



(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)



1-0035520

(51)⁸ A61K 39/395; C12N 15/13; C07K 16/28 (13) B

(21) 1-2017-03604

(22) 09/03/2016

(86) PCT/US2016/021592 09/03/2016

(87) WO2016/145099 15/09/2016

(30) 62/130,476 09/03/2015 US

(45) 25/05/2023 422

(43) 26/02/2018 359A

(73) AGENSYS, INC. (US)

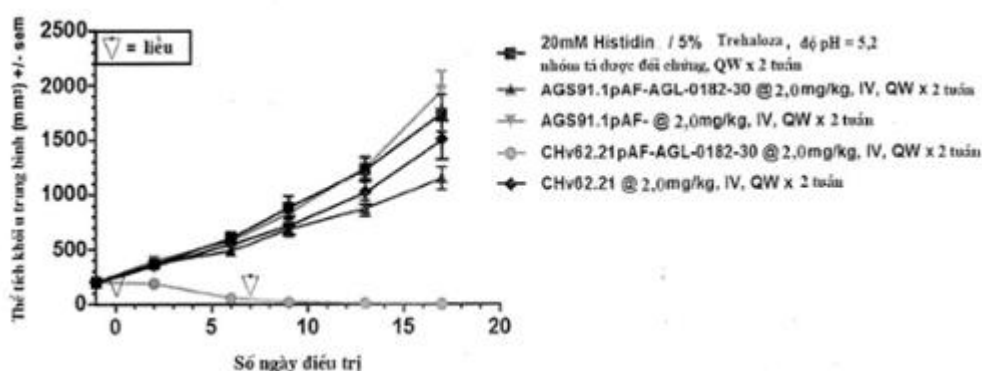
1800 Stewart Street, Santa Monica, CA 90404, United States of America

(72) RUDRA-GANGULY, Nandini (US); LOWE, Christine (US); MALIK, Faisal Hayat (US); MOON, Sung Ju (US); SNYDER, Josh (US); AVINA, Hector (US); VIRATA, Cyrus (US); CAPO, Linnette (US); LIU, Gao (US).

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

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI PROTEIN FLT3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với FLT-3 chứa vùng CDRH1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.23, vùng CDRH2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng CDRH3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32, vùng CDRL1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 14, vùng CDRL2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 17, và CDRL3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.20; cũng như axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể này; vector biểu hiện chứa axit nucleic phân lập này; tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện này; thể tiếp hợp kháng thể được chất chứa kháng thể này; và dược phẩm chứa thể tiếp hợp kháng thể được chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với protein FLT3, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và thể tiếp hợp kháng thể được chất (antibody drug conjugate - ADC) chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ước tính rằng 1.660.290 người (854.790 nam giới và 805.500 nữ giới) được chẩn đoán mắc và 580.350 nam giới và nữ giới đã tử vong vì bệnh ung thư trên thế giới vào năm 2013. Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình được chẩn đoán bệnh ung thư trên thế giới là 66 tuổi. Tỷ lệ mắc theo độ tuổi là 463,0/100.000 nam giới và nữ giới/năm. Tỷ lệ này được dựa trên các ca đã được chẩn đoán vào năm 2006 đến 2010 từ 18 khu vực địa lý SEER (N.B. SEER = Surveillance, Epidemiology, và End Results Program (Chương trình giám sát về dịch tễ học và kết quả thu được từ đó), NCI). Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình tử vong vì bệnh ung thư trên thế giới là 72 tuổi. Tỷ lệ tử vong theo độ tuổi là 176,4/100.000 nam giới và nữ giới/năm. Tỷ lệ này được dựa trên các đối tượng bị bệnh đã tử vong vào các năm từ 2006 đến 2010 ở Mỹ. Khả năng sống tương đối trong 5 năm vào các năm từ 2003 đến 2009 từ 18 khu vực địa lý SEER là 65,8%.

Bệnh bạch cầu là bệnh ung thư mà khởi phát ở mô tạo máu như tủy xương và tạo ra sự bất thường ở nhiều tế bào máu cần sản sinh và đi vào dòng máu. Các bệnh bạch cầu thường gặp bao gồm bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (Acute Lymphoblastic - ALL), bệnh tủy bào cấp tính (Acute Myeloid - AML), bệnh lympho bào mãn tính (Chronic Lymphocytic - CLL), bệnh tủy bào mãn tính (Chronic Myelogenous - CML), và bệnh bạch cầu tế bào lông (Hairy Cell - CLL).

Đối với nhóm các bệnh bạch cầu này, ước tính rằng 48.610 người (27.880 nam giới và 20.730 nữ giới) sẽ được chẩn đoán mắc bệnh và 23.720 nam giới và nữ giới tử vong vì bệnh bạch cầu vào năm 2013. Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu là 66 tuổi. Tỷ lệ mắc theo độ tuổi là 12,8/100.000 nam giới và nữ giới/năm. Tỷ lệ này được dựa trên các ca đã được chẩn đoán vào năm 2006 đến 2010 từ 18 khu vực địa lý SEER. Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình tử vong vì

bệnh bạch cầu là 75 tuổi. Tỷ lệ tử vong theo độ tuổi là 7,1/100.000 nam giới và nữ giới/năm. Tỷ lệ này được dựa trên các đối tượng bị bệnh đã tử vong vào năm 2006-2010 ở Hoa Kỳ. Khả năng sống tương đối trong 5 năm vào các năm từ 2003 đến 2009 từ 18 khu vực địa lý SEER là 56,0%.

CLL là loại bệnh bạch cầu thường gặp thứ hai ở người lớn và nó thường tiến triển chậm. Nó thường xuất hiện trong hoặc sau độ tuổi trung niên và hiếm khi xuất hiện ở trẻ em. Các đối tượng bị bệnh CLL giai đoạn sớm không được điều trị bằng hóa điều trị bệnh cho tới khi ở họ xuất hiện triệu chứng hoặc bệnh tiến triển nhanh chóng. Việc bắt đầu hóa điều trị bệnh sớm CLL không mang lại lợi ích và thậm chí có thể làm gia tăng tỷ lệ tử vong. Khi phương pháp hóa điều trị bệnh được bắt đầu, chất tương tự nucleosit là fludarabine là được chất đầu bảng được sử dụng phổ biến nhất trong việc điều trị bệnh CLL. Đã thấy rằng chế độ điều trị kết hợp cải thiện tỷ lệ đáp ứng ở một số thử nghiệm lâm sàng và bao gồm các thuốc: Fludarabine, xyclophosphamit, và rituximab (FCR); Pentostatin, xyclophosphamit, và rituximab (PCR); Fludarabine, xyclophosphamit, và mitoxantrone (FCM); Xyclophosphamit, vincristine, và prednisone (CVP); Xyclophosphamit, doxorubicin, vincristine, và prednisone (CHOP). Ước tính được rằng 15.680 người (9.720 nam giới và 5.960 nữ giới) được chẩn đoán mắc và 4.580 nam giới và nữ giới sẽ tử vong vì bệnh bạch cầu lympho mạn tính vào năm 2013. Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu lympho mạn tính là 71 tuổi. Tỷ lệ mắc theo độ tuổi là 4,3/100.000 người/năm. Tỷ lệ này được dựa trên các ca đã được chẩn đoán vào các năm từ 2006 đến 2010 từ 18 khu vực địa lý SEER. Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình tử vong do bệnh bạch cầu lympho mạn tính là 79 tuổi. Tỷ lệ tử vong theo độ tuổi là 1,4/100.000 người /năm. Tỷ lệ này được dựa trên các đối tượng bị bệnh đã tử vong vào các năm từ 2006 đến 2010 ở Hoa Kỳ. Khả năng sống tương đối trong 5 năm trong các năm từ 2003 đến 2009 từ 18 khu vực địa lý SEER là 79,2%.

Bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML) là loại bệnh bạch cầu cấp tính phổ biến nhất ở người lớn. Việc điều trị AML hiện nay cần phải đủ mạnh để đạt được sự thuyên giảm hoàn toàn (complete remission - CR) do sự thuyên giảm một phần không đem lại khả năng sống đáng kể. Tỷ lệ thuyên giảm ở người lớn mắc AML không liên quan đến độ tuổi, trong đó tỷ lệ thuyên giảm kỳ vọng lớn hơn 65% đối với những người dưới 60 tuổi. Dữ liệu cho thấy rằng khi mắc bệnh, thời gian thuyên giảm có thể ngắn hơn ở các đối

tượng bị bệnh lớn tuổi. Các đối tượng bị bệnh mà biểu hiện kháng nguyên tế bào tổ tiên CD34 và/hoặc P-glycoprotein (sản phẩm gen MDR1) để lại hậu quả ít hơn. Phân tích di truyền học tế bào đưa ra một số thông tin tiên lượng có giá trị nhất, dự đoán hậu quả của cả việc gây ra sự thuyên giảm lẫn điều trị bệnh thuyên giảm sau đó. Các bất thường về di truyền học tế bào mà biểu thị được dự đoán đúng bao gồm t(8; 21), inv(16) hoặc t(16;16), và t(15;17). Di truyền học tế bào khỏe mạnh báo hiệu nguy cơ mắc AML ở mức trung bình. Các đối tượng bị bệnh bị AML được đặc trưng bởi sự khiếm loại bỏ các nhánh dài hoặc đơn nhiễm thể của các nhiễm sắc thể số 5 hoặc 7; bằng cách chuyển đoạn hoặc đảo ngược nhiễm sắc thể 3, t(6; 9), t(9; 22); hoặc bởi sự bất thường của nhiễm sắc thể 11q23 đã được dự đoán đặc biệt kém bằng liệu pháp hóa điều trị bệnh. Ước tính rằng 14.590 người (7.820 nam giới và 6.770 nữ giới) được chẩn đoán mắc và 10.370 nam giới và nữ giới tử vong vì bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính vào năm 2013. Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính là 67 tuổi. Tỷ lệ mắc theo độ tuổi là 3,7/100.000 người/năm. Tỷ lệ này được đưa ra dựa trên các ca đã được chẩn đoán vào các năm 2006 đến 2010 từ 18 khu vực địa lý SEER. Từ năm 2006 đến 2010, độ tuổi trung bình tử vong vì bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính là 72 tuổi. Tỷ lệ tử vong theo độ tuổi là 2,8/100.000 người/năm. Tỷ lệ này được đưa ra dựa trên các đối tượng bị bệnh đã tử vong vào các năm 2006 đến 2010 ở Hoa Kỳ. Khả năng sống tương đối trong 5 năm trong các năm từ 2003 đến 2009 từ 18 khu vực địa lý SEER là 24,2%. Điều đáng chú ý là, toàn bộ các thông tin chung về bệnh ung thư này được lấy từ trang web NCI (www.cancer.gov) và toàn bộ các thống kê này là dựa trên các thống kê về tỷ lệ mắc phải SEER và tỷ lệ tử vong NCHS được đề cập trong: Howlader N., et. al, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://SEER.cancer.gov/csr/1975_2010/, dựa vào việc nộp dữ liệu SEER vào tháng 11 năm 2012, được đưa lên trang web SEER, 2013.

Bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (“ALL”) là nhóm bệnh ác tính ở tế bào lympho giai đoạn tiền B/T do sự biến đổi về mặt di truyền làm phong bế quá trình biệt hóa lympho và gây bất thường quá trình tăng sinh và sống sót tế bào. Đã thu được các bước tiến đáng kể trong một số thập kỷ trước trong việc điều trị bệnh ALL ở trẻ em, với tỷ lệ sống là năm (5) năm hiện đạt tới 90%. Tuy nhiên, có đến 20% trẻ em vẫn khó điều trị hoặc tái phát bệnh sau khi điều trị và tỷ lệ sống sót không còn bệnh đối với các đối tượng bị bệnh này vẫn còn nhỏ. Do đó, vẫn còn thách thức trong việc điều trị các đối

tượng bị bệnh lớn tuổi mắc bệnh ALL, với tỷ lệ tái phát cao ngay cả sau giai đoạn tiên triển đáng kể ở liệu pháp hóa điều trị bệnh hiện đại. Trong các thập kỷ gần đây, đã có nhiều tiến bộ trong việc điều trị bệnh ALL, mà chủ yếu dựa vào sự tăng cường và tối ưu hóa liệu pháp hóa điều trị bệnh, sử dụng việc cấy ghép tế bào gốc được làm thích ứng với nguy cơ, cũng như việc điều trị bệnh được cá nhân hóa và hướng đích bao gồm việc sử dụng các kháng thể đơn dòng. Bằng cách sử dụng việc giải trình tự thế hệ sau, các đột biến bổ sung ảnh hưởng tới quá trình tạo lympho bào bình thường và tầm quan trọng của các đột biến kết hợp, cũng như các biến đổi biểu sinh được đánh giá. Dữ liệu thu được bằng cách này sẽ hỗ trợ việc đánh giá dự đoán ở đối tượng bị bệnh cụ thể, điều quan trọng là còn ở phương pháp điều trị hướng đích kết hợp thích hợp đối với các đột biến bất thường.

Hơn nữa, việc điều trị bằng các kháng thể đơn dòng (mAb) (G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)) là quan trọng. Các kháng thể đơn dòng hiện nay được phê chuẩn là các chất điều trị trong việc cấy ghép, bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng, bệnh tim mạch và bệnh viêm. Các isotyp khác nhau có chức năng tác động khác nhau. Sự khác biệt về chức năng này được phản ánh ở các cấu trúc 3 chiều khác biệt đối với các isotyp globulin miễn dịch khác nhau (P.M. Alzari et al, *Annual Rev. Immunol.*, 6:555-580 (1988)).

Do chuột nhất là động vật thích hợp để gây miễn dịch và nhận biết hầu hết các kháng nguyên ở người là kháng nguyên lạ, nên mAb kháng đích của người có khả năng điều trị thường có nguồn gốc từ loài gặm nhấm. Tuy nhiên, kháng thể đơn dòng của loài gặm nhấm có các nhược điểm vốn có để làm chất điều trị bệnh cho người. Chúng cần được sử dụng liều thường xuyên hơn vì mAb có thời gian bán thải ở người ngắn hơn so với các kháng thể của người. Điều quan trọng hơn, việc sử dụng lặp lại các kháng thể của loài gặm nhấm cho hệ miễn dịch của người sẽ làm cho hệ miễn dịch của người phải đáp ứng bằng cách nhận biết protein của chuột nhất làm chất lạ và tạo ra đáp ứng kháng thể kháng chuột nhất của người (human anti-mouse antibody - HAMA). Đáp ứng HAMA này có thể gây ra phản ứng dị ứng và thanh thải nhanh kháng thể của loài gặm nhấm ra khỏi hệ này, do đó khiến cho việc điều trị bệnh bằng kháng thể của loài gặm nhấm trở nên vô dụng. Để tránh được các ảnh hưởng này, đã và đang có các nỗ lực tạo ra hệ miễn dịch của người ở chuột nhất.

Các nỗ lực ban đầu hy vọng là tạo ra được chuột nhắt chuyển gen có khả năng đáp ứng với các kháng nguyên với các kháng thể có trình tự của người (Xem bài báo: Bruggemann et al, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713 (1989)), nhưng được giới hạn bởi lượng ADN có thể duy trì một cách ổn định bởi các vật truyền dùng để tách dòng sẵn có. Việc sử dụng vector dùng để tách dòng nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (yeast artificial chromosome - YAC) sẽ dẫn tới việc đưa các mảnh dòng phôi lớn của locus Ig của người vào động vật có vú chuyển gen. Về cơ bản, phần lớn gen của vùng V, D, và J của người được sắp hàng với cùng một khoảng cách tìm thấy được trong bộ gen của người và vùng hằng định của người được đưa vào chuột nhắt bằng cách sử dụng YAC. Một chủng chuyển gen như vậy của chuột được gọi là chuột nhắt XenoMouse® và đang có bán trên thị trường do Amgen Fremont, Inc. (Fremont CA), trước đây là Abgenix, Inc.

Ngoài ra, các kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen Veloclmmune mà trình tự của bộ gen mang các đoạn biến đổi nội sinh của chuột nhắt ở các locus của chuỗi nặng (các đoạn VH, DH, và JH) và/hoặc chuỗi nhẹ kappa (VK và JK) của globulin miễn dịch đã được thay thế, toàn bộ hoặc một phần, đưa vào với trình tự của bộ gen của người mang các đoạn biến đổi của dòng phôi không được sắp hàng của các locus của chuỗi nặng của globulin miễn dịch (VH, DH, và JH) và/hoặc chuỗi nhẹ kappa (VK và JK) của người (Regeneron, Tarrytown, NY). Xem, ví dụ, các patent Mỹ số 6,586,251, 6,596,541, 7,105,348, 6,528,313, 6,638,768, và 6,528,314.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và thể tiếp hợp kháng thể dược chất (ADC) của nó gắn kết với các protein FLT3 và mảnh polypeptit của các protein FLT3 này. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoàn toàn của người được tiếp hợp với dược chất điều trị bệnh. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic nguyên vẹn được thể hiện trên Fig.2A và/hoặc Fig.2B không được mã hóa và/hoặc trình tự axit amin đầy đủ được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B không được tạo ra. Theo các phương án nhất định, trình tự axit nucleic nguyên vẹn được thể hiện trên Fig.2A và/hoặc Fig.2B được mã hóa và/hoặc trình tự axit amin đầy đủ được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B được tạo ra, mỗi loại trong số chúng ở dạng liều đơn vị dùng tương ứng cho người.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm tạo miễn dịch hoặc dùng để điều trị bệnh khác nhau, như thể tiếp hợp kháng thể được chất, và các chiến lược điều trị bệnh ung thư biểu hiện FLT3 như bệnh ung thư các mô nêu trong bảng I (ví dụ, AML, ALL, bao gồm bệnh bạch cầu nguyên bào lympho tế bào B và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho tiền tế bào B).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Trình tự ADN bổ sung và axit amin của FLT3 được thể hiện trên Fig.1. Methionin khởi đầu được gạch chân. Khung đọc mở kéo dài từ axit nucleic 67-3048 bao gồm bộ ba mã hóa kết thúc.

