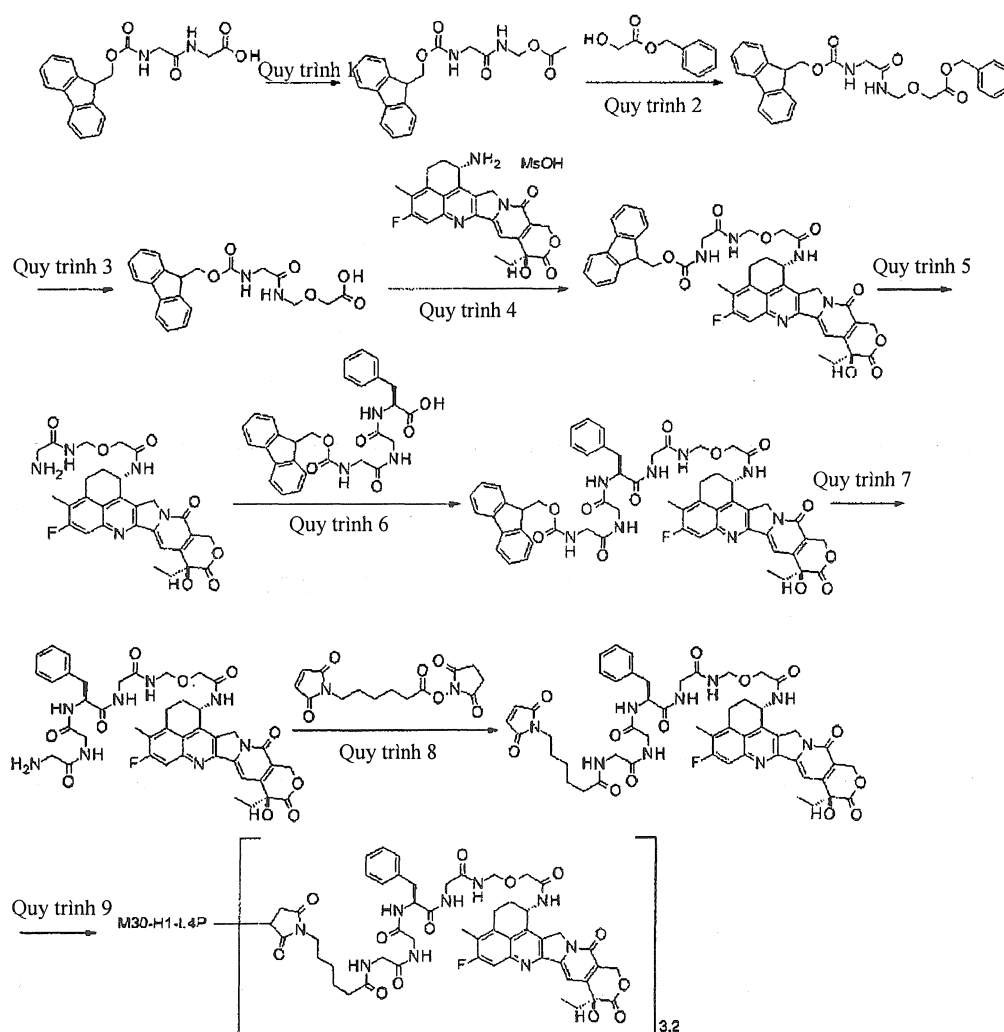
Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61 để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Gom dung dịch (1,0mL) vào ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0295mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0. 050mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi ủ dung dịch nêu trên ở nhiệt độ 22°C trong thời gian 10 phút, bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 5 của Ví dụ 54 (0,0590mL; 9,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào và ủ để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ 22°C trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0118mL; 18,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ 22°C trong 20 phút nữa. Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (PBS7,4 được sử dụng để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau. Nồng độ kháng thể: 1,06mg/mL, hiệu suất kháng thể: 6,36mg (64%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,0.

Ví dụ 58: Thê liên hợp kháng thể-thuốc (55)

Công thức 127



Quy trình 1: ({N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxyl}amino)metyl axetat

Bổ sung pyridin (1,16ml, 14,7mmol) và chì tetraaxetat (6,84g, 14,7mmol) vào hỗn hợp chứa N-9-florenylmethoxycarbonyl-L-glycyl-L-glycine (4,33g, 12,2mmol), tetrahydrofuran (120ml), và toluen (40,0ml), và hồi lưu trong điều kiện gia nhiệt trong

5 giờ. Sau khi làm nguội dung dịch phản ứng tới nhiệt độ trong phòng, loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Xelit, và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong etyl axetat và rửa bằng nước và nước muối bão hòa, và sau đó làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan. Sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [hexan : etyl axetat = 9 : 1 (thể tích/thể tích) - etyl axetat] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (3,00g, 67%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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]methoxy]axetat

Bổ sung kali tert-butoxit (2,24g, 20,0mmol) vào dung dịch tetrahydrofuran (40,0mL) chứa hợp chất (3,68g, 10,0mmol) thu được trong quy trình 1 và benzyl glycolat (4,99g, 30,0mmol) ở nhiệt độ 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Dung dịch phản ứng được nạp etyl axetat và nước ở nhiệt độ 0°C và chiết bằng etyl axetat và clorofom. Làm khô lớp hữu cơ thu được trên natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong đioxan (40,0mL) và nước (10,0mL), nạp natri hydro cacbonat (1,01g, 12,0mmol) và 9-florenylmetyl clorofomat (2,59g, 10,0mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp nước và chiết bằng etyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ thu được trên natri sulfat và được lọc. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [hexan : etyl axetat = 100 : 0 (thể tích/thể tích) - 0 : 100] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề ở dạng chất dạng dầu không màu (1,88g, 40%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 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]methoxy]acetic

Hòa tan hợp chất (1,88g, 3,96mmol) thu được trong quy trình 2 trong etanol (40,0mL) và etyl axetat (20,0ml). Sau khi bổ sung chất xúc tác paladi cacbon (376mg), khuấy nó trong môi trường hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Xelit, và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (1,52g, định lượng).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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-ylmethyl(2-[(2-[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino)-2-oxoethyl)carbamate

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, bổ sung N,N-diisopropyletylamin (92,9μL, 0,533mmol) và N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (0,143g, 0,693mmol) vào dung dịch N,N-dimethyl-formamide (10,0mL) chứa mesylat của hợp chất (4) (0,283g, 0,533mmol), N-hydroxysuccinimide (61,4mg, 0,533mmol), và hợp chất (0,205g, 0,533mmol) thu được trong quy trình 3 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - lớp hữu cơ được tách của clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt (0,352g, 82%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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 (M+H)⁺

Quy trình 5: N-[(2-{[(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}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Bổ sung piperidin (1,1mL) vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (11,0mL) chứa hợp chất (0,881g, 1,10mmol) thu được trong quy trình 4 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hỗn hợp chứa hợp chất nêu trong tiêu đề. Hỗn hợp này được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Quy trình 6: N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(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}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Trong điều kiện làm nguội bằng nước đá, bổ sung N,N'-dixyclohexylcarbodiimide (0,181g, 0,878mmol) vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (50,0mL) chứa hỗn hợp (0,439mmol) thu được trong quy trình 5, N-hydroxysuccinimide (0,101g, 0,878mmol), và N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)cacbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin (tức là, hợp chất được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2002-60351) (0,440g, 0,878mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu cam nhạt (0,269g, 58%).

MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)⁺

Quy trình 7: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(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}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Bổ sung piperidin (0,251mL, 2,53mmol) vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (4,00mL) chứa hợp chất (0,26g, 0,253mmol) thu được trong quy trình 6 ở trên, và khuấy

ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hỗn hợp chứa hợp chất nêu trong tiêu đề. 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-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]glyxinamit

Bổ sung N-succinimidyl 6-maleimide hexanoat (0,156g, 0,506mmol) vào dung dịch N,N-dimethyl-formamit (10,0mL) chứa hợp chất (0,253mmol) thu được trong quy trình 7 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phân cận thu được bằng phương pháp sắc ký cột silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,100g, 38%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 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: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (55)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng 1,61mL $\text{mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,025mL; 3,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa

dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,109mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 (0,039mL; 4,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,008mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

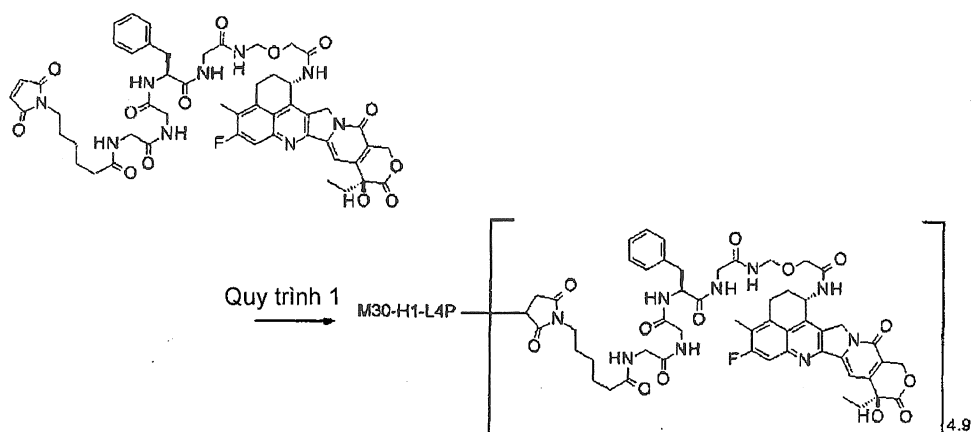
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đậm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 12,57mg/mL, hiệu suất kháng thể: 8,8mg (70%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,2.

Ví dụ 59: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (56)

Công thức 128



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (56)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,051mL; 6,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là 7,4 ± 0,1, khử liên kết disulfua ở phân bản lẻ trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,067mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,085mL; 10,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,013mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

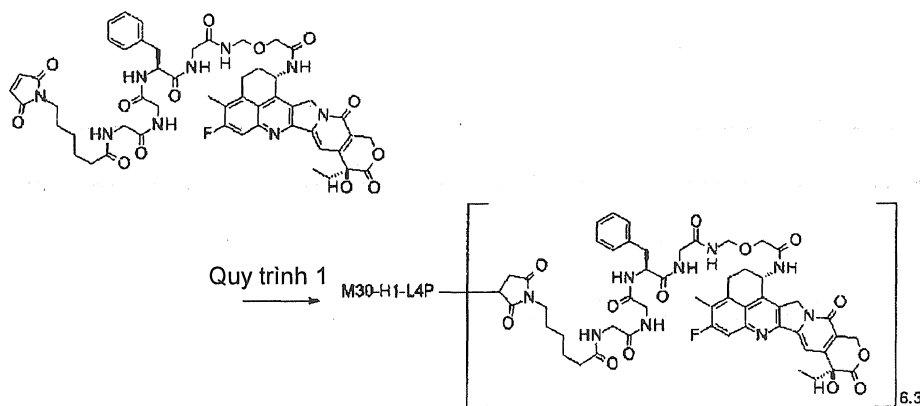
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,33mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,98mg (64%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 4,9.

Ví dụ 60: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (57)

Công thức 129



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (57)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 2 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung C-1 và Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL) được đặt trong ống polypropylen 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,051mL; 6,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng

dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dimethyl sulfoxit (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0,025mL) và dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,127mL; 15,0 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,019mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và khuấy để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

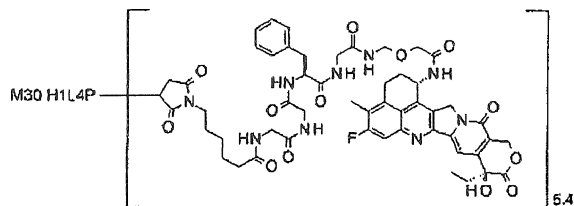
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch này theo Quy trình chung A được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5000$ (trị số trung bình được đo), và $\epsilon_{D,370} = 19000$ (trị số trung bình được đo) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,91mg/mL, hiệu suất kháng thể: 5,46mg (44%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,3.

Ví dụ 61: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (58)

Công thức 130

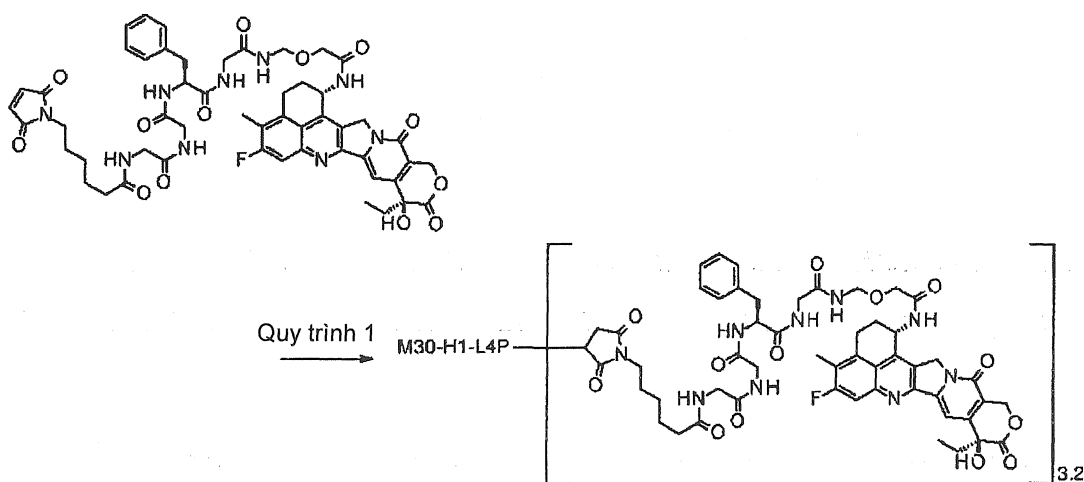


Trộn hầu hết toàn bộ các lượng thể liên hợp kháng thể-thuốc của Ví dụ 59 và 60 và cô dung dịch theo Quy trình chung A được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 12,30mg, và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,4.

Ví dụ 62: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (59)

Công thức 131



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (59)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (100mL, 1g kháng thể) được đặt trong bình cầu 250mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (2,43mL; 3,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và còn nạp cả dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat

1M (5mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch này có độ pH gần bằng 7,4 bằng cách sử dụng máy đo độ pH, liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (3,51mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dimethyl sulfoxit (2,14mL) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng máy khuấy để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 130 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,547mL) chứa NAC 100mM vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

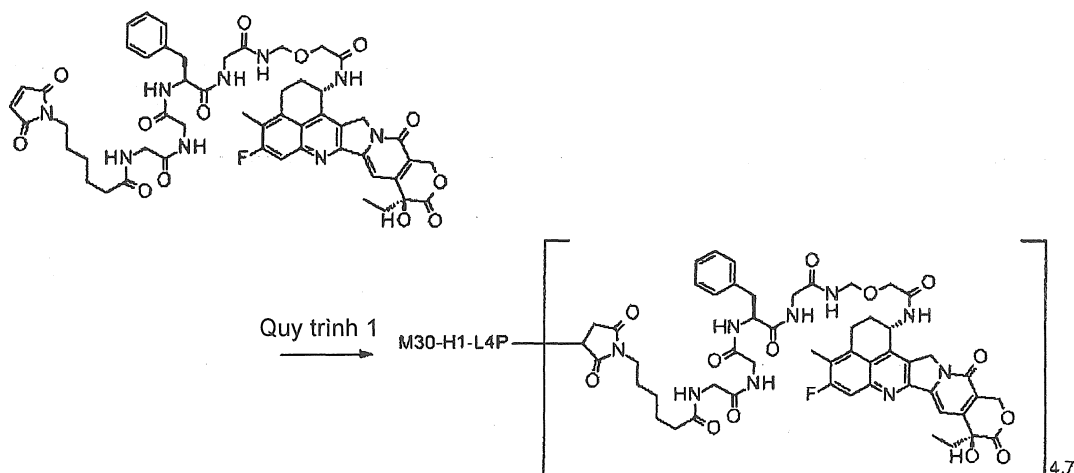
Tinh chế: tinh chế siêu lọc dung dịch trên đây bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc bao gồm màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), bơm dạng ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, Pump Head model 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Đặc biệt, trong khi bổ sung từng giọt ABS (tổng cộng là 800mL) để làm dung dịch đậm để tinh chế vào dung dịch phản ứng, tiến hành tinh chế siêu lọc để loại bỏ các chất liên kết thuốc không được liên hợp và chất phản ứng có phân tử lượng thấp khác, đồng thời thay thế dung dịch đậm bằng ABS, và ngoài ra còn cô dung dịch này, để tạo ra khoảng 70ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 14,2mg/mL, hiệu suất kháng thể: 1,0g (khoảng 100%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,2.