Fig.2A. Trình tự ADN bổ sung và axit amin của chuỗi nặng của CHv62.21. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng một gạch chân là vùng hằng định IgG1 của chuỗi nặng của người.

Fig.2B. Trình tự ADN bổ sung và axit amin của chuỗi nhẹ của CHv62.21 và chuỗi nhẹ của CHv62.21pAF. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng một gạch chân là vùng hằng định kappa của người.

Fig.2C. Trình tự ADN bổ sung và axit amin của chuỗi nặng của CHv62.21 được cải biến bằng đoạn cài xen của axit amin không có trong tự nhiên. Vị trí được đánh dấu bằng X là vị trí của bộ ba mã hóa amber đối với đoạn cài xen của axit amin không có trong tự nhiên (“nnAA”) *para*-axetylphenylalanin (pAF) ở gốc axit nucleic 371. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và một gạch chân là vùng hằng định IgG1 của chuỗi nặng của người.

Fig.3A. Trình tự axit amin của chuỗi nặng của CHv62.21. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và một gạch chân là vùng hằng định IgG1 của người.

Fig.3B. Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của CHv62.21 và chuỗi nhẹ của CHv62.21pAF. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và một gạch chân là vùng hằng định kappa của người.

Fig.3C. Trình tự axit amin của chuỗi nặng của CHv62.21. Vị trí axit amin số 124, được đánh dấu bằng X là vị trí của bộ ba mã hóa amber đối với đoạn cài xen của axit amin không có trong tự nhiên (“nnAA”) *para*-axetylphenylalanin (pAF). Vùng hai gạch

chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng một gạch chân là vùng hằng định IgG1 của người.

Fig.4A. Trình tự sắp thẳng hàng của chuỗi nặng của CHv62.21 với dòng phôi Ig của người.

Fig. 4B. Trình tự sắp thẳng hàng của chuỗi nhẹ của CHv62.21 với dòng phôi Ig của người.

Fig.5. Nghiên cứu hiệu lực và nghiên cứu chuẩn độ liều của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở mô hình dị ghép được thiết lập dưới da của dòng tế bào bạch cầu đơn nhân dạng tủy B của người MV4-11 được cấy vào chuột nhắt CB17/SCID.

Fig.6. Nghiên cứu hiệu lực của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) và CHv62.21pAF (AGS62P) (kháng thể trần) ở mô hình dị ghép đã được thiết lập dưới da của dòng tế bào bạch cầu đơn nhân dạng tủy B của người MV4-11 được cấy vào chuột nhắt CB 17 SCID.

Fig.7. CHv62.21 và CHv62.21pAF không có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể trung gian (ADCC) *in vitro* EOL-1, SEM, và Raji (từ trái sang phải ở hình vẽ này). Chi tiết về thử nghiệm: 1) E:T = 100: 1; 2) Nồng độ kháng thể = 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 3) Thời gian ủ : 4H; 4) Đối chứng isotyp mAb & ADC: AGS91.1-L363-pAF, AGS91.88-pAF-AGSL-0182-30; 5) Đối chứng dương: Các tế bào Raji hướng đích Rituximab.

Fig.8. CHv62.21 thể hiện hoạt tính phong bế không có phối tử. Kháng thể đơn dòng phong bế phối tử FLT3 (1b37.1) được so sánh với CHv62.21 trong thử nghiệm gắn kết phối tử xác nhận Mab CHv62.21 là chất phong bế không có phối tử.

Fig.9. CHv62.21 không gây ảnh hưởng tới quá trình tăng sinh tế bào qua trung gian FL.

Fig.10. Hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể đơn dòng phong bế phối tử FLT3 1 b37.1 được khử khi có mặt FL. Fig.10(A). Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in-vitro* của v62-lb21.1-AGL-0129-08 cùng với và không cùng với phối tử FLT3 của người (hFL) trên các tế bào RS-4-11. Fig.10(B). Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in-vitro* của v62-lb37.1-AGL-0129-08 cùng với và không cùng với phối tử FLT3 của người (hFL) trên các tế bào RS-4-11.

Fig.11. Phôi tử FLT3 không ảnh hưởng tới hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian CHv62.21pAF-AGL-0182-30 trên các tế bào MOLM-13. Fig.11(A). Đánh giá khả năng gắn kết của CHv62.21pAF được biotinyl hóa và v62-lb37.1 với sự có mặt của phôi tử FLT3 của người trên các tế bào MOLM-13. Fig.11(B). Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in-vitro* của CHv62.21pAF- AGL-0182-30 cùng với và không cùng với phôi tử FLT3 của người trên các tế bào MOLM-13.

Fig.12. Độ ổn định *in vitro* của CHv62.21pAF- AGL-0182-30. Fig.12(A). Đánh giá độ ổn định của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở huyết thanh người. Fig.12(B). Đánh giá độ ổn định của CHv62-AGL-0301-20 ở huyết thanh người.

Fig.13. Nghiên cứu hiệu lực của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) và CHv62.21pAF (kháng thể trần) ở mô hình dị ghép đã được thiết lập dưới da của dòng tế bào bạch cầu đơn nhân dạng tủy B của người MV4-11 đã được cấy vào chuột nhắt CB 17 SCID bằng cách sử dụng phác đồ dùng đa liều.

Fig.14. Hiệu quả của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở mô hình dị ghép SEM-xcl được thiết lập dưới da.

Fig.15. Biểu đồ thể hiện kết quả của FACS gắn kết/dòng tế bào

Fig.16. Biểu hiện FLT3 ở các mẫu AML sơ cấp và mẫu bình thường.

Fig.17. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in-vitro* của CHv62.21 pAF-AGL-0182-30 và CHv62.21 pAF trên các tế bào MOLM-13, MV-4-11 & Karpas299.

Mô tả chi tiết sáng chế

I.) Định nghĩa

II.) Kháng thể FLT3

III.) Thể tiếp hợp kháng thể dược chất nói chung

III(A). Maytansinoid

III(B). Auristatin và dolostatin

III(C). Calicheamicin

III(D). Dược chất gây độc tế bào khác

IV.) Thể tiếp hợp kháng thể dược chất gắn kết với FLT3

V.) Đơn vị liên kết

VI.) Đơn vị kéo dài

VII.) Đơn vị axit amin

VIII.) Đơn vị đệm

IX.) Đơn vị dược chất

X.) Khả năng mang dược chất

XI.) Các phương pháp xác định tác dụng gây độc tế bào của ADC

XII.) Điều trị bệnh ung thư biểu hiện FLT3

XIII.) FLT3 làm đích đối với việc điều trị bệnh trên cơ sở kháng thể

XIV.) Dung dịch hỗn hợp ADC chứa FLT3

XV.) Điều trị bệnh kết hợp

XVI.) Kit/vật phẩm dùng trong sản xuất

I.) Định nghĩa:

Trừ khi có quy định khác, toàn bộ thuật ngữ kỹ thuật, chú thích và thuật ngữ khoa học khác hoặc danh pháp được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong một số trường hợp, thuật ngữ có nghĩa thông thường được xác định trong bản mô tả này nhằm chỉ ra một cách rõ ràng và/hoặc dẫn chiếu, và việc chỉ ra các định nghĩa như vậy vào trong bản mô tả này không nhất thiết phải được hiểu có chỉ ra sự khác nhau cơ bản mà nói chung được hiểu trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhiều kỹ thuật và phương pháp được mô tả hoặc được dẫn chiếu trong bản mô tả này được hiểu và thường được sử dụng bằng cách sử dụng phương pháp thông thường bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, như, ví dụ, phương pháp tách dòng phân tử đã được sử dụng rộng rãi được mô tả trong ấn phẩm: Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Nếu thích hợp, các phương pháp liên quan đến việc sử dụng kit và các chất phản ứng đang có bán trên thị trường thường được thực hiện theo các quy trình và/hoặc các thông số đã được xác định bởi nhà sản xuất trừ khi có quy định khác.