Ví dụ 63: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (60)

Công thức 132



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (60)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL với PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (5mL, 50mg kháng thể) được đặt trong ống 15mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,075mL; 4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH gần bằng 7,0 bằng cách sử dụng máy đo độ pH, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,219mL; 6,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dimethyl sulfoxit (0,064mL) vào dung dịch trên đây, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 90 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,033mL; 9,8 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

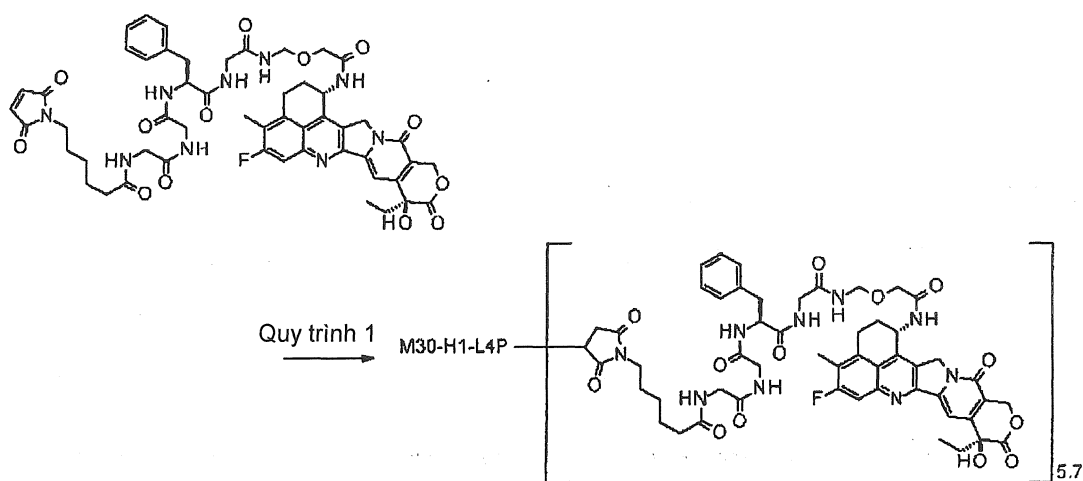
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 19ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 2,19mg/mL, hiệu suất kháng thể: 42mg (83%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 4,7.

Ví dụ 64: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (61)

Công thức 133



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (61)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4P được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (4mL, 40mg kháng thể) được đặt trong ống 15mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,14mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH gần bằng 7,0 bằng cách sử dụng máy đo độ pH, khử liên kết disulfua ở phân bản lẻ trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,232mL; 8,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây, ủ nó để liên hợp

chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 60 phút. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,035mL; 12,9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) chứa NAC 100mM vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

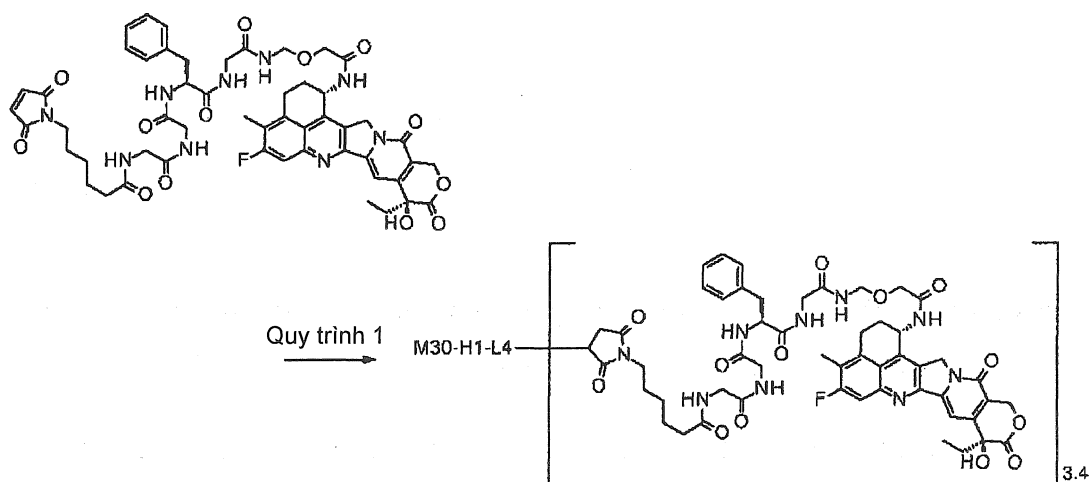
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 13ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 2,03mg/mL, hiệu suất kháng thể: 26mg (66%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,7.

Ví dụ 65: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (62)

Công thức 134



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (62)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng 1,61mLmg⁻¹cm⁻¹ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch

(1,25mL, 12,5mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0287mL; 3,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0439mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dimetyl sulfoxit (0,0267mL) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0066mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

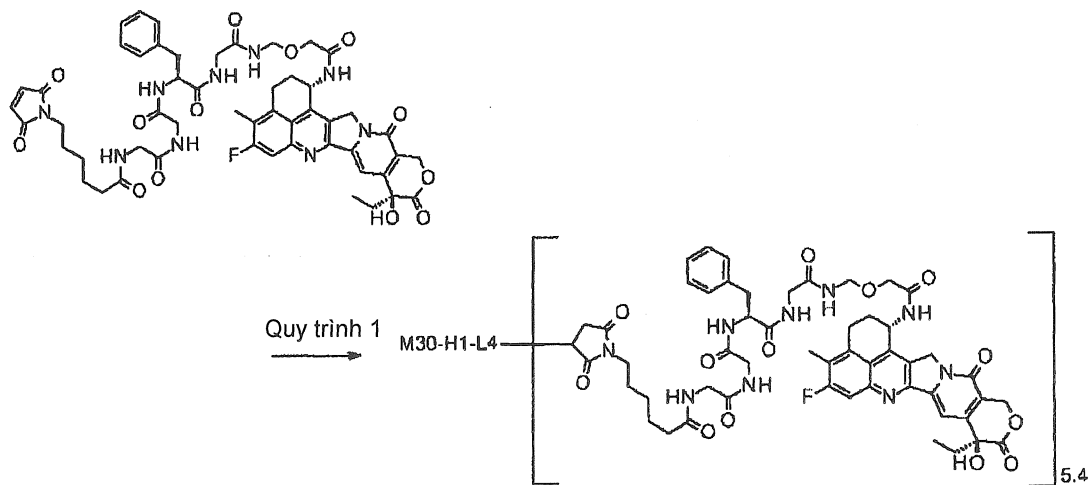
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 10,0 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,8 mg (62%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,4.

Ví dụ 66 Thể liên hợp kháng thể-thuốc (63)

Công thức 135



Quy trình 1: Thử liên hợp kháng thể-thuốc (63)

Khử kháng thể: kháng thể M30-H1-L4 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 1 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,61\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (1,25mL, 12,5mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0439mL; 5,2 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) (0,0287mL; 3,4 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0625mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,4 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0726mL; 8,6 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, ủ nó để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở nhiệt độ 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,011mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây bằng cách sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra

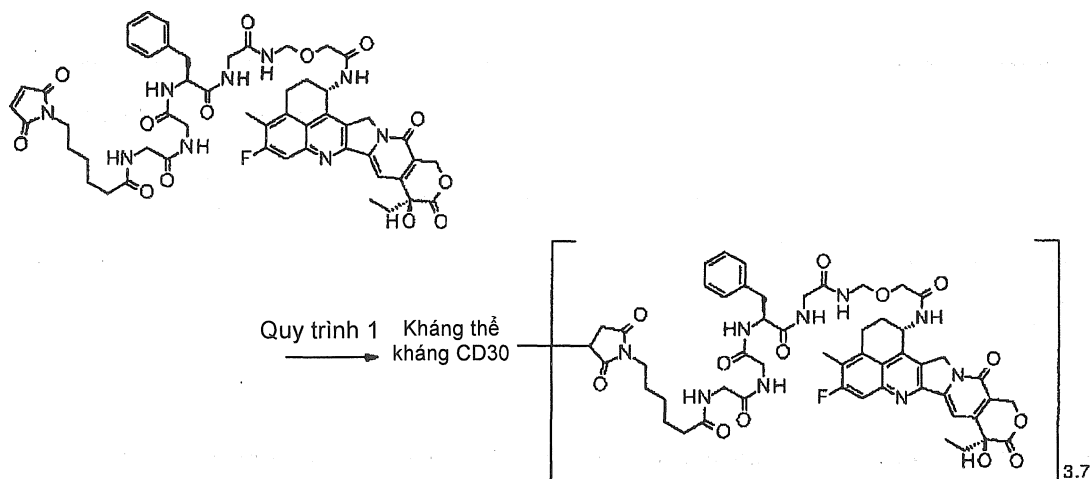
6ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề. Sau đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 235300$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 10,0mg/mL, hiệu suất kháng thể: 7,3mg (58%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 5,4.

Ví dụ 67: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (64)

Công thức 136



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (64)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD30 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,75\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065mL; 2,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0116mL; 4,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dimethyl sulfoxit (0,0101mL) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0017mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

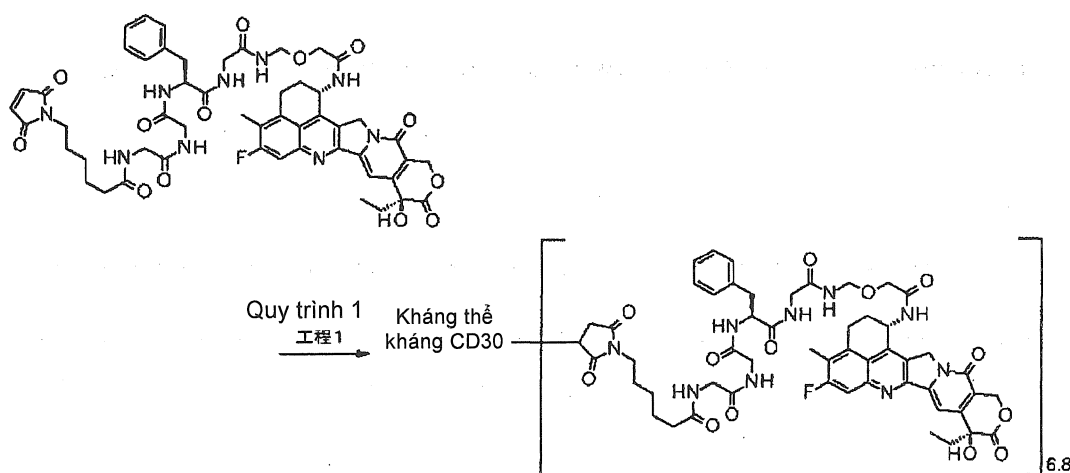
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 270400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,96mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,4mg (60%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,7.

Ví dụ 68: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (65)

Công thức 137



Quy trình 1: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (65)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD30 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (sử dụng $1,75\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129mL; 5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0233mL; 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0035mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

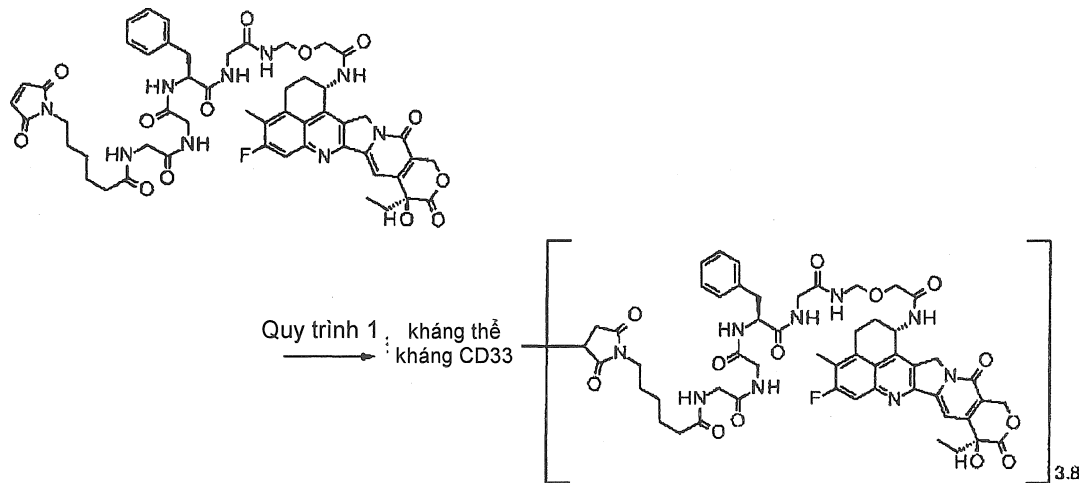
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thẻ liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 270400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 0,39mg/mL, hiệu suất kháng thể: 1,0mg (24%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 6,8.

Ví dụ 69: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (66)

Công thức 138



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (66)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD33 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 4 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm, $1,66\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ được sử dụng) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065mL; 2,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimetyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0116mL; 4,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dimetyl sulfoxit (0,0101mL) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0017mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

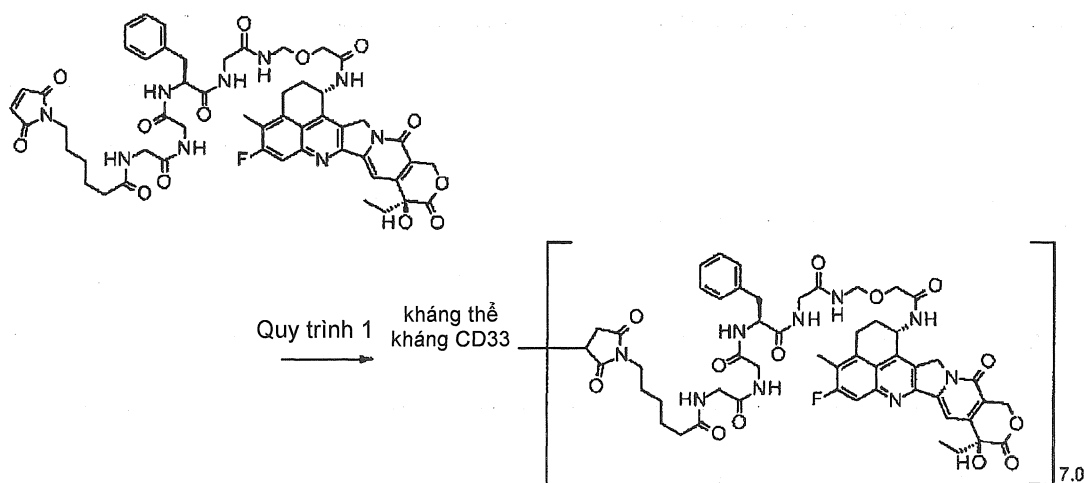
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 256400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,19mg/mL, hiệu suất kháng thể: 3,0mg (74%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,8.

Ví dụ 70: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (67)

Công thức 139



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (67)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD33 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 4 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL bằng PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm, $1,66\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ được sử dụng) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129mL; 5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm$

0,1, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0233mL; 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0035mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

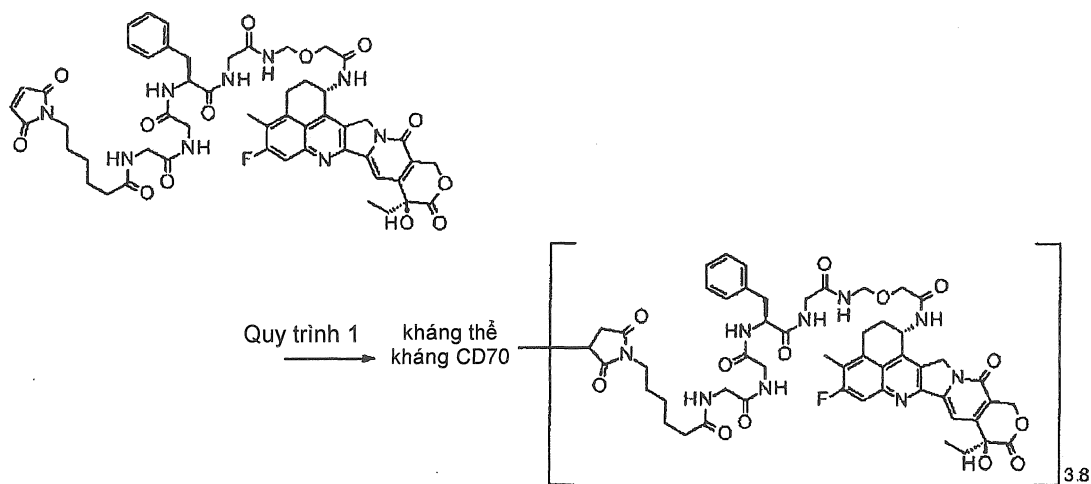
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thụ mol, $\epsilon_{A,280} = 256400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,24mg/mL, hiệu suất kháng thể: 3,1mg (78%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,0.

Ví dụ 71: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (68)

Công thức 140



Quy trình 1: Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc (68)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD70 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 5 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL với PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm, $1,69\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ được sử dụng) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0065mL; 2,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0058mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm 0,1$, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0116mL; 4,5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dimethyl sulfoxit (0,0101mL) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0017mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

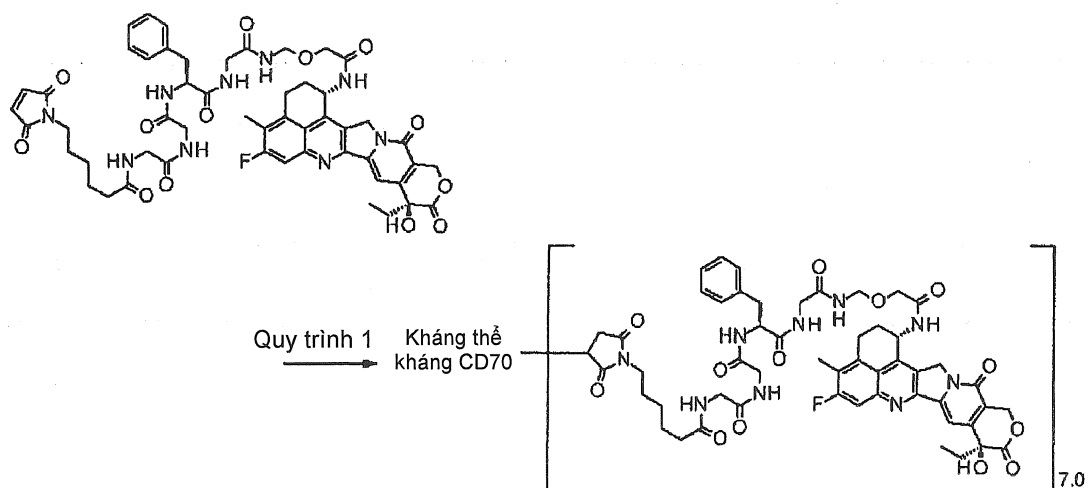
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 262400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,10mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,8mg (69%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 3,8.

Ví dụ 72: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (69)

Công thức 141



Quy trình 1: Thể liên hợp kháng thể-thuốc (69)

Khử kháng thể: kháng thể kháng CD70 được sản xuất trong Ví dụ tham chiếu 5 được điều chế để có nồng độ kháng thể là 10mg/mL với PBS6.5/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (để làm hệ số hấp thu ở bước sóng 280nm, $1,69\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ được sử dụng) và Quy trình chung C-1 được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (0,4mL, 4 mg kháng thể) được đặt trong ống 1,5mL và được nạp dung dịch nước chứa TCEP 10mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0129mL; 5 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa dikali hydro phosphat 1M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,006mL). Sau khi xác nhận rằng dung dịch có độ pH là $7,0 \pm$

0,1, khử liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể bằng cách ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ.

Liên hợp giữa kháng thể và chất liên kết thuốc: sau khi bổ sung dung dịch dimethyl sulfoxit chứa 10mM hợp chất thu được trong quy trình 8 của Ví dụ 58 (0,0233mL; 9 đương lượng trong mỗi phân tử kháng thể) vào dung dịch trên đây ở nhiệt độ trong phòng, khuấy nó bằng cách sử dụng bộ phận xoay dạng ống (MTR-103, được sản xuất bởi AS One Corporation) để liên hợp chất liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước (0,0035mL) chứa NAC 100mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) vào và ủ thêm để kết thúc phản ứng của chất liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

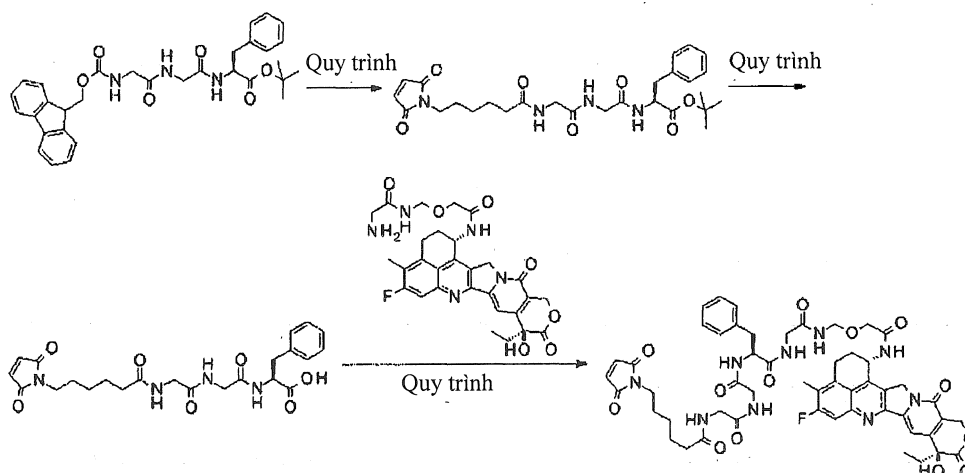
Tinh chế: tinh chế dung dịch trên đây sử dụng Quy trình chung D-1 (sử dụng ABS để làm dung dịch đệm) được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 để tạo ra 2,5ml dung dịch chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc nêu trong tiêu đề.

Đặc tính lý hóa: bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong Phương pháp sản xuất 1 (để làm hệ số hấp thu mol, $\epsilon_{A,280} = 262400$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{A,370} = 0$ (trị số tính toán theo ước tính), $\epsilon_{D,280} = 5178$ (trị số đo được), và $\epsilon_{D,370} = 20217$ (trị số đo được) được sử dụng), thu được các trị số đặc trưng sau.

Nồng độ kháng thể: 1,16mg/mL, hiệu suất kháng thể: 2,9mg (73%), và số lượng phân tử thuốc được liên hợp trung bình (n) trong mỗi phân tử kháng thể: 7,0.

Ví dụ 73: Phương pháp khác để tổng hợp hợp chất của Quy trình 8 của Ví dụ 58

Công thức 142



Quy trình 1: Tert-butyl N-[6-(2,5-đioxo-2,5-đihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenyl alaninat

Trong môi trường làm lạnh bằng nước đá, bổ sung 1,8-điazabicyclo[5.4.0]-7-undecen (0,400ml) vào dung dịch THF (12,0ml) chứa tert-butyl N-[(9H-floren-9-ylmethoxy)carbonyl]glyxylglyxyl-L-phenyl alaninat (J. Pept. Res., 1999, vol. 53, trang 393) (0,400g, 0,717mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày, và sau đó bổ sung thêm N-succinimidyl 6-maleimide hexanoat (0,221g, 0,717mmol) vào và khuấy trong 3 giờ. Pha loãng dung dịch phản ứng bằng ethyl axetat và rửa bằng dung dịch nước chứa axit citric 10%, dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat, và nước muối bão hòa, và sau đó làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat khan. Sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 9 : 1 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,295g, 78%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,28-1,36 (2H, m), 1,41 (9H, s), 1,57-1,71 (4H, m), 2,23 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 3,09 (2H, d, $J=6,0$ Hz), 3,51 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 3,85-4,02 (4H, m), 4,69-4,78 (1H, m), 6,15 (1H, t, $J=4,6$ Hz), 6,33 (1H, d, $J=7,3$ Hz), 6,60 (1H, t, $J=5,0$ Hz), 6,68 (2H, s), 7,10-7,16 (2H, m), 7,22-7,31 (3H, m).

MS (ESI) m/z : 529 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

Quy trình 2: N-[6-(2,5-đioxo-2,5-đihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin

Bổ sung axit trifloaxetic (4,00mL) vào dung dịch diclometan (8,00ml) chứa hợp chất (0,295g, 0,558mmol) thu được trong quy trình 1, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,240g, 91%).

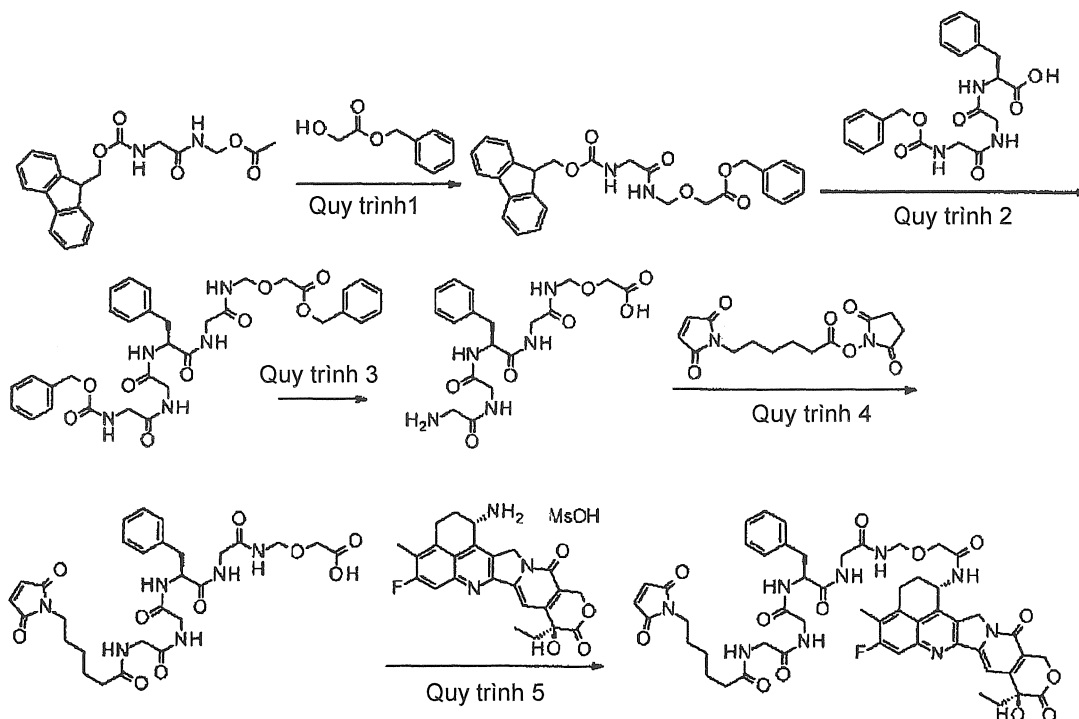
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1,15-1,23 (2H, m), 1,40-1,53 (4H, m), 2,10 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 2,88 (1H, dd, $J=13,7, 8,9$ Hz), 3,04 (1H, dd, $J=13,7, 5,0$ Hz), 3,35-3,43 (2H, m), 3,58-3,77 (4H, m), 4,41 (1H, td, $J=7,8, 5,0$ Hz), 7,00 (2H, s), 7,16-7,31 (5H, m), 8,00 (1H, t, $J=5,7$ Hz), 8,06 (1H, t, $J=5,7$ Hz), 8,13 (1H, d, $J=7,8$ Hz).

Quy trình 3: N-[6-(2,5-đioxo-2,5-đihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-metyl-10,13-đioxo-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

Hòa tan hợp chất (0,572g, 1,21mmol) thu được trong quy trình 2 trong điclorometan (12,0mL), nạp N-hydroxysuccinimit (0,152g, 1,32mmol) và 1-(3-đimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (0,253g, 1,32mmol), và khuấy trong 1 giờ. Bổ sung dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-đimetyl-formamit (22,0mL) chứa hỗn hợp (1,10mmol) thu được trong quy trình 5 của Ví dụ 58, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Nạp dung dịch nước chứa axit xitric 10% vào dung dịch phản ứng và chiết bằng clorofom. Làm khô lớp hữu cơ thu được trên natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,351g, 31%). Dữ liệu thử nghiệm về hợp chất này là giống như dữ liệu thử nghiệm về hợp chất trong Quy trình 8 của Ví dụ 58.

Ví dụ 74: Phương pháp khác để tổng hợp hợp chất trong Quy trình 8 của Ví dụ 58

Công thức 143



Quy trình 1: Benzyl [(N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxyl)amino]metoxy]axetat

Bổ sung benzyl glycolat (6,65g, 40,0mmol) và monohydrat của axit p-toluen sulfonic (0,381g, 2,00mmol) vào dung dịch tetrahydrofuran (200ml) chứa hợp chất (7,37g, 20,0mmol) thu được trong quy trình 1 của Ví dụ 58 ở nhiệt độ 0°C và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ và 30 phút. Dung dịch phản ứng được nạp dung dịch nước bão hòa chứa natri hydro cacbonat và chiết bằng etyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ thu được trên natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [hexan : etyl axetat = 100 : 0 (thể tích/thể tích) - 0 : 100] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (6,75g, 71%). Dữ liệu thử nghiệm về hợp chất này là giống như dữ liệu thử nghiệm về hợp chất trong Quy trình 2 của Ví dụ 58.

Quy trình 2: N-[(Benzyloxy)carbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanine-N-[(2-(benzyloxy)-2-oxoethoxy)methyl]glyxinamidit

Bổ sung 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (2,22g, 14,6mmol) vào dung dịch N,N-dimetyl-formamid (140mL) chứa hợp chất (6,60g, 13,9mmol) thu được trong quy

trình 1 ở nhiệt độ 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Dung dịch phản ứng được nạp dung dịch N,N-dimetyl-formamit (140mL) chứa N-[(benzyloxy)carbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin (6,33g, 15,3mmol), N-hydroxysuccinimit (1,92g, 16,7mmol), và 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimitt hydroclorua (3,20g, 16,7mmol) được khuấy trước ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp axit clohydric 0,1N và chiết bằng clorofom. Làm khô lớp hữu cơ thu được trên natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (7,10g, 79%).

¹H-NMR (DMSO-D₆) δ: 2,78 (1H, dd, J=13,9, 9,6 Hz), 3,05 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,56-3,80 (6H, m), 4,15 (2H, s), 4,47-4,55 (1H, m), 4,63 (2H, d, J=6,6 Hz), 5,03 (2H, s), 5,15 (2H, s), 7,16-7,38 (15H, m), 7,52 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,5 Hz), 8,17 (1H, d, J=8,2 Hz), 8,36 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,61 (1H, t, J=6,6 Hz).

Quy trình 3: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(carboxymetoxymetyl)]glyxinamit

Bổ sung chất xúc tác paladi cacbon (7,00g) vào dung dịch N,N-dimetyl-formamit (216mL) chứa hợp chất (7,00g, 10,8mmol) thu được trong quy trình 2 và khuấy trong môi trường hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Xelit, và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong nước, loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Xelit, và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Lặp lại trình tự này hai lần để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (3,77g, 82%).

¹H-NMR (DMSO-D₆) δ: 2,84 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,08 (1H, dd, J=13,7, 4,7 Hz), 3,50-3,72 (4H, m), 3,77-3,86 (2H, m), 3,87 (2H, s), 4,52-4,43 (1H, m), 4,61 (2H, d, J=6,6 Hz), 7,12-7,30 (5H, m), 8,43 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,54 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,70 (1H, t, J=6,3 Hz), 8,79 (1H, t, J=5,5 Hz).

Quy trình 4: N-[6-(2,5-dioxa-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(carboxymetoxymetyl)]glyxinamit

Bổ sung axit N-succinimidyl 6-maleimide hexanoic (2,88g, 9,33mmol) và triethylamin (0,858g, 8,48mmol) vào dung dịch N,N-dimethyl-formamid (85,0mL) chứa hợp chất (3,59g, 8,48mmol) thu được trong quy trình 3, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng được nạp axit 0,1N clohydric và chiết bằng clorofom và dung môi được trộn của clorofom và metanol [clorofom : metanol = 4 : 1 (thể tích/thể tích)]. Làm khô lớp hữu cơ thu được trên natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - lớp hữu cơ được tách của clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn không màu (3,70g, 71%).

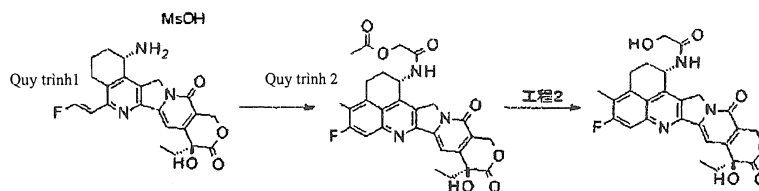
¹H-NMR (DMSO-D₆) δ: 1,13-1,24 (2H, m), 1,42-1,53 (4H, m), 2,11 (2H, t, J=7,4 Hz), 2,80 (1H, dd, J=13,7, 9,8 Hz), 3,06 (1H, dd, J=13,9, 4,5 Hz), 3,37 (2H, t, J=7,2 Hz), 3,56-3,78 (6H, m), 3,97 (2H, s), 4,46-4,53 (1H, m), 4,61 (2H, d, J=6,3 Hz), 7,00 (2H, s), 7,15-7,29 (5H, m), 8,03-8,20 (3H, m), 8,32 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,7 Hz).