Khi nhãn hiệu được sử dụng trong bản mô tả này, thì việc dẫn chiếu tới nhãn hiệu cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thành phần của sản phẩm, được chất gốc, và được chất của nhãn sản phẩm, trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ “bệnh ung thư nặng”, “bệnh ung thư nặng tại chỗ”, “bệnh nặng” và “bệnh nặng tại chỗ” có nghĩa là bệnh ung thư đã lan tràn tới nang mô có liên quan, và có nghĩa bao gồm bệnh giai đoạn C theo hệ thống liên kết niệu học của Hoa kỳ (the American Urological - AUA), bệnh giai đoạn C1 - C2 theo hệ thống Whitmore-Jewett, và bệnh giai đoạn T3 - T4 và N+ theo hệ thống TNM (khối u, cục u, di căn). Nói chung, phẫu thuật không được khuyến cáo dùng đối với các đối tượng bị bệnh mắc bệnh nặng tại chỗ, và các đối tượng bị bệnh này về cơ bản là đạt được kết quả có lợi ít hơn so với các đối tượng bị bệnh ung thư tại chỗ về mặt lâm sàng (được giới hạn ở các cơ quan).

Thuật ngữ “alkyl” như chính thuật ngữ này hoặc là một phần của thuật ngữ khác, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hydrocacbon có 1 đến 12 nguyên tử cacbon no chứa nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai, bậc ba hoặc vòng. Các nhóm alkyl cụ thể là các nhóm có 1 đến 8 nguyên tử cacbon, nằm trong khoảng từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon. Ví dụ về các nhóm alkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: metyl (Me), etyl (Et), n-propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl (tBu), n-pentyl, isopentyl, *tert*-pentyl, và n-hexyl, isohexyl. Theo một số phương án, nhóm alkyl có nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai, hoặc bậc ba và không có nguyên tử cacbon vòng.

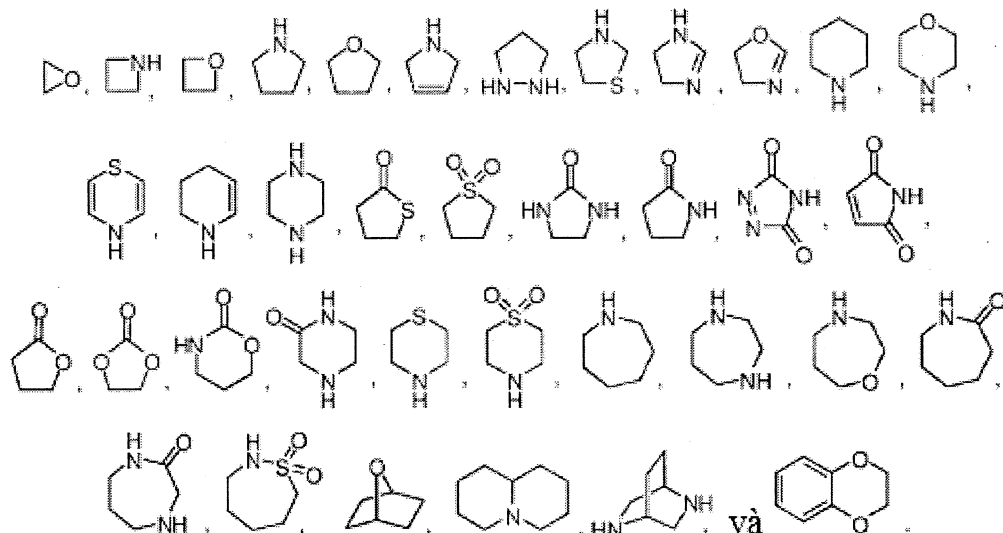
Thuật ngữ “alkenyl” như chính thuật ngữ này hoặc là một phần của thuật ngữ khác, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hydrocacbon có 2 đến 12 nguyên tử cacbon chứa nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai, bậc ba hoặc vòng với ít nhất một vị trí của liên kết đôi không bão hòa, tức là gốc liên kết đôi cacbon-cacbon, sp^2 . Các nhóm alkenyl cụ thể là các nhóm có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, nằm trong khoảng từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon, hoặc 2 đến 4 nguyên tử cacbon. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: vinyl ($-CH=CH_2$), allyl ($-CH_2CH_2=CH_2$), cyclopentenyl ($-C_5H_7$), và 5-hexenyl ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$). Theo một số phương án, nhóm alkenyl có nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai, hoặc bậc ba và không có nguyên tử cacbon vòng.

Thuật ngữ “alkynyl” như chính thuật ngữ này hoặc là một phần của thuật ngữ khác, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hydrocacbon có 2 đến 12 nguyên tử cacbon

chứa nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai, bậc ba hoặc vòng với ít nhất một vị trí của liên kết ba không bão hòa, nghĩa là, liên kết ba cacbon-cacbon, sp. Các nhóm alkynyl cụ thể là các nhóm có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, nằm trong khoảng từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon, hoặc 2 đến 4 nguyên tử cacbon. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: etynyl ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) và 2-propynyl ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$). Theo một số phương án, nhóm alkynyl có nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai, hoặc bậc ba và không có nguyên tử cacbon vòng.

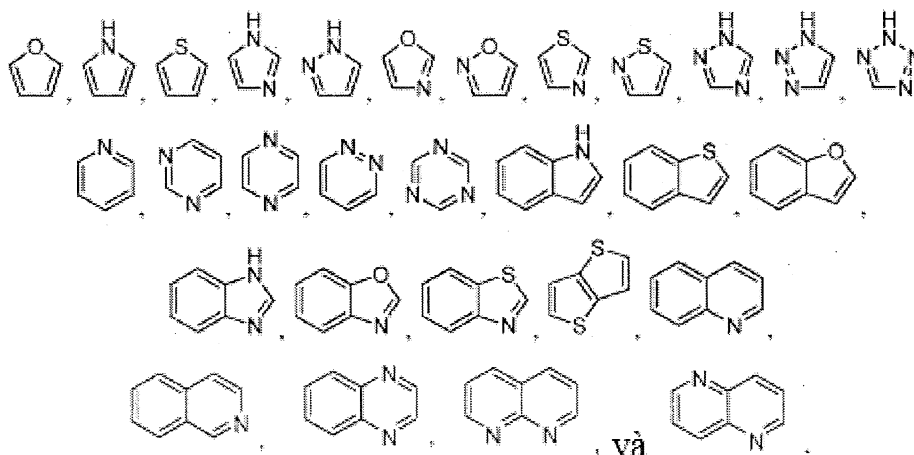
Thuật ngữ “alkoxy” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nhóm -O-alkyl, trong đó O là điểm gắn kết với phần còn lại của phân tử, và alkyl là như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “heteroxycloalkyl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cấu trúc vòng một vòng, hoặc được ngưng tụ, liên kết cầu nối, hoặc đa vòng spiro bão hoà hoặc bão hoà một phần và có 3 đến 12 nguyên tử vòng trên một cấu trúc vòng được chọn từ nguyên tử cacbon và tối đa ba nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy, và lưu huỳnh. Nhóm heteroxycloalkyl cụ thể là các nhóm có 3 đến 8 nguyên tử trên vòng hoặc 5 đến 7 nguyên tử vòng trên một cấu trúc vòng. Cấu trúc vòng có thể tùy ý chứa tối đa hai nhóm oxo trên cạnh của vòng cacbon hoặc lưu huỳnh. Nhóm dùng để minh họa, ở dạng gốc liên kết một cách thích hợp, bao gồm:



Thuật ngữ “heteroaryl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dị vòng thơm gồm một vòng, hai vòng ngưng tụ, hoặc đa vòng ngưng tụ (cấu trúc vòng có nguyên tử trên vòng được chọn từ nguyên tử cacbon và tối đa bốn nguyên tử khác loại được chọn từ nguyên tử nitơ, oxy, và lưu huỳnh) có 3 đến 12 nguyên tử trên vòng/dị vòng. Các nhóm heteroaryl cụ thể là các nhóm có 3 đến 8 nguyên tử trên vòng hoặc 5 đến 7 nguyên tử

vòng trên một cấu trúc vòng. Ví dụ dùng để minh họa về các nhóm heteroaryl bao gồm các nhóm sau, ở dạng gốc liên kết một cách thích hợp:



Thuật ngữ “dị vòng”, “vòng khác loại”, hoặc “heteroxyclyl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc “heteroxycloalkyl” và “heteroaryl” như được xác định trên đây.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng các nhóm heteroxyclyl, heteroaryl và heteroxycloalkyl đã được liệt kê hoặc minh họa nêu trên là không đầy đủ, và các nhóm bổ sung nằm trong phạm vi của thuật ngữ đã được xác định này cũng có thể được chọn.

Thuật ngữ “halogen” và “halo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ clo, flo, brom, hoặc iot.

Thuật ngữ “được thế” có nghĩa là nhóm hoặc gốc cụ thể mang một hoặc nhiều phần tử thế. Thuật ngữ “không được thế” có nghĩa là nhóm cụ thể không mang phần tử thế. Thuật ngữ “tùy ý được thế” có nghĩa là nhóm cụ thể không được thế hoặc được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế. Nếu thuật ngữ “được thế” được sử dụng để mô tả hệ cấu trúc, thì việc thế xảy ra ở vị trí cho phép về hóa trị bất kỳ trên hệ này.