Quy trình 5: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-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]glyxinamid

Bổ sung triethylamin (0,202g, 2,00mmol), hợp chất (1,48g, 2,40mmol) thu được trong quy trình 4, và 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium clorua (0,993g, 3,00mmol) chứa nước 16,4% vào dung dịch N,N-dimethyl-formamid (40,0mL) chứa mesylat của hợp chất (4) (1,14g, 2,00mmol) ở nhiệt độ 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 8 : 2 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (1,69g, 82%). Dữ liệu thử nghiệm về hợp chất này là giống như dữ liệu thử nghiệm về hợp chất trong Quy trình 8 của Ví dụ 58.

Ví dụ 75: 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]-2-hydroxyacetamid

Công thức 144



Quy trình 1: 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-oxoethylaxetat

Trong môi trường làm lạnh bằng nước đá, bổ sung N,N-diisopropyletylamin (0,492mL, 2,82mmol) và axetoxaxetyl clorua (0,121ml, 1,13mmol) vào hỗn dịch N,N-dimetyl-formamit (20,0mL) chứa mesylat của hợp chất (4) (0,500g, 0,941mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - lớp hữu cơ được tách của clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,505g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,4$ Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,08 (3H, s), 2,08-2,22 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,14-3,21 (2H, m), 4,51 (2H, dd, $J=19,4, 14,7$ Hz), 5,22 (2H, dd, $J=40,1, 19,0$ Hz), 5,43 (2H, s), 5,56-5,61 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,31 (1H, s), 7,81 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 8,67 (1H, d, $J=8,6$ Hz).

MS (ESI) m/z : 536 ($M+H$) $^+$

Quy trình 2: N-[(1S,9S)-9-etyl-5-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]-2-hydroxyaxetamit

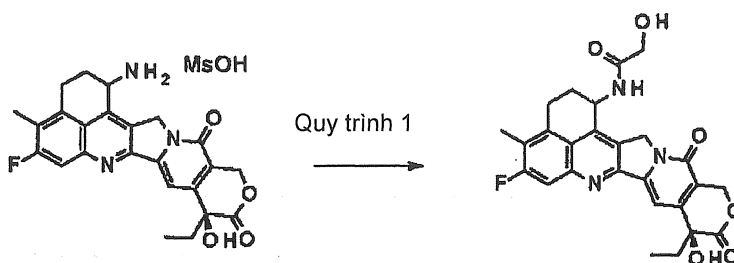
Bổ sung tetrahydrofuran (20,0ml) và dung dịch nước chứa natri hydroxit 1N (4,00ml, 4,00mmol) vào hỗn dịch metanol (50,0mL) của hợp chất (0,504g, 0,941mmol) thu được trong quy trình 1 và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Kết thúc phản ứng bằng cách bổ sung axit clohydric 1N (5,00 ml, 5,00mmol), và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - lớp hữu cơ được tách của clorofom : metanol : nước = 7 : 3 : 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,412g,

89%). Hợp chất này được xác nhận trong khối u của chuột nhắt mang bệnh ung thư mà nhận thể liên hợp kháng thể-thuốc (55) hoặc (56).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,87 (3H, t, $J=7,3$ Hz), 1,78-1,95 (2H, m), 2,09-2,28 (2H, m), 2,39 (3H, s), 3,07-3,27 (2H, m), 3,96 (2H, d, $J=6,0$ Hz), 5,11-5,26 (2H, m), 5,42 (2H, s), 5,46-5,54 (1H, m), 5,55-5,63 (1H, m), 6,52 (1H, s), 7,30 (1H, s), 7,78 (1H, d, $J=10,9$ Hz), 8,41 (1H, d, $J=9,1$ Hz). MS (ESI) m/z : 494 ($M+H$) $^+$

Ví dụ 76: Phương pháp khác để tổng hợp hợp chất của Ví dụ 75

Công thức 145



Quy trình 1: N-[(1S,9S)-9-etyl-5-flu-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]-2-hydroxyaxetamit

Hòa tan axit glycolic (0,0201g, 0,27mmol) trong N,N-đimetyl-formamit (1,0mL), nạp N-hydroxysuccinimit (0,0302g, 0,27mmol) và 1-(3-đimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimitt hydroclorua (0,0508g, 0,27mmol), và khuấy trong 1 giờ. Bổ sung dung dịch phản ứng vào hỗn dịch N,N-đimetyl-formamit (1,0mL) đã nạp mesylat của hợp chất (4) (0,1g, 0,176mmol) và trietylamin (0,025mL, 0,18mmol) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cột sắc ký silica gel [clorofom - clorofom : metanol = 10 : 1 (thể tích/thể tích)] để tạo ra hợp chất nêu trong tiêu đề dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,080g, 92%). Dữ liệu thử nghiệm về hợp chất này là giống như dữ liệu thử nghiệm về hợp chất thu được trong quy trình 2 của Ví dụ 75.

Ví dụ thử nghiệm 1: Sản xuất vectơ biểu hiện biến thể 1 của B7-H3 độ dài đầy đủ của người

Khuếch đại cADN mã hóa biến thể 1 của B7-H3 của người bằng phản ứng PCR bằng cách sử dụng cADN tổng hợp được từ tế bào LNCaP (Thư viện giống chuẩn Hoa Kỳ: American Type Culture Collection - ATCC), ARN tổng thể làm mẫu và bộ môi sau:

môi 1:

5'-ctatagggagaccaagctggctagcatgctgcgtcgcggggcag-3' (SEQ ID NO: 22) và

môi 2:

5'-aacgggcccctctagactcgagcggccgctcaggtattcttgcctcatcttcttgctgtcag-3' (SEQ ID NO: 23).

Tiếp theo, tinh chế sản phẩm PCR thu được bằng cách sử dụng MagExtractor PCR & Gel cleanup (Toyobo Co., Ltd.). Sản phẩm đã được tinh chế này còn được phân hủy bằng enzym giới hạn (NheI/NotI) và sau đó tinh chế bằng cách sử dụng MagExtractor PCR & Gel cleanup (Toyobo Co., Ltd.). Phân hủy pcADN3.1 (+) plasmit ADN (Life Technologies) bằng enzym giới hạn giống như enzym trên đây (NheI/NotI) và sau đó tinh chế bằng cách sử dụng MagExtractor PCR & Gel cleanup (Toyobo Co., Ltd.).

Các dung dịch ADN đã được tinh chế này được trộn, được nạp thêm Ligation high (Toyobo Co., Ltd.), và được ủ để nối ở nhiệt độ 16°C trong 8 giờ.

Biến nạp các tế bào khả biến *Escherichia coli* DH5α (Life Technologies) bằng cách bổ sung sản phẩm phản ứng thu được.

Đưa các khuẩn lạc thu được từ đó vào PCR định hướng khuẩn lạc bằng cách sử dụng môi PCR và môi nghịch BGH để chọn lọc các dòng ứng viên.

Nuôi cấy các dòng ứng viên thu được này trong môi trường lỏng (LB/Amp), và chiết plasmit ADN bằng MagExtractor-Plasmit- (Toyobo Co., Ltd.).

So sánh mỗi dòng thu được với trình tự CDS được tạo ra bằng cách phép phân tích giải trình tự giữa

môi 3 (môi trợ xúc tác CMV):

5'-cgcaaatgggcggtaggcgtg-3' (SEQ ID NO: 24) và

mỗi 4 (mỗi nghịch BGH):

5'-tagaaggcacagtcgagg-3' (SEQ ID NO: 25)

với plasmid ADN thu được làm mẫu.

Sau khi xác nhận trình tự, nuôi cấy dòng thu được trong 200ml môi trường LB/Amp, và chiết plasmid ADN bằng cách sử dụng bộ kit VioGene Plasmid Midi V-100.

Vectơ được ký hiệu là pcADN3.1-B7-H3. Trình tự của điểm ORF của gen biến thể 1 của B7-H3 đã được tách dòng trong vectơ được thể hiện ở các vị trí nucleotit từ 1 đến 1602 của SEQ ID NO: 26 (Fig.16) trong danh mục trình tự. Ngoài ra, trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3 được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự.

Ví dụ thử nghiệm 2: Tạo ra tế bào CCRF-CEM biểu hiện ổn định gen biến thể 1 của B7-H3

Chuyển nhiễm pcADN3.1-B7-H3 được sản xuất trong Ví dụ thử nghiệm 1 vào tế bào CCRF-CEM (ATCC) bằng cách điện di bằng cách sử dụng Nucleofector II (được sản xuất bởi Lonza Group Ltd.). Sau đó, các tế bào còn được nuôi cấy trong hai đêm trong môi trường RPMI1640 (Life Technologies) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (fetal bovine serum - FBS) (dưới đây, được gọi là FBS 10%-RPMI1640) trong điều kiện là nhiệt độ 37°C và CO₂ 5%.

Sau 2 ngày nuôi cấy, bắt đầu nuôi cấy trong môi trường FBS 10%-RPMI1640 chứa 750µg/mL G418 (Life Technologies) để chọn lọc các tế bào CCRF-CEM, trong đó pcADN3.1-B7-H3 được tổng hợp một cách ổn định.

Sau 1 tháng nuôi cấy, tiến hành tách dòng theo phương pháp pha loãng giới hạn để thu được dòng tế bào duy nhất. Cụ thể là, pha loãng các tế bào có tính kháng G418 thành 10 tế bào/mL, cấy truyền vào đĩa 96 lỗ ở nồng độ là 100µL/lỗ, và nuôi cấy, và thu hồi các tế bào được cho tăng sinh từ các lỗ riêng lẻ này.

Sử dụng phép đếm tế bào theo dòng chảy để xác nhận sự biểu hiện của B7-H3 trong mỗi dòng được thu hồi. Cụ thể, rửa mỗi dòng được thu hồi này hai lần bằng PBS

chứa FBS 5%, sau đó tạo huyền phù bằng cách bổ sung PBS chứa FBS 5% và 10 μ g/mL M30, và giữ nguyên ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Rửa hai lần dòng này bằng PBS chứa FBS 5%, sau đó tạo huyền phù bằng cách bổ sung phân đoạn IgG của dê được liên hợp huỳnh quang vào IgG của chuột nhắt (Toàn bộ Phân tử) (#55493, được sản xuất bởi ICN Pharmaceuticals, Inc.) đã được pha loãng 1000 lần bằng PBS chứa FBS 5%, và giữ nguyên ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Rửa hai lần dòng này bằng PBS chứa FBS 5%, sau đó tạo huyền phù lại trong PBS chứa FBS 5%, và phát hiện ra bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng chảy (FC500: Beckman Coulter, Inc.).

Tế bào CCRF-CEM biểu hiện ổn định gen biến thể 1 của B7-H3 thu được như vậy theo các quy trình này được ký hiệu là tế bào CEM_V1_3.1_2. Các tế bào CCRF-CEM dòng mẹ được dùng làm dòng tế bào thiếu sự biểu hiện B7-H3.

Ví dụ thử nghiệm 3: Thử nghiệm tính độc tế bào (1) của thể liên hợp kháng thể-thuốc

Nuôi cấy các tế bào CEM_V1_3.1_2 được sản xuất trong Ví dụ thử nghiệm 2 hoặc các tế bào CCRF-CEM (ATCC) trong RPMI1640 (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Điều chế các tế bào CEM_V1_3.1_2 hoặc các tế bào CCRF-CEM để có nồng độ là 8×10^4 tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường, bổ sung ở nồng độ là 25 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào đã nạp môi trường 65 μ L/lỗ, và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày tiếp theo, bổ sung mỗi trong số kháng thể M30-H1-L4, kháng thể M30-H1-L4P và thể liên hợp kháng thể-thuốc đã được pha loãng đến 1000nM, 200nM, 40nM, 8nM, 1,6nM, 0,32nM, và 0,064nM bằng cách sử dụng môi trường ở nồng độ là 10 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung môi trường ở nồng độ là 10 μ L/lỗ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Nuôi cấy các tế bào trong môi trường CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày. Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (PerkinElmer). Trị số IC₅₀ được tính theo công thức sau:

$$IC_{50} \text{ (nM)} = \text{đối logarit} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10b} - \text{LOG}_{10a}) / (d - c) + \text{LOG}_{10b})$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mối liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ các tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm ($n = 2$)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm ($n = 10$)

Các thể liên hợp kháng thể-thuốc (5), (16), (21), (32), (44), (45), (46), (52), và (54) có hoạt tính gây độc tế bào là $IC_{50} < 0,1$ (nM) kháng các tế bào CEM_V1_3.1_2. Các thể liên hợp kháng thể-thuốc (1), (12), (13), (20), (28), (29), (35), (36), (37), (41), (49), và (53) có hoạt tính gây độc tế bào là $0,1 < IC_{50} < 1$ (nM) kháng các tế bào này. Các thể liên hợp kháng thể-thuốc (33), (34), (47), (48), (50), và (51) có hoạt tính gây độc tế bào là $1 < IC_{50} < 100$ (nM) kháng các tế bào này. Mặt khác, không có thể liên hợp kháng thể-thuốc nào trong số các thể liên hợp kháng thể-thuốc này có hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào CCRF-CEM (> 100 (nM)). Cả kháng thể M30-H1-L4 và kháng thể M30-H1-L4P đều không có hoạt tính gây độc tế bào kháng cả hai tế bào này (> 100 (nM)).

Ví dụ thử nghiệm 4: Thử nghiệm độ gây độc tế bào (2) của thể liên hợp kháng thể-thuốc

Nuôi cấy các tế bào SR của các tế bào dương tính với kháng nguyên (ATCC) hoặc các tế bào Daudi của các tế bào âm tính với kháng nguyên (ATCC) trong RPMI1640 (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Chuẩn bị các tế bào SR hoặc các tế bào Daudi để có nồng độ là $2,8 \times 10^4$ tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường và bổ sung ở nồng độ là 90 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào. Sau hai giờ, bổ sung mỗi trong số kháng

thể kháng CD30 và các thể liên hợp kháng thể-thuốc (6) và (7) mà đã được pha loãng đến 40nM, 8nM, 1,6nM, 320pM, 64pM, 12,8pM, và 2,6pM bằng cách sử dụng môi trường ở nồng độ là 10 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung môi trường ở nồng độ 10 μ L/lỗ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Nuôi cấy các tế bào trong môi trường CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày. Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (PerkinElmer). Trị số IC₅₀ được tính theo công thức sau:

$$IC_{50} \text{ (nM)} = \text{đôi logarit} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mối liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm (n = 2)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm (n = 12)

Các thể liên hợp kháng thể-thuốc (6) và (7) có hoạt tính gây độc tế bào là IC₅₀ < 0,01 (nM) kháng các tế bào SR. Mặt khác, các thể liên hợp kháng thể-thuốc (6) và (7) không có hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào Daudi (> 4,0 (nM)). Kháng thể kháng CD30 không có hoạt tính gây độc tế bào kháng cả hai tế bào này (> 4,0 (nM)).

Ví dụ thử nghiệm 5: Thử nghiệm độ gây độc tế bào (3) của thể liên hợp kháng thể-thuốc

Nuôi cấy các tế bào SR của các tế bào dương tính với kháng nguyên (ATCC) trong RPMI1640 (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Các tế bào SR được chuẩn bị để có nồng độ là $2,8 \times 10^4$ tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường và bổ sung ở nồng độ 90 μL /lỗ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào. Sau hai giờ, bổ sung mỗi trong số kháng thể kháng CD30 và các thể liên hợp kháng thể-thuốc (22), (23), (38), (64), và (65) mà đã được pha loãng đến 1000nM, 100nM, 10nM, 1nM, 100 pM, 10pM, và 1pM bằng cách sử dụng môi trường ở nồng độ 10 μL /lỗ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung môi trường ở nồng độ 10 μL /lỗ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Nuôi cấy các tế bào trong điều kiện CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong 6 ngày. Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (PerkinElmer). Trị số IC₅₀ được tính theo công thức sau:

$$\text{IC}_{50} \text{ (nM)} = \text{đổi logarit } ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mỗi liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm (n = 2)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm (n = 12)

Các thể liên hợp kháng thể-thuốc (23), (38), (64), và (65) có hoạt tính gây độc tế bào là $\text{IC}_{50} < 0,01$ (nM) kháng các tế bào SR. Thể liên hợp kháng thể-thuốc (22) có hoạt

tính gây độc tế bào là $IC_{50} < 0,1$ (nM) kháng các tế bào SR. Kháng thể kháng CD30 không có hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào SR ($> 4,0$ (nM)).