Công thức bất kỳ nêu trong bản mô tả này được dự định để thể hiện các hợp chất có cấu trúc được mô tả bởi công thức cấu trúc cũng như các biến đổi hoặc dạng nhất định. Cụ thể, các hợp chất có công thức bất kỳ được nêu trong bản mô tả này có thể có các tâm không đối xứng và do đó tồn tại ở các dạng đồng phân đối ảnh khác nhau. Toàn bộ các chất đồng phân dị cấu quang học và chất đồng phân lập thể của các hợp chất có công thức chung, và hỗn hợp của chúng, được coi là nằm trong phạm vi của công thức

này. Do đó, công thức bất kỳ nêu trong bản mô tả này được dự định để thể hiện chất triet quang, một hoặc nhiều dạng đồng phân đối ảnh, một hoặc nhiều dạng đồng phân không đối quang, một hoặc nhiều dạng đồng phân atropi, và hỗn hợp của chúng. Hơn thế nữa, các cấu trúc nhất định có thể có mặt ở dạng chất đồng phân dị hình (tức là, các chất đồng phân *cis* và *trans*), chất hồ biến, hoặc chất đồng phân atropi. Ngoài ra, công thức bất kỳ được nêu trong bản mô tả này cũng được dự định để chỉ dạng bất kỳ của một trong số dạng hydrat, solvat, và vô định hình và đa hình của các hợp chất này, và hỗn hợp của chúng, ngay cả khi nêu các dạng này không được liệt kê một cách rõ ràng. Theo một số phương án, dung môi là nước và solvat là hydrat.

Công thức bất kỳ nêu trong bản mô tả này cũng được dự định để thể hiện dạng không được đánh dấu cũng như dạng được đánh dấu đồng vị của các hợp chất này. Các hợp chất được đánh dấu đồng vị có các cấu trúc được mô tả bởi các công thức được nêu trong bản mô tả này trừ một hoặc nhiều nguyên tử được thay thế bằng nguyên tử có khối lượng nguyên tử hoặc số khối đã được chọn. Ví dụ về các chất đồng vị có thể được kết hợp vào các hợp chất được nêu trong bản mô tả này lần lượt bao gồm các chất đồng vị của hydro, cacbon, nitơ, oxy, phospho, flo, clo, và iot, như ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , và ^{125}I . Các hợp chất được đánh dấu đồng vị như vậy là hữu ích trong nghiên cứu trao đổi chất (tốt hơn là với ^{14}C), nghiên cứu phản ứng động học (với, ví dụ ^2H hoặc ^3H), kỹ thuật phát hiện hoặc chụp ảnh [như chụp positron cắt lớp (PET) hoặc chụp cắt lớp bằng bức xạ đơn photon (SPECT)] bao gồm thử nghiệm phân bố được chất hoặc mô cơ chất, hoặc trong việc điều trị phóng xạ cho đối tượng bị bệnh. Cụ thể, hợp chất được đánh dấu ^{18}F hoặc ^{11}C có thể được đặc biệt ưu tiên đối với nghiên cứu PET hoặc SPECT. Ngoài ra, việc thay thế bằng các chất đồng vị nặng hơn như đoteri (tức là, ^2H) có thể tạo ra lợi ích điều trị bệnh nhất định thu được từ quá trình làm ổn định trao đổi mạnh hơn, ví dụ, được gia tăng đối với các yêu cầu về thời gian bán thải in vivo hoặc giảm liều lượng. Các hợp chất được đánh dấu đồng vị được nêu trong bản mô tả này và các tiền được chất của chúng nói chung có thể được tạo ra bằng cách thực hiện các phương pháp được bộc lộ trong các sơ đồ hoặc trong các Ví dụ và quy trình tạo ra được mô tả dưới đây bằng cách thế chất phản ứng được đánh dấu đồng vị có sẵn cho chất phản ứng không được đánh dấu đồng vị.

Khi đề cập đến công thức bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, thì việc lựa chọn gốc cụ thể từ danh mục các loại có thể có mặt đối với biến cụ thể không được dự định để xác định cùng một lựa chọn các loại này đối với biến xuất hiện ở một nơi khác. Mặt khác, khi biến xuất hiện nhiều hơn một lần, thì việc lựa chọn các loại từ danh sách cụ thể là việc lựa chọn độc lập đối với cùng một loại ở một nơi khác ở dạng công thức, trừ khi có quy định khác.

Danh pháp “C_{i-j}” với $j > i$, khi được sử dụng trong bản mô tả này đối với nhóm phân tử thể, có nghĩa là các phương án về loại bất kỳ trong số các chế phẩm, ứng dụng, hoặc các phương pháp nêu trong bản mô tả đối với mỗi và từng số lượng các nguyên tử cacbon, từ i đến j bao gồm i và j , được thực hiện một cách độc lập. Bằng cách minh họa, thuật ngữ C₁₋₃ được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một cách độc lập các phương án có một nguyên tử cacbon (C₁), phương án có hai nguyên tử cacbon (C₂), và phương án có ba nguyên tử cacbon (C₃).

Thuật ngữ “C_{n-m}alkyl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mạch béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, có tổng số N của nguyên tử cacbon trên mạch thỏa mãn $n < N < m$, với $m > n$.

Tên hóa học được nêu trong bản mô tả này được tạo ra bằng cách sử dụng phần mềm AutoNOM™. Nếu có sự khác nhau giữa cấu trúc hóa học và tên gọi được nêu đối với cấu trúc đó, thì cấu trúc đó sẽ chiếm ưu thế.

Theo cách chú thích nêu trên về việc chuyển đổi và danh pháp, cần hiểu rằng việc viện dẫn rõ ràng trong bản mô tả này tới tập hợp hàm ý, trong đó có ý nghĩa hóa học và trừ khi có quy định khác, việc viện dẫn độc lập đến các phương án của tập hợp này, và viện dẫn tới mỗi và từng phương án của tập hợp con của tập hợp này được chỉ ra một cách rõ ràng.

“Biến đổi mô hình glycosyl hoá tự nhiên” được dự định nhằm mục đích có nghĩa là làm loại bỏ một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được tìm thấy trong FLT3 có trình tự tự nhiên (bằng cách loại bỏ vị trí glycosyl hóa cơ bản hoặc bằng cách làm loại bỏ quá trình glycosyl hoá bằng cách hóa học và/hoặc enzym), và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá không có mặt trong FLT3 có trình tự tự nhiên, trong đó “mô hình glycosyl hoá tự nhiên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mô hình glycosyl hóa sau dịch mã tự nhiên thu được từ việc kết hợp cụ thể trình tự FLT-3, loại tế bào, và điều kiện sinh trưởng

đã sử dụng. Ngoài ra, thuật ngữ bao gồm thay đổi về lượng trong quá trình glycosyl hoá của các protein tự nhiên, bao gồm việc thay đổi về bản chất và tỷ lệ của các gốc hydrat cacbon khác nhau có mặt.

Thuật ngữ “chất tương tự” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử có cấu trúc tương tự hoặc giống hoặc được cho là tương ứng với phân tử khác (ví dụ, protein liên quan đến FLT3). Ví dụ, chất tương tự của protein FLT3 có thể được gắn kết đặc hiệu bởi kháng thể hoặc tế bào T gắn kết đặc hiệu với FLT3.

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng với nghĩa rộng nhất nếu không được chỉ định rõ ràng theo cách khác. Do đó, “kháng thể” có thể xuất hiện trong tự nhiên hoặc do con người tạo ra như các kháng thể đơn dòng được sản sinh bởi kỹ thuật lai thông thường hoặc chuyển gen ở chuột nhắt. Kháng thể FLT3 bao gồm các kháng thể đơn dòng và đa dòng cũng như các mảnh chứa miền gắn kết với kháng nguyên và/hoặc một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung của các kháng thể này. Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng kháng thể bất kỳ hoặc mảnh của nó gắn kết đặc hiệu với FLT3 và/hoặc có hoạt tính sinh học mong muốn và đặc biệt bao gồm các kháng thể đơn dòng (bao gồm các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ), kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và mảnh kháng thể với điều kiện chúng gắn kết đặc hiệu với FLT3 và/hoặc có hoạt tính sinh học mong muốn. Kháng thể đặc hiệu bất kỳ có thể được sử dụng trong phương pháp và chế phẩm nêu trong bản mô tả này. Do đó, theo một phương án, thuật ngữ “kháng thể” bao gồm phân tử chứa ít nhất một vùng biến đổi từ phân tử globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ và ít nhất một vùng biến đổi từ phân tử của chuỗi nặng kết hợp với nhau để tạo ra vị trí gắn kết đặc hiệu đối với kháng nguyên đích. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể IgG. Ví dụ, kháng thể là kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4. Các kháng thể này là hữu ích trong các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong thể thực khuẩn, hoặc trong các động vật khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bò, thỏ, dê, chuột nhắt, chuột, chuột đồng, chuột lang, cừu, chó, mèo, khỉ, tinh tinh, và khỉ không đuôi. Do đó, theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể động vật có vú. Các kỹ thuật về thể thực khuẩn có thể được sử dụng để phân lập kháng thể ban đầu hoặc để tạo ra các biến thể có tính đặc hiệu hoặc ái lực biến đổi. Kỹ thuật như vậy là kỹ thuật thông thường và đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, kháng thể được

sản sinh bởi các phương pháp tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng thể tái tổ hợp có thể được sản xuất bởi gây nhiễm tế bào vật chủ với vectơ chứa trình tự ADN mã hóa kháng thể. Một hoặc nhiều vectơ có thể được sử dụng để gây nhiễm trình tự ADN biểu hiện ít nhất một vùng VL và ít nhất một vùng VH trong tế bào vật chủ. Phần mô tả cụ thể về kỹ thuật tái tổ hợp tạo ra và sản xuất kháng thể bao gồm Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, et al, MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); và CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, hầu hết được xuất bản gần đây). Kháng thể theo sáng chế có thể được cải biến bằng kỹ thuật tái tổ hợp để làm tăng hiệu quả của kháng thể thông qua chức năng mong muốn. Do đó, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế rằng các kháng thể có thể được cải biến bằng cách thể nhờ sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp. Thông thường, việc thể có thể là thể bảo thủ. Ví dụ, ít nhất một axit amin trong vùng hằng định của kháng thể có thể được thay thế bằng gốc khác nhau. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,624,821, patent Mỹ số 6,194,551, đơn sáng chế số WO 9958572; và Angal, et al, Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993). Việc cải biến axit amin bao gồm loại bỏ, bổ sung, và thể axit amin. Trong một số trường hợp, các biến đổi này được thực hiện để làm giảm các hoạt tính không mong muốn, ví dụ, độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể. Thông thường, các kháng thể được đánh dấu bằng cách nối, theo cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị, chất tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được. Đã biết nhiều nhãn và kỹ thuật liên hợp và được thông báo sâu rộng cả trong tài liệu khoa học lẫn tài liệu sáng chế. Các kháng thể này có thể được sàng lọc để gắn kết với FLT3 bình thường hoặc khiếm loại bỏ. Xem, ví dụ, ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, 1996). Các kháng thể thích hợp có hoạt tính sinh học mong muốn có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm in vitro sau đây bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: quá trình tăng sinh, di chuyển, bám dính, phát triển aga mềm, tạo mạch, kết nối tế bào-tế bào, chết theo chương trình, vận chuyển, truyền tín hiệu, và các thử nghiệm in vivo sau đây như ức chế sự phát triển của khối u. Các kháng thể nêu trong bản mô tả này cũng có thể là hữu ích trong các ứng dụng chẩn đoán. Đối với kháng thể bất giữ hoặc không trung hòa, chúng có thể được sàng lọc về khả năng gắn kết với kháng thể đặc hiệu mà không ức chế khả năng gắn kết với thụ thể hoặc hoạt tính sinh học của kháng nguyên. Đối với kháng thể trung hòa, các kháng thể này có thể là hữu

ích trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Chúng cũng có thể được sử dụng để định lượng FLT3 hoặc thụ thể của nó.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” hoặc “mảnh kháng thể” của kháng thể (hoặc đơn giản là “phần kháng thể”), như được sử dụng trong bản mô tả này, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể FLT3 có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, FLT3 và các biến thể; xem, Fig.1). Nhận thấy rằng chức năng gắn kết với kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết bao gồm trong thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hoá trị một cấu thành từ miền V_L , V_H , C_L và C_{H1} ; (ii) mảnh $F(ab')_2$, mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu nối disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd cấu thành từ các miền V_H và C_{H1} ; (iv) mảnh Fv cấu thành từ các miền V_L và V_H của một nhánh của kháng thể, (v) mảnh dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), được cấu thành từ miền V_H ; và (vi) vùng xác định bổ sung phân lập (CDR). Hơn thế nữa, mặc dù hai miền của mảnh Fv, V_L và V_H , được mã hóa đối với gen riêng rẽ, nhưng chúng có thể được nối với nhau, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bởi liên kết tổng hợp có khả năng tạo ra một chuỗi protein trong đó các vùng V_L và V_H tạo cặp để tạo ra các phân tử hoá trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv); xem ví dụ, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; và Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng được dự định để bao gồm trong thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các mảnh kháng thể này thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các mảnh này được sàng lọc để sử dụng theo cùng cách như các kháng thể nguyên vẹn.

Thuật ngữ “Fc”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ vùng chứa vùng bản lề, các miền CH2 và/hoặc CH3.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, dạng bất kỳ của “kháng nguyên” có thể được sử dụng để sản xuất kháng thể đặc hiệu với FLT3. Do đó, kháng nguyên tạo ra có thể là đơn epitop, đa epitop, hoặc protein nguyên vẹn riêng lẻ hoặc kết hợp với một hoặc nhiều được chất tăng cường tính sinh miễn dịch đã biết trong lĩnh vực này. Kháng nguyên tạo ra có thể là protein phân lập có chiều dài đầy đủ, protein bề mặt tế bào (ví dụ, tạo miễn dịch với các tế bào được gây nhiễm với ít nhất một phần kháng nguyên), hoặc

protein hòa tan (ví dụ, tạo miễn dịch chỉ với phần miền ngoại bào của protein này). Kháng nguyên có thể được sản sinh trong tế bào được cải biến di truyền. ADN mã hóa kháng nguyên này có thể là ADN của bộ gen hoặc không của bộ gen (ví dụ, ADN bổ sung) và mã hóa ít nhất một phần miền ngoại bào. Thuật ngữ “phần”, liên quan đến kháng nguyên, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ số lượng tối thiểu axit amin hoặc axit nucleic, nếu thích hợp, để tạo ra epitop sinh miễn dịch của kháng nguyên liên quan. Các vector di truyền bất kỳ thích hợp để biến nạp các tế bào liên quan có thể được sử dụng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở vector của adenovirut, plasmit, và vector không phải của virut, như lipit cation. Theo một phương án, kháng thể của các phương pháp và chế phẩm trong bản mô tả này gắn kết đặc hiệu với ít nhất một phần miền ngoại bào của FLT3 liên quan.

Các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được tạo ra hoặc là một phần của “hoạt chất sinh học”. Thuật ngữ “hoạt chất sinh học” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hợp chất tổng hợp hoặc có trong tự nhiên được gắn kết với kháng nguyên và/hoặc tăng cường hoặc làm trung gian tạo ra tác dụng sinh học mong muốn để tăng cường độc tố tiêu diệt tế bào. Theo một phương án, các mảnh gắn kết thích hợp theo sáng chế là các mảnh có hoạt tính sinh học. Thuật ngữ “hoạt tính sinh học” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể có khả năng gắn kết epitop của kháng nguyên mong muốn và trực tiếp hoặc gián tiếp tạo ra tác dụng sinh học. Tác dụng trực tiếp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quá trình điều hòa, kích thích, và/ hoặc ức chế tín hiệu phát triển, điều hòa, kích thích, và/ hoặc ức chế tín hiệu chống lại sự gây chết theo chương trình, điều hòa, kích thích, và/ hoặc ức chế tín hiệu gây chết theo chương trình hoặc gây chết hoại, điều hòa, kích thích, và/ hoặc ức chế đợt ADCC, và điều hòa, sự kích thích, và/hoặc ức chế đợt CDC.

Ái lực gắn kết của protein gắn kết với kháng nguyên được xác định bởi hằng số liên kết (K_a) và hằng số phân ly (K_d) ($KD=K_d/K_a$). Ái lực gắn kết này có thể được đo bằng BIACORE ví dụ, bằng cách bắt giữ kháng thể thử nghiệm lên bề mặt nhạy cảm được bao bởi protein-A và cho FLT3 chảy lên bề mặt này. Theo cách khác, ái lực gắn kết có thể được đo bằng FORTEBIO, ví dụ, bằng thụ thể của kháng thể thử nghiệm được bắt giữ trên kim tiêm được phủ protein-A và FLT3 chảy trên bề mặt này. Người có trình độ

trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định các thử nghiệm thích hợp khác đã biết trong lĩnh vực này để đo ái lực gắn kết.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu”, như được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến kháng nguyên gắn kết, các protein có nghĩa là protein gắn kết với kháng nguyên gắn kết với FLT3 cũng như miễn riêng biệt, hoặc trình tự axit amin riêng biệt, trong FLT3 không có hoặc có gắn kết không đặc hiệu với các protein khác (ví dụ, không liên quan). Tuy nhiên, thuật ngữ này không loại trừ thực tế rằng các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết của nó cũng có thể được phản ứng chéo với các phân tử liên quan mật thiết. Các kháng thể và các mảnh của nó cũng như thể tiếp hợp kháng thể được chất chứa các miền này được nêu trong bản mô tả có thể gắn kết đặc hiệu với FLT3, với ái lực ít nhất gấp 2, 5, 10, 50, 100, hoặc 1000 lần so với khi chúng gắn kết với các phân tử liên quan mật thiết.