Ví dụ thử nghiệm 6: Thử nghiệm độ gây độc tế bào (4) của thể liên hợp kháng thể-thuốc

Nuôi cấy các tế bào HL-60 của các tế bào dương tính với kháng nguyên (ATCC) hoặc các tế bào Raji của các tế bào âm tính với kháng nguyên (ATCC) trong RPMI1640 (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Các tế bào HL-60 hoặc các tế bào Raji được chuẩn bị để có nồng độ là 8×10^4 tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường và bổ sung ở nồng độ $25\mu\text{L}/\text{lỗ}$ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào đã nạp môi trường $65\mu\text{L}/\text{lỗ}$. Bổ sung mỗi trong số kháng thể kháng CD33 và các thể liên hợp kháng thể-thuốc (8) và (9) mà đã được pha loãng đến 1000nM, 200nM, 40nM, 8nM, 1,6nM, 0,32nM, và 0,064nM bằng cách sử dụng môi trường ở nồng độ $10\mu\text{L}/\text{lỗ}$ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung môi trường ở nồng độ $10\mu\text{L}/\text{lỗ}$ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Nuôi cấy các tế bào trong 3 ngày trong điều kiện O_2 5% C ở nhiệt độ 37°C . Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (PerkinElmer). Trị số IC_{50} được tính theo công thức sau:

$$IC_{50} \text{ (nM)} = \text{đôi logarit } ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mối liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm ($n = 2$)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm (n = 5)

các thể liên hợp kháng thể-thuốc (8) và (9) có hoạt tính gây độc tế bào là $IC_{50} < 0,1$ (nM) kháng các tế bào HL-60. Mặt khác, các thể liên hợp kháng thể-thuốc (8) và (9) không có hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào Raji (> 100 (nM)). Kháng thể kháng CD33 không có hoạt tính gây độc tế bào kháng cả hai tế bào này (> 100 (nM)).

Ví dụ thử nghiệm 7: Thử nghiệm độ gây độc tế bào (5) của thể liên hợp kháng thể-thuốc

Nuôi cấy các tế bào NOMO-1 của các tế bào dương tính với kháng nguyên (HSRRB) trong RPMI1640 (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Các tế bào NOMO-1 được chuẩn bị để có nồng độ là $2,8 \times 10^4$ tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường và bổ sung ở nồng độ $90\mu\text{L}/\text{lỗ}$ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào. Sau hai giờ, bổ sung mỗi trong số kháng thể kháng CD33 và các thể liên hợp kháng thể-thuốc (24), (25), và (67) mà đã được pha loãng đến 1000nM, 200nM, 40nM, 8nM, 1,6nM, 0,32nM, và 0,064nM bằng cách sử dụng môi trường ở nồng độ là $10\mu\text{L}/\text{lỗ}$ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung môi trường ở nồng độ $10\mu\text{L}/\text{lỗ}$ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Nuôi cấy các tế bào trong điều kiện CO_2 5% ở nhiệt độ 37°C trong 6 ngày. Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng được bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (PerkinElmer). Trị số IC_{50} được tính theo công thức sau:

$$IC_{50} \text{ (nM)} = \text{đổi logarit } ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10b} - \text{LOG}_{10a}) / (d - c) + \text{LOG}_{10b})$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mối liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm (n = 2)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm (n = 5)

Thế liên hợp kháng thể-thuốc (25) có hoạt tính gây độc tế bào là $IC_{50} < 0,1$ (nM) kháng các tế bào NOMO-1. Các thế liên hợp kháng thể-thuốc (24) và (67) có hoạt tính gây độc tế bào là $1 < IC_{50} < 100$ (nM) kháng các tế bào. Kháng thể kháng CD33 không có hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào NOMO-1 (> 100 (nM)).

Ví dụ thử nghiệm 8: Thử nghiệm độ gây độc tế bào (6) của thế liên hợp kháng thể-thuốc

Nuôi cấy các tế bào U251 của các tế bào dương tính với kháng nguyên (ATCC) hoặc các tế bào MCF-7 của các tế bào âm tính với kháng nguyên (ATCC) trong RPMI1640 (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Các tế bào U251 hoặc các tế bào MCF-7 được chuẩn bị để có nồng độ là $2,8 \times 10^4$ tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường, bổ sung ở nồng độ 90µL/lỗ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào, và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày tiếp theo, bổ sung mỗi trong số kháng thể kháng CD70 và các thế liên hợp kháng thể-thuốc (10) và (11) mà đã được pha loãng đến 1000nM, 200nM, 40nM, 8nM, 1,6nM, 0,32nM, và 0,064nM bằng cách sử dụng môi trường ở nồng độ 10µL/lỗ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung môi trường ở nồng độ 10µL/lỗ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Nuôi cấy các tế bào trong điều kiện CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong 6 ngày. Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (PerkinElmer). Trị số IC_{50} được tính theo công thức sau:

$$IC_{50} \text{ (nM)} = \text{đổi logarit } ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10b} - \text{LOG}_{10a}) / (d - c) + \text{LOG}_{10b})$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mối liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm (n = 2)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm (n = 12)

Các thể liên hợp kháng thể-thuốc (10) và (11) có hoạt tính gây độc tế bào là $IC_{50} < 1$ (nM) kháng các tế bào U251. Mặt khác, các thể liên hợp kháng thể-thuốc (10) và (11) không có hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào MCF-7 (≥ 90 (nM)). Kháng thể kháng CD70 không có hoạt tính gây độc tế bào kháng cả hai tế bào này (> 100 (nM)).

Ví dụ thử nghiệm 9: Thử nghiệm độ gây độc tế bào (7) của thể liên hợp kháng thể-thuốc

Nuôi cấy các tế bào U251 của các tế bào dương tính với kháng nguyên (ATCC) trong RPMI1640 (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Các tế bào U251 được chuẩn bị để có nồng độ là $2,8 \times 10^4$ tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường và bổ sung ở nồng độ 90 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào. Sau hai giờ, bổ sung mỗi trong số kháng thể kháng CD70 và các thể liên hợp kháng thể-thuốc (26), (27), (40), (68), và (69) mà đã được pha loãng đến 1000nM, 200nM, 40nM, 8nM, 1,6nM, 0,32nM, và 0,064nM bằng cách sử dụng môi trường ở nồng độ 10 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung môi trường ở nồng độ 10 μ L/lỗ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Nuôi cấy các tế bào trong điều kiện CO_2 5% ở nhiệt độ 37°C trong 6 ngày. Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và được khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ

trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa (PerkinElmer). Trị số IC_{50} được tính theo công thức sau:

$$IC_{50} \text{ (nM)} = \text{đôi logarit } ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mỗi liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào ở mỗi nồng độ được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm ($n = 2$)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm ($n = 12$)

Các thể liên hợp kháng thể-thuốc (26), (27), (40), và (69) có hoạt tính gây độc tế bào là $1 < IC_{50} < 10$ (nM) kháng các tế bào U251. Thể liên hợp kháng thể-thuốc (68) có hoạt tính gây độc tế bào là $10 < IC_{50} < 100$ (nM) kháng các tế bào. Kháng thể kháng CD70 không có hoạt tính gây độc tế bào kháng các tế bào U251 (> 100 (nM)).

Ví dụ thử nghiệm 10: Thử nghiệm độ gây độc tế bào (8) của thuốc được giải phóng

Nuôi cấy các tế bào A375 (ATCC) trong DMEM (GIBCO) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (MOREGATE) (dưới đây, được gọi là môi trường). Các tế bào A375 được chuẩn bị để có nồng độ là 4×10^4 tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường, được bổ sung ở nồng độ 25 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ 96 lỗ dùng để nuôi cấy tế bào (CORNING) đã được nạp môi trường 65 μ L/lỗ, và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày tiếp theo, bổ sung mỗi chất thử nghiệm mà đã được pha loãng đến 1000nM, 200nM, 40nM, 8nM, 1,6nM, 0,32nM, và 0,064nM bằng cách sử dụng DMSO ở nồng độ 0,5 μ L/lỗ vào đĩa siêu nhỏ. Bổ sung DMSO ở nồng độ 0,5 μ L/lỗ vào lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm. Thể tích của môi trường trong mỗi lỗ được điều chỉnh đến 100 μ L bằng cách bổ sung môi

trường 10 μ L/lỗ, và nuôi cấy các tế bào trong 6 ngày trong điều kiện CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C. Sau khi nuôi cấy, lấy đĩa siêu nhỏ ra khỏi buồng ủ và giữ nguyên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng bằng nhau thu được từ thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy. Sau khi giữ nguyên đĩa siêu nhỏ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, đo lượng phát sáng bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa. Trị số IC₅₀ được tính theo công thức sau:

$$IC_{50} \text{ (nM)} = \text{đối logarit} ((50 - d) \times (\text{LOG}_{10}b - \text{LOG}_{10}a) / (d - c) + \text{LOG}_{10}b)$$

a: Nồng độ a của chất thử nghiệm

b: Nồng độ b của chất thử nghiệm

c: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ a

d: Tỷ lệ các tế bào sống được bổ sung chất thử nghiệm có nồng độ b

Các nồng độ a và b thiết lập mối liên hệ $a > b$ vượt quá 50% tỷ lệ tế bào sống.

Tỷ lệ sống của các tế bào được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống của các tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Lượng phát sáng trung bình từ các lỗ được bổ sung chất thử nghiệm (n = 2)

b: Lượng phát sáng trung bình từ lỗ không được bổ sung chất thử nghiệm (n = 10)

Hợp chất của Ví dụ (75) và exatecan có hoạt tính gây độc tế bào là $0,1 < IC_{50} < 1$ (nM) kháng các tế bào A375. Hợp chất của Ví dụ (42) có hoạt tính gây độc tế bào $1 < IC_{50} < 10$ (nM) kháng các tế bào này. Hợp chất của Ví dụ (1) có hoạt tính gây độc tế bào $10 < IC_{50} < 100$ (nM) kháng các tế bào này.

Ví dụ thử nghiệm 11: Thử nghiệm kháng khối u (1)

Chuột nhắt: chuột nhắt cái không lông BALB/c 5 đến 6 tuần tuổi (Charles River Laboratories Japan, Inc.) được cho thích nghi với môi trường trong từ 4 đến 7 ngày trong các điều kiện SPF trước khi sử dụng trong thử nghiệm. Cho các con chuột nhắt này ăn thức ăn dạng rắn được khử trùng (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) và uống

nước máy được khử trùng (được điều chế bằng cách bổ sung từ 5 đến 15 phần triệu (ppm) dung dịch natri hypoclorit).

Thử nghiệm và biểu thức tính: trong tất cả các nghiên cứu, đo trực lớn và trực nhỏ của khối u hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước kẹp điện tử số (CD-15C, Mitutoyo Corp.), và tính thể tích khối u (mm^3). Biểu thức tính là như được thể hiện dưới đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Trực lớn (mm)} \times [\text{Trực nhỏ (mm)}]^2$$

Pha loãng tất cả các thể liên hợp kháng thể-thuốc với nước muối sinh lý (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) và dùng qua tĩnh mạch ở thể tích là 10mL/kg vào đuôi của mỗi con chuột nhắt. Các tế bào A375 dòng u hắc sắc tố của người được mua của ATCC (Thư viện giống chuẩn Hoa Kỳ). Ghép dưới da 8×10^6 tế bào đã tạo huyền phù trong nước muối sinh lý vào bụng phải của mỗi con chuột nhắt cái không lông này (Ngày 0), và tạo nhóm chuột nhắt một cách ngẫu nhiên vào ngày 11. Kháng thể M30-H1-L4P và thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được cho dùng qua tĩnh mạch với liều là 10mg/kg vào đuôi mỗi con chuột nhắt vào các ngày 11, 18, và 25.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.17. Trên hình vẽ này, đường có các hình thoi rộng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tam giác rộng mô tả tác dụng của kháng thể M30-H1-L4P, và đường có các hình tròn rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2).

Như thấy được dựa trên các kết quả này, việc dùng thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) làm giảm đáng kể thể tích khối u, và không quan sát thấy sự phát triển thêm của khối u sau khi dùng lần cuối cùng. Trái lại, việc dùng kháng thể M30-H1-L4P lại dẫn đến việc làm tiến triển sự phát triển khối u.

Ngoài ra, chuột nhắt mà nhận thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) không có các dấu hiệu đáng lưu ý như sút cân, đề xuất rằng thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) này ít độc và có độ an toàn cao.

Ví dụ thử nghiệm 12: Thử nghiệm kháng khối u (2)

Các tế bào A375 dòng u hắc sắc tố của người được mua của ATCC (Thư viện giống chuẩn Hoa Kỳ). Ghép dưới da 6×10^6 tế bào đã tạo huyền phù trong nước muối

sinh lý vào bụng phải của mỗi con chuột nhất cái không lông (Ngày 0), và tạo nhóm chuột nhất một cách ngẫu nhiên vào ngày 18. Dùng thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) qua tĩnh mạch với mỗi liều (0,1, 0,3, và 1,3 mg/kg) vào đuôi của mỗi con chuột nhất vào các ngày 18, 25, và 32 trong lịch trình $qw \times 3$.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.18. Trên hình vẽ này, đường có các hình thoi rỗng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình vuông đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 0,1mg/kg, đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 0,3mg/kg, đường có các tam giác đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 1mg/kg, và đường có các hình tròn rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) được dùng ở liều lượng 3mg/kg. Thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) hữu hiệu trong việc làm teo khối u theo cách phụ thuộc vào liều.

Ví dụ thử nghiệm 13: Thử nghiệm kháng khối u (3)

Các tế bào Calu-6 dòng ung thư phổi tế bào không nhỏ của người được mua của ATCC (Thư viện giống chuẩn Hoa Kỳ). Ghép dưới da 5×10^6 tế bào đã tạo huyền phù trong nước muối sinh lý vào bụng phải của mỗi con chuột nhất cái không lông (Ngày 0), và tạo nhóm chuột nhất một cách ngẫu nhiên vào ngày 11. Dùng mỗi trong số kháng thể M30-H1-L4P và thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) qua tĩnh mạch với liều là 10mg/kg vào đuôi của mỗi chuột nhất vào các ngày 11, 18, và 25 trong lịch trình $qw \times 3$.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.19. Trên hình vẽ này, đường có các hình thoi rỗng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tam giác rỗng mô tả tác dụng của kháng thể M30-H1-L4P, và đường có các hình tròn rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (2). Việc dùng thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) làm giảm đáng kể thể tích khối u, và không quan sát thấy sự phát triển thêm của khối u sau liều dùng cuối cùng. Trái lại, việc dùng kháng thể M30-H1-L4P lại dẫn đến việc làm tiến triển sự phát triển khối u.

Ngoài ra, chuột nhắt mà nhận thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) không có các dấu hiệu đáng lưu ý như sút cân, đề xuất rằng thể liên hợp kháng thể-thuốc (2) này ít độc và có độ an toàn cao.

Ví dụ thử nghiệm 14: Thử nghiệm kháng khối u (4)

Các tế bào A375 dòng u hắc sắc tố của người được mua của ATCC (Thư viện giống chuẩn Hoa Kỳ). Ghép dưới da 8×10^6 tế bào đã tạo huyền phù trong nước muối sinh lý vào bụng phải của mỗi con chuột nhắt cái không lông (Ngày 0), và tạo nhóm chuột nhắt một cách ngẫu nhiên vào ngày 21. Dùng mỗi trong số thể liên hợp kháng thể-thuốc (1), (13), (41), và (55) qua tĩnh mạch với liều là 10mg/kg vào đuôi của mỗi chuột nhắt vào ngày 21.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.20. Trên hình vẽ này, đường có các hình thoi rộng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tròn rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (1) được dùng, đường có các hình tam giác rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (13) được dùng, đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (41) được dùng, và đường có các hình vuông rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (55) được dùng. Việc dùng các thể liên hợp kháng thể-thuốc (1), (13), (41), hoặc (55) làm giảm đáng kể thể tích khối u, và tất cả các thể liên hợp kháng thể-thuốc này tạo ra tác dụng ức chế sự phát triển khối u.

Ngoài ra, chuột nhắt mà nhận các thể liên hợp kháng thể-thuốc (1), (13), (41), hoặc (55) không có các dấu hiệu đáng lưu ý như sút cân, đề xuất rằng các thể liên hợp kháng thể-thuốc (1), (13), (41), và (55) này ít độc và có độ an toàn cao.