Mong muốn rằng khả năng gắn kết của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể theo sáng chế, bất kể là ở dạng nào, ví dụ, trong thể tiếp hợp kháng thể được chất, với FLT3 có thể phong bế một số hoặc toàn bộ FL gắn kết với FLT3. Tuy nhiên, trong bản mô tả này, kháng thể kháng FLT3 về cơ bản là không ức chế quá trình gắn kết của FL với FLT3. Để “về cơ bản là ức chế” quá trình gắn kết, mong muốn một lượng có thể phát hiện được việc giảm khả năng gắn kết vượt quá mức thay đổi tối thiểu; mức thay đổi nhỏ về khả năng gắn kết là tương đương với không quá lượng gắn kết tối thiểu như mong muốn trong tương tác protein protein ngẫu nhiên hoặc trong tương tác kháng thể-kháng nguyên không đặc hiệu không được bao gồm. Cần xác định xem kháng thể về cơ bản là ức chế quá trình gắn kết của phân tử khác với kháng nguyên đích có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thước đo sinh lý hoặc chức năng bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, sự tương tác của hai protein có thể được đo trực tiếp trong thử nghiệm gắn kết vật lý (ví dụ, xem Ví dụ 14, dưới đây), hoặc gián tiếp thông qua thử nghiệm chức năng xác định tác dụng ngược của quá trình tương tác protein, như quá trình truyền tín hiệu thông qua thụ thể hoặc tác dụng trong tế bào tiếp theo như phát triển hoặc ức chế sự phát triển của tế bào. Do đó, kháng thể kháng FLT3 theo sáng chế về cơ bản là không ức chế quá trình gắn kết của FL với FLT3 sẽ không làm giảm đáng kể khả năng gắn kết của FL với FLT3, và quá trình dẫn truyền khả năng gắn kết của FL thông qua FLT3 có thể phát hiện được.

Các kháng thể “đặc hiệu kép” là cũng hữu ích trong các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể, thường là kháng thể đơn dòng, có tính đặc hiệu gắn kết với ít nhất hai epitop kháng nguyên khác nhau. Theo một phương án, các epitop là từ cùng một kháng nguyên. Theo một phương án khác, các epitop là từ hai kháng nguyên khác nhau. Các phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép có thể được sản sinh tái tổ hợp bằng cách sử dụng quá trình biểu hiện đồng thời hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Xem, ví dụ, Milstein et al., *Nature* 305:537-39 (1983). Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách sử dụng liên kết hóa học. Xem, ví dụ, Brennan, et al., *Science* 229:81 (1985). Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm mảnh kháng thể đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, Hollinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48 (1993), Gruber, et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Các kháng thể đơn dòng được nêu trong bản mô tả cụ thể bao gồm các kháng thể “khảm” trong đó một phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ loài cụ thể hoặc thuộc nhóm hoặc phân nhóm kháng thể cụ thể, trong khi đó phần còn lại của chuỗi là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác hoặc được chất nhóm hoặc phân nhóm kháng thể khác, cũng như các mảnh của các kháng thể như vậy, với điều kiện chúng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và/hoặc có hoạt tính sinh học mong muốn (patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)).

Thuật ngữ “bệnh ung thư”, “khối mới tạo bất thường” và “khối u”, được sử dụng thay thế cho nhau và ở dạng số ít hoặc số nhiều, để chỉ các tế bào trải qua quá trình biến nạp ác tính khiến cho chúng tạo ra bệnh lý đối với cơ thể vật chủ. Các tế bào bệnh ung thư sơ cấp (tức là, các tế bào thu được ở gần vị trí của quá trình biến nạp ác tính) có thể được phân biệt một cách dễ dàng so với tế bào không bị bệnh ung thư bằng kỹ thuật đã biết, đặc biệt là xét nghiệm mô. Việc xác định tế bào bệnh ung thư, như được sử dụng trong bản mô tả này, không những bao gồm tế bào bệnh ung thư sơ cấp, mà còn bao gồm tế bào bất kỳ có nguồn gốc từ tế bào bệnh ung thư tổ tiên. Các tế bào này bao gồm tế bào bệnh ung thư di căn, và môi trường nuôi cấy in vitro và các dòng tế bào có nguồn gốc từ các tế bào bệnh ung thư. Khi viện dẫn tới loại bệnh ung thư thường biểu hiện ở dạng khối

u rắn, thì khối u “có thể phát hiện được về mặt lâm sàng” là khối u có thể phát hiện trên cơ sở khối lượng khối u; ví dụ, bằng các phương pháp như quét CAT, chụp MR, tia X, siêu âm hoặc sờ nắn, và/hoặc là khối u có thể phát hiện do sự biểu hiện một hoặc nhiều kháng nguyên đặc hiệu với bệnh ung thư trong mẫu thu được từ đối tượng bị bệnh. Các khối u có thể là khối u tạo huyết, ví dụ, khối u của tế bào máu hoặc khối u tương tự, tức là khối u lỏng. Ví dụ cụ thể về tình trạng bệnh trên lâm sàng trên cơ sở khối u như vậy bao gồm bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính hoặc bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính; u tủy như u đa tủy; u bạch huyết và tình trạng bệnh tương tự.

Thuật ngữ “dược chất điều trị bệnh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các dược chất tạo ra lợi ích điều trị và/hoặc có hiệu quả điều trị như được xác định trong bản mô tả này. Dược chất điều trị bệnh có thể, ví dụ, làm đảo ngược, làm tốt hơn, làm thuyên giảm, ức chế hoặc hạn chế sự tiến triển của, hoặc làm giảm mức độ trầm trọng, bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh, hoặc ảnh hưởng hoặc cả thiện hoặc làm tốt hơn một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, như bệnh ung thư. Dược chất này có thể là dược chất gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dược chất hóa trị liệu, dược chất kháng bệnh ung thư và “đơn vị dược chất” như được xác định trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “dược chất kháng bệnh ung thư” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các dược chất tạo ra lợi ích điều trị và/hoặc có hiệu quả điều trị, như được xác định trong bản mô tả này, để điều trị khối u mới tạo bất thường hoặc bệnh ung thư.

Theo một số phương án về thể tiếp hợp bất kỳ trong số thể tiếp hợp kháng thể dược chất và dược phẩm của nó theo sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể dược chất này chứa dược chất điều trị bệnh, và dược phẩm của nó, cũng có tác dụng điều trị tiền bệnh ung thư hoặc ít nhất một tế bào tiền bệnh ung thư, ví dụ, ngăn ngừa sự chuyển nhiễm ác tính vào tế bào bệnh ung thư. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều dược chất kháng bệnh ung thư cũng có tác dụng điều trị tiền bệnh ung thư hoặc ít nhất một tế bào tiền bệnh ung thư, ví dụ, ngăn ngừa sự chuyển nhiễm ác tính vào tế bào bệnh ung thư.

Thuật ngữ “dược chất hóa trị liệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ hợp chất hóa học có tác dụng ức chế sự phát triển khối u. Ví dụ không giới hạn về dược chất hóa trị liệu bao gồm chất alkyl hóa; ví dụ, mù tạc nitơ, các hợp chất etylenimin và alkyl sulphonat; các chất chống chuyển hóa, ví dụ, axit folic, chất đối kháng purin hoặc

pyrimidin; chất ức chế sự phân bào có tơ, ví dụ, chất kháng tạo ống như alkaloid của dừa cạn, auristatin và các dẫn xuất của độc tố podophyllo; chất kháng sinh gây độc tế bào; các hợp chất làm tổn hại hoặc gây ảnh hưởng cho sự biểu hiện hoặc sao chép ADN, ví dụ, chất kết dính rãnh ADN nhỏ; và chất đối kháng thụ thể yếu tố sinh trưởng. Ngoài ra, được chất hóa trị liệu bao gồm được chất gây độc tế bào (như được xác định trong bản mô tả này), các kháng thể, phân tử sinh học và phân tử nhỏ.