Ví dụ thử nghiệm 15: Thử nghiệm kháng khối u (5)

Các tế bào Calu-6 dòng ung thư phổi tế bào không nhỏ của người được mua của ATCC (Thư viện giống chuẩn Hoa Kỳ). Ghép dưới da 5×10^6 tế bào đã tạo huyền phù trong nước muối sinh lý vào bụng phải của mỗi con chuột nhắt cái không lông (Ngày 0), và tạo nhóm chuột nhắt một cách ngẫu nhiên vào ngày 12. Dùng mỗi trong số các thể liên hợp kháng thể-thuốc (13), (41), và (55) qua tĩnh mạch với liều là 10mg/kg vào đuôi của mỗi chuột nhắt vào ngày 12. Để làm đối chứng so sánh, DE-310 được cho

dùng qua tĩnh mạch với liều là 0,1mg/kg vào đuôi của mỗi con chuột nhắt vào ngày 12. Ở đây, liều nêu trên của thể liên hợp kháng thể-thuốc là dựa trên cơ sở lượng kháng thể trong thể liên hợp và liều nêu trên của DE-310 là dựa trên cơ sở lượng thuốc được chứa trong đó. Theo khía cạnh này, các lượng thuốc lần lượt được chứa trong thể liên hợp kháng thể-thuốc và DE-310 là khoảng 1 : 100. Điều này nghĩa là liều lượng của thể liên hợp kháng thể-thuốc và DE-310 là bằng nhau xét về lượng thuốc được chứa trong đó.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.21. Trên hình vẽ này, đường có các hình thoi rộng mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình tròn rộng mô tả tác dụng của DE-310, đường có các hình tam giác rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (13), đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (41), và đường có các hình vuông rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (55). Việc dùng các thể liên hợp kháng thể-thuốc (13), (41), hoặc (55) làm giảm đáng kể thể tích khối u, trong khi đó việc dùng DE-310 không thể hiện sự giảm về thể tích khối u.

Ngoài ra, chuột nhắt mà nhận các thể liên hợp kháng thể-thuốc (13), (41), hoặc (55) không có các dấu hiệu đáng lưu ý như sút cân, đề xuất rằng các thể liên hợp kháng thể-thuốc này ít độc và có độ an toàn cao.

Ví dụ thử nghiệm 16: Thử nghiệm kháng khối u (6)

Các tế bào A375 dòng u hắc sắc tố của người được mua của ATCC (Thư viện giống chuẩn Hoa Kỳ). Ghép dưới da 1×10^7 tế bào đã tạo huyền phù trong nước muối sinh lý vào bụng phải của mỗi con chuột nhắt cái không lông (Ngày 0), và tạo nhóm chuột nhắt một cách ngẫu nhiên vào ngày 11. Dùng mỗi trong số các thể liên hợp kháng thể-thuốc (17), (18), (19), (59), (60), và (61) qua tĩnh mạch với liều là 3mg/kg vào đuôi của mỗi chuột nhắt vào các ngày 11 và 18 trong lịch trình qw $\times$ 2.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.22. Trên hình vẽ này, đường có các hình thoi đặc mô tả các kết quả về khối u không được điều trị, đường có các hình vuông đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (17) được dùng, đường có các hình tam giác rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (18) được dùng, đường có các hình tròn rộng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (19) được dùng, đường có các tam giác đặc mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (59) được

dùng, đường có các hình vuông rỗng mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (60) được dùng, và đường có các dấu X mô tả tác dụng của thể liên hợp kháng thể-thuốc (61) được dùng.

Việc dùng các thể liên hợp kháng thể-thuốc (17), (18), (19), (59), (60), hoặc (61) làm giảm đáng kể thể tích khối u, và tất cả các thể liên hợp kháng thể-thuốc này tạo ra tác dụng ức chế sự phát triển khối u.

Ngoài ra, chuột nhắt nhận các thể liên hợp kháng thể-thuốc (17), (18), (19), (59), (60), hoặc (61) không có các dấu hiệu đáng lưu ý như sút cân, đề xuất rằng các thể liên hợp kháng thể-thuốc này ít độc và có độ an toàn cao.

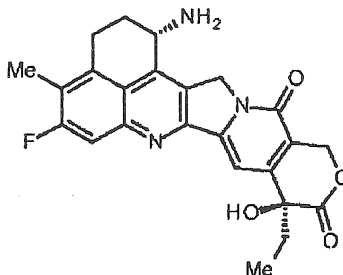
Danh mục trình tự

- SEQ ID NO: 1 - Trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3
- SEQ ID NO: 2 - Trình tự axit amin của biến thể 2 của B7-H3
- SEQ ID NO: 3 - Trình tự axit amin của CDRH1 của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 4 - Trình tự axit amin của CDRH2 của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 5 - Trình tự axit amin của CDRH3 của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 6 - Trình tự axit amin của CDRL1 của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 7 - Trình tự axit amin của CDRL2 của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 8 - Trình tự axit amin của CDRL3 của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 9 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H1
- SEQ ID NO: 10 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H2
- SEQ ID NO: 11 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H3
- SEQ ID NO: 12 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H4
- SEQ ID NO: 13 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L1
- SEQ ID NO: 14 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L2
- SEQ ID NO: 15 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L3
- SEQ ID NO: 16 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L4

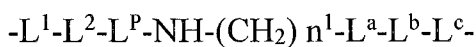
- SEQ ID NO: 17 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L5
- SEQ ID NO: 18 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L6
- SEQ ID NO: 19 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L7
- SEQ ID NO: 20 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 21 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể M30
- SEQ ID NO: 22 - Mồi PCR 1
- SEQ ID NO: 23 - Mồi PCR 2
- SEQ ID NO: 24 - Mồi trợ xúc tác CMV: mồi 3
- SEQ ID NO: 25 - Mồi nghịch BGH: mồi 4
- SEQ ID NO: 26 - Trình tự nucleotit củabiến thể 1 của B7-H3
- SEQ ID NO: 27 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng CD30
- SEQ ID NO: 28 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD30
- SEQ ID NO: 29 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng CD33
- SEQ ID NO: 30 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD33
- SEQ ID NO: 31 - Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể kháng CD70
- SEQ ID NO: 32 - Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD70

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể liên hợp kháng thể-thuốc, trong đó hợp chất kháng khối u có công thức sau:



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



trong đó kháng thể này được nối với đầu tận của L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với đầu tận của L^c bằng nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 làm vị trí nối,

trong đó:

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^1 là $-(\text{sucxinimit-3-yl-N})-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$, $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_{n^3}-C(=O)-$, $-C(=O)-\text{cyc.Hex}(1,4)-CH_2-(N\text{-ly-3-diminiccuS})-$, hoặc $-C(=O)-(CH_2)_{n^4}-C(=O)-$,

trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8, n^3 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, n^4 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8,

L^2 là $-NH-(CH_2-CH_2-O)_{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$, $-S-(CH_2)_{n^6}-C(=O)-$, hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, n^6 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là gốc tetrapeptit của GGFG,

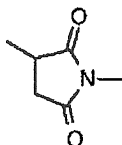
L^a là $-O-$ hoặc liên kết đơn,

L^b là $-CR^2(-R^3)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R^2 và R^3 độc lập là nguyên tử hydro,

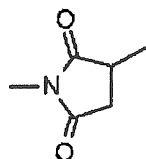
L^c là $-C(=O)-$,

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



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

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



mà được nối với L^2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc chất liên kết chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

cyc.Hex(1,4) là nhóm 1,4-xyclohexylen, và

nếu L^2 là $-S-(CH_2)_n-C(=O)-$, thì L^1 là $-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$.

2. Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 1, trong đó cấu trúc của chất liên kết là một cấu trúc được chọn từ nhóm sau:

-(succinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$;

-(succinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$;

-(succinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$;

-(succinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$;

-(succinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$;

-(succinimit-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$;

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

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

-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX);

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

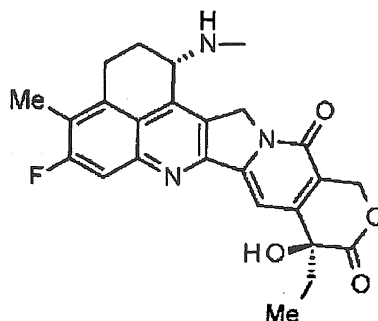
-(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX);

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX);

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX);

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX);

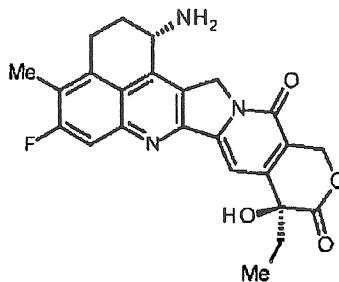
trong đó -(NH-DX) là nhóm có công thức sau:



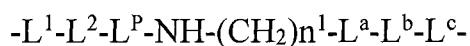
trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí nối, và

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

3. Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 1, trong đó hợp chất kháng khối u có công thức sau đây:



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



trong đó kháng thể được nối với đầu tận của L^1 , hợp chất kháng khối u được nối với đầu tận của L^c với nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí nối,

trong đó:

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L^1 là $-(\text{succinimide-3-yl-N})-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$,

trong đó n^2 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5,

L^2 là $-NH-(CH_2-CH_2-O)_{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên 2 hoặc 4,

L^P là gốc tetrapeptit của GGFG,

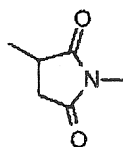
L^a là $-O-$ hoặc liên kết đơn,

L^b là $-CR^2(-R^3)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R^2 và R^3 là nguyên tử hydro,

L^c là $-C(=O)-$, và

$-(\text{succinimide-3-yl-N})-$ có cấu trúc được thể hiện bằng công thức sau:



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

4. Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 3, trong đó $\text{-NH-(CH}_2\text{)}^n\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-L}^c\text{-}$ là:

$\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(=O)-}$,

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

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

5. Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 4, trong đó $\text{-NH-(CH}_2\text{)}^n\text{-L}^a\text{-L}^b\text{-L}^c\text{-}$ là $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$.

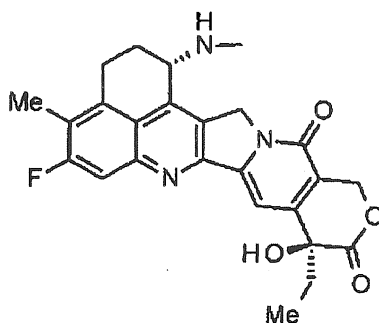
6. Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5, trong đó cấu trúc của chất liên kết là một cấu trúc được chọn từ nhóm sau:

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

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

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

trong đó -(NH-DX) là nhóm có công thức sau:



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

7. Thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 6, trong đó cấu trúc của chất liên kết là:

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

8. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

9. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó số lượng đơn vị trung bình của một cấu trúc chất liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp trong mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

10. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó tế bào được hướng đích bằng thẻ liên hợp kháng thể-thuốc này là tế bào khối u.

11. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể là kháng thể kháng A33, kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CanAg, kháng thể kháng CD20, kháng thể kháng CD22, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, kháng thể kháng CD56, kháng thể kháng CD70, kháng thể kháng CEA, kháng thể kháng Cripto, kháng thể kháng EphA2, kháng thể kháng G250, kháng thể kháng MUC1, kháng thể kháng GPNMB, kháng thể kháng integrin, kháng thể kháng PSMA, kháng thể kháng tenascin-C, kháng thể kháng SLC44A4, hoặc kháng thể kháng mesothelin.

12. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể là kháng thể kháng B7-H3, kháng thể kháng CD30, kháng thể kháng CD33, hoặc kháng thể kháng CD70.

13. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này là kháng thể kháng B7-H3.

14. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 13, trong đó kháng thể kháng B7-H3 có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5 là các vùng quyết định bổ thể chuỗi nặng, và CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 là các vùng quyết định bổ thể chuỗi nhẹ.

15. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 13, trong đó kháng thể kháng B7-H3 có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 13,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 14,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 15,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 16,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 17,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 18,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 19,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 13,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm

trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 14,

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 15, và

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 141 trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 128 trong SEQ ID NO: 16.

16. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 13, trong đó kháng thể kháng B7-H3 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm:

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 13,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 14,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 15,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 16,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 17,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 18,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 19,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 13,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 14,

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 15, và

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 16.

17. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 13, trong đó kháng thể kháng B7-H3 bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 20 đến 471 trong SEQ ID NO: 9 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong các vị trí axit amin từ 21 đến 233 trong SEQ ID NO: 16.

18. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 16, trong đó kháng thể kháng B7-H3 thiếu axit amin ở đầu tận carboxyl của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 12 trong chuỗi nặng.

19. Thẻ liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm 17, trong đó kháng thể kháng B7-H3 thiếu axit amin ở đầu tận carboxyl của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 trong chuỗi nặng.

20. Thuốc chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc từ 14 đến 19, hoặc muối của chúng.

21. Thuốc kháng khối u và/hoặc chống ung thư chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc từ 14 đến 19 hoặc muối của chúng.

22. Dược phẩm chứa thể liên hợp kháng thể-thuốc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc từ 14 đến 19 hoặc muối của chúng làm thành phần hoạt tính, và thành phần bào chế được dụng.

23. Hợp chất trung gian chất liên kết-thuốc có công thức sau:



trong đó Q là (maleimide-N-yl)-,

n^Q là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8,

L^{2a} là $-NH-(CH_2-CH_2-O)_{n^5}-CH_2-CH_2-C(=O)-$ hoặc liên kết đơn,

trong đó n^5 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là gốc tetrapeptit của GGFG,

n^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

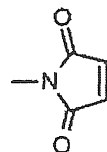
L^a là $-O-$ hoặc liên kết đơn,

L^b là $-CR^2(-R^3)-$ hoặc liên kết đơn,

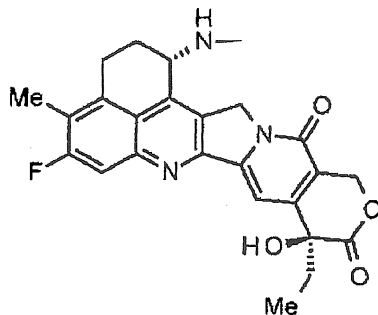
trong đó mỗi R^2 và R^3 độc lập là nguyên tử hydro,

L^c là $-C(=O)-$,

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



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và $-(NH-DX)$ là nhóm có công thức sau:



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

24. Hợp chất trung gian chất liên kết-thuốc theo điểm 23, trong đó:

n^5 là số nguyên bằng 2 hoặc 4,

-NH-(CH₂)_{n¹-L^a-L^b- là:}

-NH-CH₂CH₂CH₂-,

-NH-CH₂-O-CH₂-, hoặc

-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-.

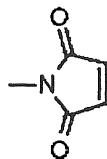
25. Hợp chất có công thức dưới đây:

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-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

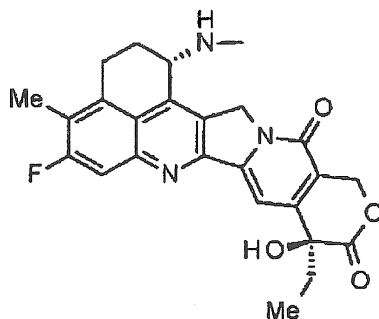
(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),

trong đó (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức sau:



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và

-(NH-DX) là nhóm có công thức sau:

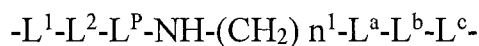


trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí nối.

26. Hợp chất theo điểm 25 là:

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

27. Chất liên kết có công thức sau:



để thu được thể liên hợp kháng thể-thuốc, trong đó thuốc được liên hợp với kháng thể thông qua chất liên kết,

trong đó L¹ là vị trí nối đôi với kháng thể, L^c là vị trí nối đôi với hợp chất kháng khối u,

trong đó:

n¹ là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6,

L¹ là -(succinimit-3-yl-N)-(CH₂)_{n²}-C(=O)-,

trong đó n² là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8,

L² là -NH-(CH₂-CH₂-O)_{n⁵}-CH₂-CH₂-C(=O)- hoặc liên kết đơn,

trong đó n⁵ là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6,

L^P là gốc tetrapeptit của GGFG,

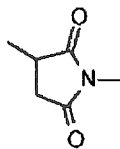
L^a là -O- hoặc liên kết đơn,

L^b là -CR²(-R³)-, hoặc liên kết đơn,

trong đó mỗi R² và R³ độc lập là nguyên tử hydro,

L^c là -C(=O)-,

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



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

28. Chất liên kết theo điểm 27, được chọn từ nhóm sau, với điều kiện là đầu tận bên trái là vị trí nối với kháng thể và đầu tận bên phải là vị trí nối với hợp chất chống khối u:

-(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)-.

29. Chất liên kết theo điểm 28, với điều kiện là đầu tận bên trái là vị trí nối với kháng thể và đầu tận bên phải là vị trí nối với hợp chất kháng khối u, là: -(succinimit-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-.

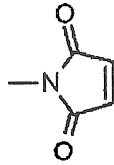
30. Phương pháp tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc, trong đó kháng thể này được xử lý trong điều kiện khử và sau đó được cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm dưới đây:

(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NHCH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

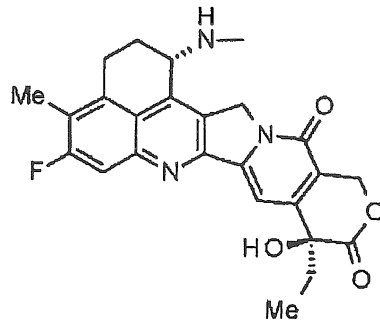
(maleimit-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX), hoặc

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

trong công thức nêu trên, (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức sau đây:



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí nối, và $-(NH-DX)$ là nhóm có công thức sau đây:



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

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó kháng thể được xử lý trong điều kiện khử và sau đó được cho phản ứng với hợp chất dưới đây:

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

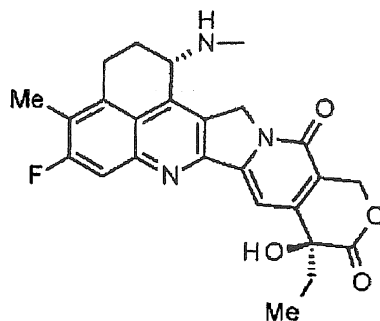
32. Hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

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

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

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

trong đó $-(\text{NH-DX})$ là nhóm được thể hiện bởi công thức sau:



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

33. Hợp chất theo điểm 32, là $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$.

Fig. 1

Trình tự axit amin của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ IDNO: 1)

```
MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNTTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFP
DLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLT
GNTTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH
GSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQS
CEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA
```

Fig. 2

Trình tự axit amin của biến thể 2 của B7-H3 (SEQ ID NO: 2)

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITC SSYRGYPEAEVFWQD
GQGVPLTG NVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIAL LVALAFVC
WRKIKQSCEEENAGAEDQDGE GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQE I
A

Fig. 3

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H1 (SEQ ID NO: 9)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
 ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGGGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESGGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 4

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H2 (SEQ ID NO: 10)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
 ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYGSPLYYFDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESGGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 5

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H3 (SEQ ID NO: 11)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATIT
 ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGGGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESGGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 6

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ M30-H4 (SEQ ID NO: 12)

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
 YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
 SDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESGGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 7

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L1 (SEQ ID NO: 13)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDESTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 8

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L2 (SEQ ID NO: 14)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDESTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 9

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L3 (SEQ ID NO: 15)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 10

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L4 (SEQ ID NO: 16)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 11

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L5 (SEQ ID NO: 17)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKPKWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 12

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L6 (SEQ ID NO: 18)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 13

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ M30-L7 (SEQ ID NO: 19)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Fig. 14

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể M30 (SEQ ID NO: 20)

```
MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG
YTFTNYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVT LGCLVKGYFPEPVTL
TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV
AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPK
IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQT
HREDYNSTLRVVSALPIQH QDWM S GKEFKCKVNNKDLPAPIERTI
SKPKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLT CMVTD FMPEDIYVEW
TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
```

Fig. 15

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể M30 (SEQ ID NO: 21)

MDFLVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTC
RASSRLIYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGT
SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDINVKWKIDGSERQNGV
LNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSP
IVKSFNRNEC

Fig. 16

Trình tự nucleotit của biến thể 1 của B7-H3 (SEQ ID NO: 26)

```

a t g c t g c g t c g g c g g g g c a g c c c t g g c a t g g g t g t g c a t g t g g g t
g c a g c c c t g g g a g c a c t g t g g t t c t g c c t c a c a g g a g c c c t g g a g
g t c c a g g t c c c t g a a g a c c c a g t g g t g g c a c t g g t g g g c a c c g a t
g c c a c c c t g t g c t g c t c c t t c t c c c c t g a g c c t g g c t t c a g c c t g
g c a c a g c t c a a c c t c a t c t g g c a g c t g a c a g a t a c c a a a c a g c t g
g t g c a c a g c t t t g c t g a g g g c c a g g a c c a g g g c a g c g c c t a t g c c
a a c c g c a c g g c c c t c t t c c c g g a c c t g c t g g c a c a g g g c a a c g c a
t c c c t g a g g c t g c a g c g c g t g c g t g t g g c g g a c g a g g g c a g c t t c
a c c t g c t t c g t g a g c a t c c g g g a t t t c g g c a g c g c t g c c g t c a g c
c t g c a g g t g g c c g c t c c c t a c t c g a a g c c c a g c a t g a c c c t g g a g
c c c a a c a a g g a c c t g c g g c c a g g g g a c a c g g t g a c c a t c a c g t g c
t c c a g c t a c c a g g g c t a c c c t g a g g c t g a g g t g t t c t g g c a g g a t
g g g c a g g g t g t g c c c c t g a c t g g c a a c g t g a c c a c g t c g c a g a t g
g c c a a c g a g c a g g g c t t g t t t g a t g t g c a c a g c a t c c t g c g g g t g
g t g c t g g g t g c a a a t g g c a c c t a c a g c t g c c t g g t g c g c a a c c c c
g t g c t g c a g c a g g a t g c g c a c a g c t c t g t c a c c a t c a c a c c c c a g
a g a a g c c c c a c a g g a g c c g t g g a g g t c c a g g t c c c t g a g g a c c c g
g t g g t g g c c c t a g t g g g c a c c g a t g c c a c c c t g c g c t g c t c c t t c
t c c c c c g a g c c t g g c t t c a g c c t g g c a c a g c t c a a c c t c a t c t g g
c a g c t g a c a g a c a c c a a a c a g c t g g t g c a c a g t t t c a c c g a a g g c
c g g g a c c a g g g c a g c g c c t a t g c c a a c c g c a c g g c c c t c t t c c c g
g a c c t g c t g g c a c a a g g c a a t g c a t c c c t g a g g c t g c a g c g c g t g
c g t g t g g c g g a c g a g g g c a g c t t c a c c t g c t t c g t g a g c a t c c g g
g a t t t c g g c a g c g c t g c c g t c a g c c t g c a g g t g g c c g c t c c c t a c
t c g a a g c c c a g c a t g a c c c t g g a g c c c a a c a a g g a c c t g c g g c c a
g g g g a c a c g g t g a c c a t c a c g t g c t c c a g c t a c c g g g g c t a c c c t
g a g g c t g a g g t g t t c t g g c a g g a t g g g c a g g g t g t g c c c c t g a c t
g g c a a c g t g a c c a c g t c g c a g a t g g c c a a c g a g c a g g g c t t g t t t
g a t g t g c a c a g c g t c c t g c g g g t g g t g c t g g g t g c g a a t g g c a c c
t a c a g c t g c c t g g t g c g c a a c c c c g t g c t g c a g c a g g a t g c g c a c
g g c t c t g t c a c c a t c a c a g g g c a g c c t a t g a c a t t c c c c c c a g a g
g c c c t g t g g g t g a c c g t g g g g c t g t c t g t c t g t c t c a t t g c a c t g
c t g g t g g c c c t g g c t t t c g t g t g c t g g a g a a a g a t c a a a c a g a g c
t g t g a g g a g g a g a a t g c a g g a g c t g a g g a c c a g g a t g g g g a g g g a
g a a g g c t c c a a g a c a g c c c t g c a g c c t c t g a a a c a c t c t g a c a g c
a a a g a a g a t g a t g g a c a a g a a a t a g c c t g a g c g g c c g c c a c t g t g
c t g g a t a t c t g c a g a a t t c c a c c a c a c t g g a c t a g t g g a t c c g a g
c t c g g t a c c a a g c t t a a g t t t a a a c c g c t g a t c a g c c t c g a c t g t
t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a
a a a t g a g g a a a t t g c

```

Fig. 17

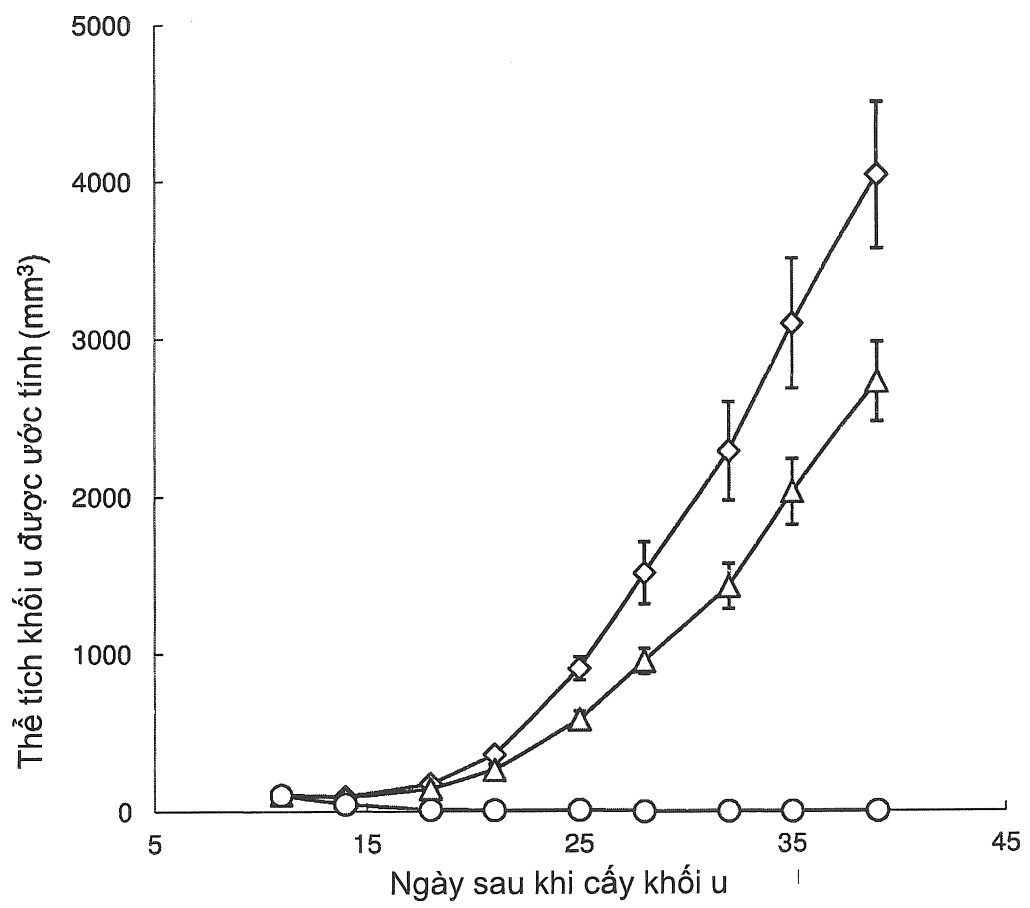


Fig. 18

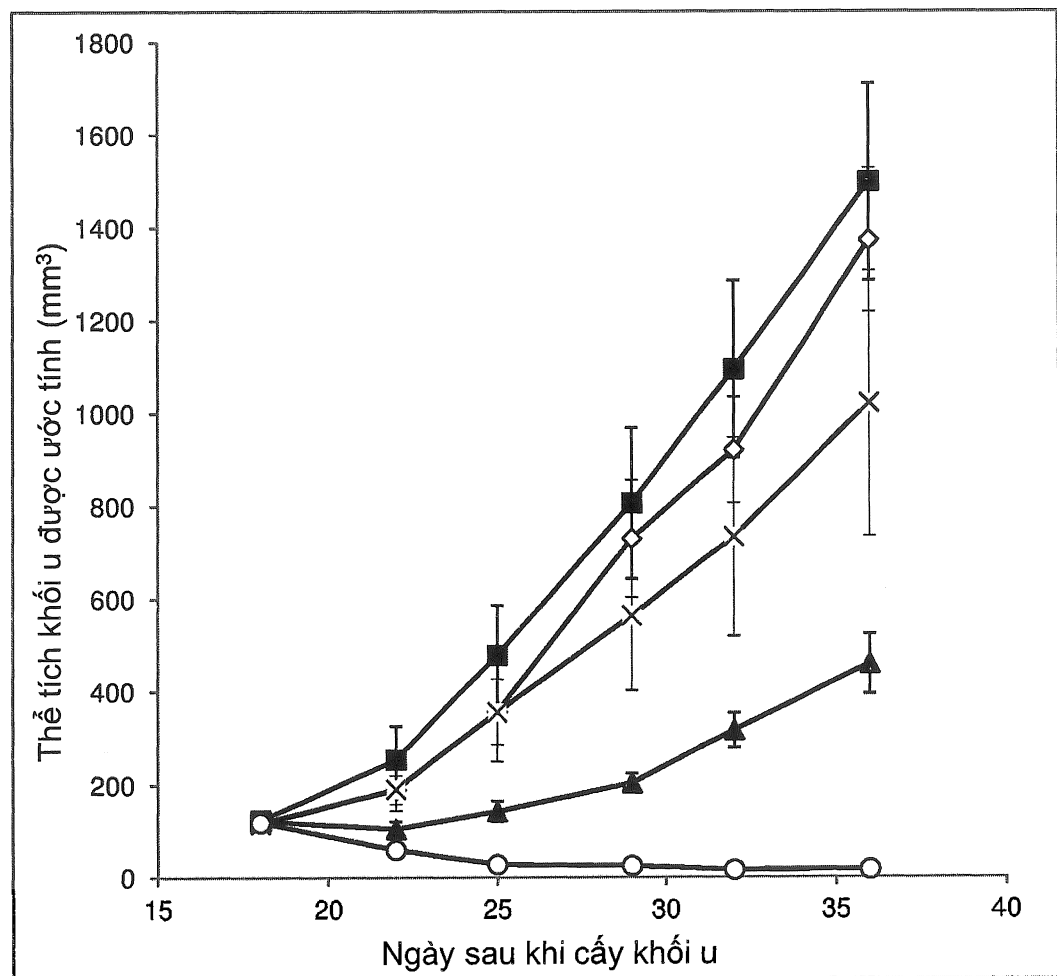


Fig. 19

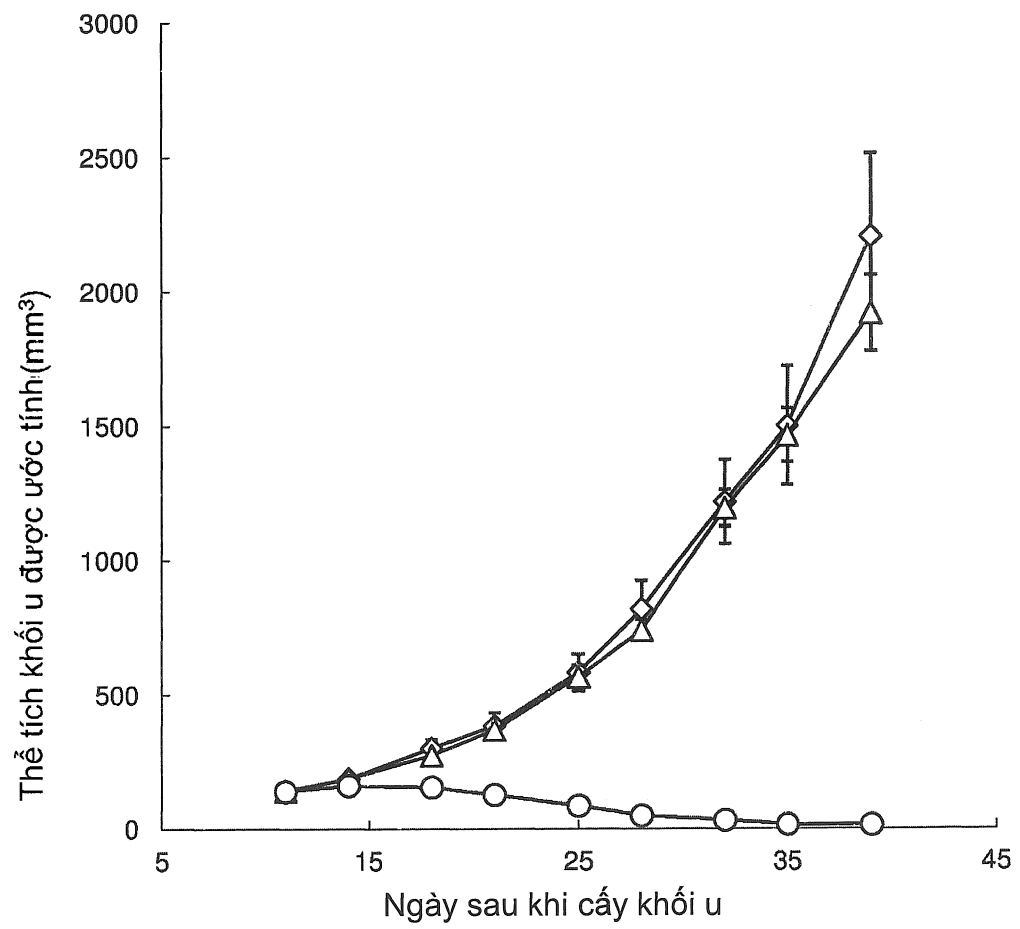


Fig. 20

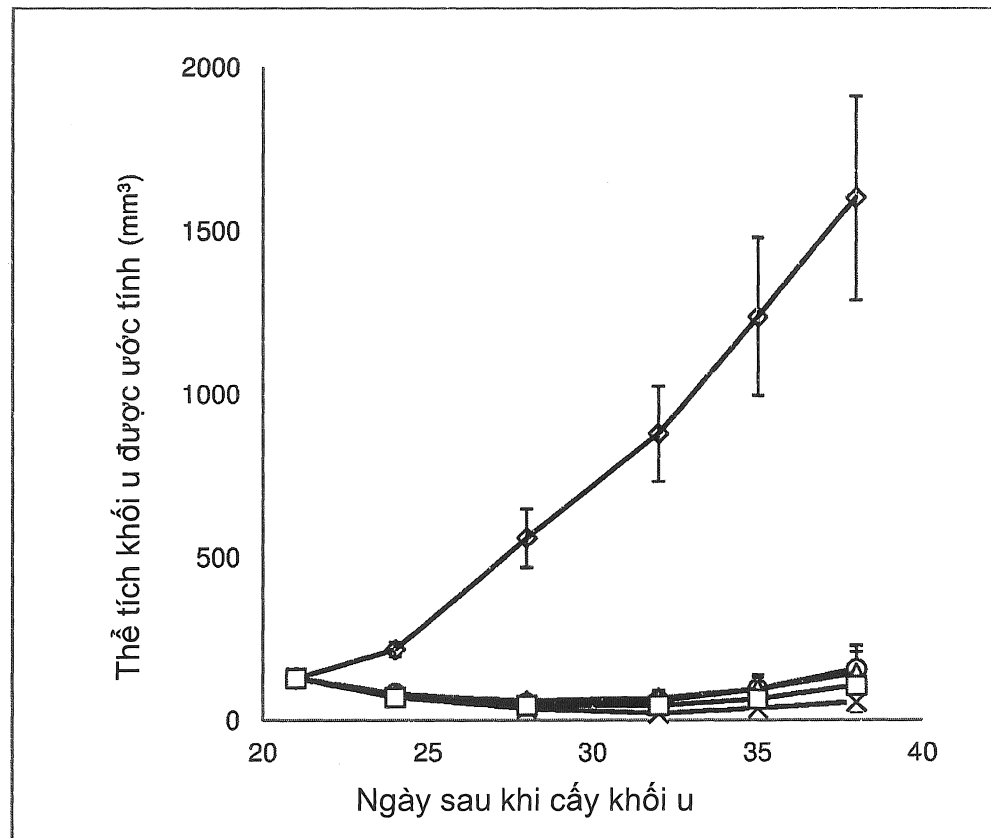


Fig. 21

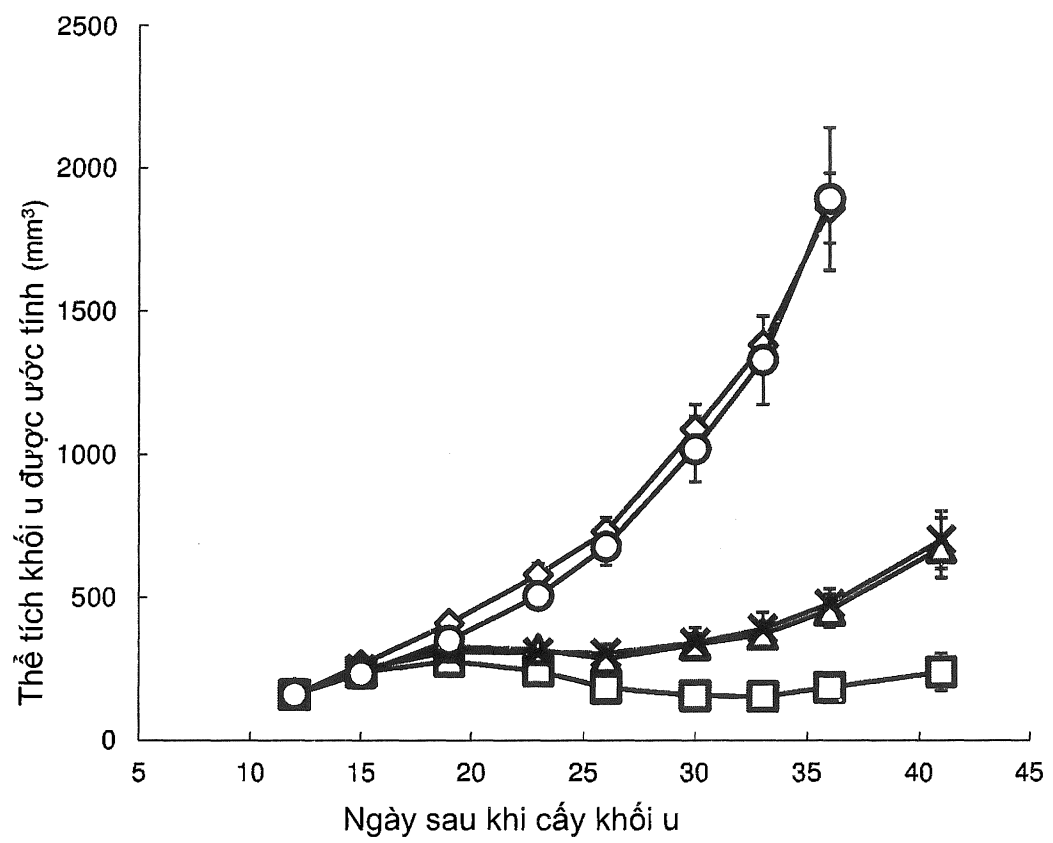
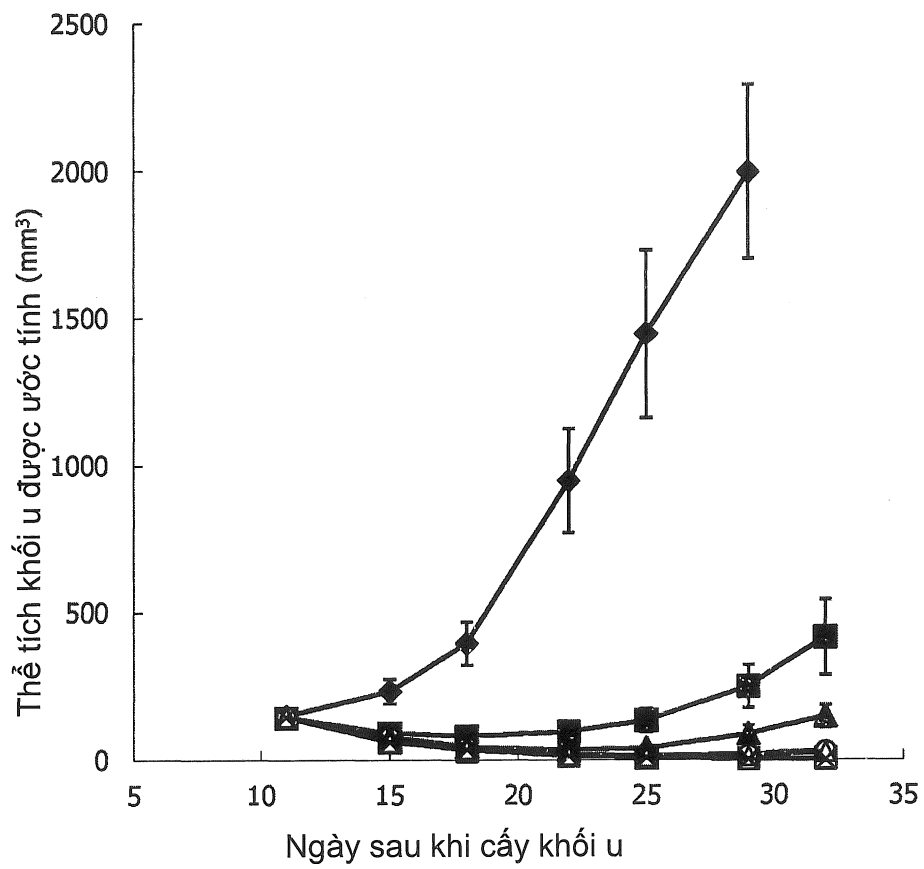


Fig. 22



Danh mục trình tự

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Thể liên hợp kháng thể-thuốc có tác dụng kháng khối u và dược phẩm chứa thể liên hợp này

<130> PD20-9003WO

<150> JP2012-225887

<151> 2012-10-11

<160> 32

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 534

<212> PRT

<213> Người

<400> 1

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr

Danh muc trinh tu

145		150		155		160
Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val	165			170		175
Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr	180		185		190	
Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu	195		200		205	
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn	210		215		220	
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln	225		230		235	240
Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val	245		250		255	
Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro	260		265		270	
Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr	275		280		285	
Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly	290		295		300	
Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln	305		310		315	320
Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly	325		330		335	
Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val	340		345		350	
Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu	355		360		365	
Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser	370		375		380	

Danh mục trình tu

Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
385 390 395 400

Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
405 410 415

Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
420 425 430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
435 440 445

Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
450 455 460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
465 470 475 480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
485 490 495

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
500 505 510

Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
515 520 525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala
530

<210> 2
<211> 316
<212> PRT
<213> Người

<400> 2

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Danh muc trinh tu

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
 195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
 210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
 225 230 235 240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
 245 250 255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
 260 265 270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
 275 280 285

Danh mục trình tự

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
 290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 305 310 315

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 3

Asn Tyr Val Met His
 1 5

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 4

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 5

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 6

Arg Ala Ser Ser Arg Leu Ile Tyr Met His
 1 5 10

<210> 7
 <211> 7

Danh mục trình tự

<212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà
 <400> 7

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 8

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng được nhân hóa của M30

<400> 9

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 Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe

Danh muc trinh tu

115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140		
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 145 150 155 160		
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175		
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190		
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 195 200 205		
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 210 215 220		
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 225 230 235 240		
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 245 250 255		
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 260 265 270		
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 275 280 285		
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 290 295 300		
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 305 310 315 320		
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 325 330 335		
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 340 345 350		

Danh mục trình tu

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 10
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng được nhân hóa của M30

<400> 10

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 Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn

Danh muc trinh tu																		
65						70						75						80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser			
				85					90					95				
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val			
			100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe			
		115					120					125						
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr			
	130					135					140							
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser			
145					150					155					160			
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu			
				165					170					175				
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His			
			180					185					190					
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser			
		195					200					205						
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys			
	210					215					220							
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu			
225					230				235						240			
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro			
				245					250					255				
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys			
			260					265					270					
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val			
		275					280					285						
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp			
	290					295					300							

Danh mục trình tự

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 11
<211> 471
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng được nhân hóa của M30

<400> 11

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

Danh muc trinh tu															
20					25					30					
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Asn	Tyr	Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
		50				55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Lys	Tyr	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
		210					215				220				
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
225					230					235					240
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	

Danh muc trinh tu

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 12
 <211> 471
 <212> PRT

Danh mục trình tự

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng được nhân hóa của M30

<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 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Danh muc trinh tu

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Danh mục trình tự

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 13
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được nhân hóa của M30

<400> 13

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Danh mục trình tu

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 14
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được nhân hóa của M30

<400> 14

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

Danh mục trình tu

115

120

125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 15
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được nhân hóa của M30

<400> 15

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Lys
 50 55 60

Leu Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Danh mục trình tu

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 16

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ được nhân hóa của M30

<400> 16

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Danh mục trình tự

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 17

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

Danh mục trình tu

<223> Chuỗi nhẹ được nhân hóa của M30

<400> 17

Met	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile	Ser
1				5					10					15	

Gly	Ala	Tyr	Gly	Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser
			20					25					30		

Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg
		35					40					45			

Leu	Ile	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Lys
	50					55					60				

Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg
65					70					75					80

Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg
				85					90					95	

Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Asn	Ser
			100					105					110		

Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
		115					120					125			

Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
	130					135					140				

Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
145					150					155					160

Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
				165					170					175	

Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
			180					185					190		

Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
		195					200					205			

Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
	210						215				220				

Danh mục trình tự

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 18
<211> 233
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ được nhân hóa của M30

<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 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Danh mục trình tu

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 19
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ được nhân hóa của M30

<400> 19

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
 35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser
 100 105 110

Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

Danh mục trình tu

130	135	140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		
145	150	155 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly		
	165	170 175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr		
	180	185 190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His		
	195	200 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
	210	215 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	
<210> 20		
<211> 471		
<212> PRT		
<213> Chuột nhắt nhà		
<400> 20		
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly		
1	5	10 15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys		
	20	25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
	35	40 45
Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu		
	50	55 60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn		
65	70	75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Gln Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser		
	85	90 95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		

Danh muc trinh tu															
100				105				110							
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Phe
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
	130					135					140				
Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr
145					150					155					160
Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170					175	
Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser
		195					200					205			
Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn
		210				215					220				
Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro
225					230					235					240
Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro
				245					250					255	
Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys
			260					265					270		
Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		275					280					285			
Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn
		290				295					300				
Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr
305					310					315					320
Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp
				325					330					335	

Danh mục trình tu

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
 355 360 365

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
 385 390 395 400

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
 405 410 415

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
 450 455 460

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 465 470

<210> 21
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 21

Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Ser Arg Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

Danh mục trình tự

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
165 170 175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
195 200 205

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
210 215 220

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 22

<211> 46

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi PCR

<400> 22

ctataggggag acccaagctg gctagcatgc tgcgtcggcg gggcag

46

<210> 23

<211> 66

<212> DNA

Danh mục trình tự

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 23

aacggggccct ctagactcga gcggccgctc aggctatttc ttgtccatca tcttctttgc 60

tgtcag 66

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 24

cgcaaattggg cggtaggcgt g 21

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi PCR

<400> 25

tagaaggcac agtcgagg 18

<210> 26

<211> 1815

<212> DNA

<213> Người

<400> 26

atgctgctgc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60

ctgtgggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc ctgaagaccc agtgggtggca 120

ctgggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180

gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctgggtgca cagctttgct 240

gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300

gcacaggggca acgcatccct gaggtgctg cgctgtgctg tggcggacga gggcagcttc 360

acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccc tcagcctgca ggtggccgct 420

ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480

gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540

Danh muc trinh tu

gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc	600
ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc	660
ctggtgcgca acccctgtgt gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacacccag	720
agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccgggtgt ggccttagtg	780
ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag	840
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc	900
cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacia	960
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc	1020
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtt gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac	1080
tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc	1140
atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag	1200
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt	1260
gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg	1320
cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg	1380
acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg	1440
ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat	1500
gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg	1560
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgagcggc cgccactgtg	1620
ctggatatct gcagaattcc accacactgg actagtggat ccgagctcgg taccaagctt	1680
aagtttaaac cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg	1740
cccctcccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata	1800
aatgaggaa attgc	1815

<210> 27
 <211> 466
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <223>

<400> 27

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	

Danh muc trinh tu

Val	Leu	Ser	Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Val	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Phe	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105						110	
Tyr	Phe	Cys	Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
		115					120					125			
Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	130						135					140			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
145						150				155					160
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
				165					170					175	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
			180					185					190		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
		195					200					205			
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
	210					215					220				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
225					230					235					240
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
				245					250					255	

Danh muc trinh tu

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 28
 <211> 238

Danh muc trinh tu

<212> PRT

<213>

<220>

<223>

<400> 28

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 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Danh muc trinh tu

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 29
 <211> 465
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <223>

<400> 29

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile
 35 40 45

Thr Asp Ser Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Danh muc trinh tu

Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	165	170	175	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	180	185	190	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	195	200	205	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	210	215	220	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	225	230	235	240
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	245	250	255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	260	265	270	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	275	280	285	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	290	295	300	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	305	310	315	320
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	325	330	335	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	340	345	350	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	355	360	365	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	370	375	380	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	385	390	395	400

Danh muc trinh tu

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 30
 <211> 238
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <223>

<400> 30

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 Thr Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Danh muc trinh tu

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115 120 125

Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 31
 <211> 467
 <212> PRT
 <213>

<220>
 <223>

<400> 31

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 Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg 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 Ala

Danh muc trinh tu																		
65						70						75						80
Asp	Ala	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser			
				85					90					95				
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val			
			100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly			
		115					120					125						
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser			
	130					135					140							
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala			
145					150					155					160			
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val			
				165					170					175				
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala			
		180						185					190					
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val			
	195						200					205						
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His			
	210					215					220							
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			
225					230					235					240			
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly			
				245					250					255				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met			
			260					265					270					
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			
		275					280					285						
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val			
	290					295					300							

Danh mục trình tự

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 32
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223>

<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 Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

Danh muc trinh tu															
20				25				30							
Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser
		35					40					45			
Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
		50				55					60				
Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
65				70						75				80	
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
				85					90					95	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			100					105					110		
Gln	His	Ser	Arg	Glu	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val
		115					120					125			
Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
	130					135					140				
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
145					150					155				160	
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser
			180					185					190		
Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala
		195					200					205			
Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly
	210					215					220				
Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235					