Thuật ngữ “hợp chất” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ và bao gồm chính hợp chất hoá học, theo cách được đề cập rõ ràng hoặc không, và nếu bản mô tả không chỉ ra rõ ràng rằng các dạng sau được loại trừ: dạng vô định hình và dạng kết tinh của hợp chất, bao gồm dạng đa hình, trong đó các dạng này có thể là một phần của hỗn hợp hoặc ở dạng phân lập; dạng axit tự do và bazơ tự do của hợp chất, là dạng thông thường được thể hiện trong cấu trúc theo sáng chế; các chất đồng phân của hợp chất, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các chất đồng phân dị cấu quang học, và chất đồng phân hồ biến, trong đó các chất đồng phân dị cấu quang học bao gồm các chất đồng phân đối ảnh và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân không đối xứng và chất đồng phân đối xứng, và các chất đồng phân dị cấu quang học bao gồm chất đồng phân dị cấu quang học được phân lập cũng như hỗn hợp của các chất đồng phân dị cấu quang học bao gồm hỗn hợp raxemic và không raxemic; trong đó chất đồng phân có thể ở dạng phân lập hoặc ở dạng hỗn hợp với một hoặc nhiều chất đồng phân khác; các chất đồng vị của hợp chất, bao gồm các hợp chất chứa đơteri- và triti, và bao gồm các hợp chất chứa đồng vị phóng xạ, bao gồm đồng vị phóng xạ có hiệu quả điều trị và chẩn đoán; dạng đa monome của hợp chất, bao gồm dạng dime, trime, v. v.; các muối của hợp chất, tốt hơn là các muối được dụng, bao gồm muối cộng axit và muối cộng bazơ, bao gồm các muối có ion trái dấu hữu cơ và ion trái dấu vô cơ, và bao gồm dạng ion lưỡng tính, trong đó nếu hợp chất được liên kết với với hai hoặc nhiều ion trái dấu, thì hai hoặc nhiều ion trái dấu này có thể là giống nhau hoặc khác nhau; và các solvat của hợp chất, bao gồm bán solvat, monosolvat, disolvat, v. v., bao gồm solvat hữu cơ và solvat vô cơ, các solvat vô cơ này bao gồm hydrat; trong đó nếu hợp chất được liên kết với hai hoặc nhiều phân tử dung môi, thì hai hoặc nhiều phân tử dung môi này có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Trong một số trường hợp, việc viện dẫn tới hợp chất theo sáng chế bao gồm việc viện dẫn rõ ràng tới một hoặc các dạng nêu trên, ví dụ, các muối và/hoặc các solvat; tuy nhiên, việc viện dẫn

này chỉ nhằm mục đích nhấn mạnh, mà không được phân tích theo cách loại trừ khác về các dạng nêu trên.

Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung”, và “CDR”, đã biết trong lĩnh vực này được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự không liên tục của axit amin trong vùng biến đổi kháng thể, có tính đặc hiệu kháng nguyên và ái lực gắn kết. Nói chung, có ba (3) CDR trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) và ba (3) CDR trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3).

Đoạn ranh giới trình tự axit amin chính xác của CDR nhất định có thể được xác định dễ dàng bằng cách sử dụng sơ đồ bất kỳ trong số nhiều sơ đồ đã biết, bao gồm các sơ đồ được mô tả bởi Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (hệ thống đánh số thứ tự “Kabat”), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (hệ thống đánh số thứ tự “Chothia”), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography”, J. Mol. Biol. 262, 732-745.” (hệ thống đánh số thứ tự “Contact”), Lefranc MP et al., “EVIPT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains”, Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (hệ thống đánh số thứ tự “IMGT”), và Honegger A and Plickthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool”, J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (hệ thống đánh số thứ tự AHo).

Đoạn ranh giới của CDR nhất định có thể thay đổi tùy thuộc vào hệ thống đánh số thứ tự đã sử dụng để nhận biết. Ví dụ, hệ thống đánh số thứ tự Kabat được dựa trên sự sắp hàng về cấu trúc, trong khi đó hệ thống đánh số thứ tự Chothia được dựa trên thông tin cấu trúc. Việc đánh số cả hệ thống đánh số thứ tự Kabat lẫn hệ thống đánh số thứ tự Chothia được dựa trên chiều dài trình tự phổ biến nhất của vùng kháng thể, với các đoạn cài xen được làm phù hợp bởi các chữ cái cài xen, ví dụ, “30a”, và đoạn loại bỏ xuất hiện trong một số kháng thể. Hai hệ thống đánh số thứ tự đặt ở các đoạn cài xen và loại bỏ (“đoạn xen/loại bỏ”) nhất định ở các vị trí khác nhau, dẫn đến cách đánh số khác nhau. Hệ thống đánh số thứ tự Contact được trên cơ sở phân tích cấu trúc tinh thể phức tạp và tương tự ở nhiều khía cạnh liên quan đến hệ thống đánh số thứ tự Chothia đánh số. Bảng V dưới đây liệt kê các vị trí CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 và CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3

nếu được xác định lần lượt bởi các hệ thống đánh số thứ tự Kabat, Chothia, và Contact. Đối với CDR-H1, việc đánh số gốc được liệt kê bằng cách sử dụng cả hệ thống đánh số thứ tự Kabat lẫn Chothia.

Do đó, trừ khi có quy định cụ thể, thuật ngữ “CDR” và “vùng xác định bổ sung” của kháng thể nhất định hoặc vùng của nó, như vùng biến đổi, cũng như các CDR riêng rẽ (ví dụ, “CDR-H1, CDR-H2”) của kháng thể hoặc vùng của nó, cần được hiểu là bao gồm vùng xác định bổ sung như được xác định bởi sơ đồ bất kỳ trong số các sơ đồ đã biết được nêu trong phần trên. Trong một số trường hợp, sơ đồ nhận biết CDR cụ thể hoặc các CDR được mô tả cụ thể, như CDR như được xác định bởi các phương pháp Kabat, Chothia, hoặc Contact. Trong các trường hợp này, trình tự axit amin cụ thể của CDR được đưa ra. Xem, ví dụ Bảng V.

Thuật ngữ “đoạn thể bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đoạn thể các axit amin và/hoặc trình tự axit amin đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này và có thể tạo ra thông thường mà không làm biến đổi hoạt tính sinh học của phân tử thu được. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này nhận thấy rằng nói chung, đoạn thể một axit amin trong vùng không thiết yếu của polypeptit về cơ bản là không làm biến đổi hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, Watson, et al, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Tốt hơn, nếu là đoạn thể cụ thể như vậy được tạo ra theo các cách nêu trong Bảng II và Bảng III(a-b). Ví dụ, các thay đổi như vậy bao gồm thế bất kỳ trong số isoleuxin (I), valin (V), và leuxin (L) bằng axit amin bất kỳ khác trong số các axit amin kỵ nước này; axit aspartic (D) bằng axit glutamic (E) và ngược lại; glutamin (Q) bằng asparagin (N) và ngược lại; và serin (S) bằng threonin (T) và ngược lại. Các đoạn thể khác cũng có thể được xem là bảo thủ, tùy thuộc vào môi trường của axit amin cụ thể và vai trò của nó trong cấu trúc protein ba chiều. Ví dụ, glyxin (G) và alanin (A) có thể thường được sử dụng thay cho nhau, như alanin (A) và valin (V). Methionin (M), là tương đối kỵ nước, có thể thường thay cho leuxin và isoleuxin, và đôi khi bằng valin. Lysin (K) và arginin (R) có thể thường được sử dụng thay cho nhau ở các vị trí trong đó đặc điểm đáng kể của gốc axit amin là điện tích của nó và pK phân biệt của hai gốc axit amin này không có ý nghĩa đáng kể. Sự thay đổi khác nữa có thể được xem là “bảo thủ” ở môi trường cụ thể (xem, ví dụ Bảng 111(a) trong bản mô tả này; trang 13-15 “Biochemistry” 2nd ED. Lubert Stryer

ed (Trường đại học Stanford); Henikoff et al, PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei et al, J Biol Chem 1995 Can 19; 270(20): 11882-6). Các đoạn thể khác cũng được phép và có thể được xác định theo kinh nghiệm hoặc theo các đoạn thể bảo thủ đã biết.

Thuật ngữ “dược chất gây độc tế bào” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất có tác dụng ức chế hoặc ngăn ngừa hoạt tính biểu hiện của các tế bào, chức năng của các tế bào và/hoặc làm phá huỷ các tế bào. Thuật ngữ này được dự định để bao gồm các đồng vị phóng xạ, dược chất hóa trị liệu, và độc tố như độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố có hoạt tính enzym của vi khuẩn, nấm, có nguồn gốc thực vật hoặc động vật, bao gồm các mảnh và/hoặc các biến thể của nó. Ví dụ về dược chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở auristatin (ví dụ, auristatin E, auristatin F, MMAE và MMAF), auromycin, maytansinoid, rixin, rixin A-chain, combrestatin, duocarmycin, dolastatin, doxorubixin, daunorubicin, taxol, xisplatin, ccl065, ethidi bromua, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin, độc tố gây bệnh bạch hầu, ngoại độc tố *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrin, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, gelonin, mitogellin, retstrictocin, phenomycin, enomycin, curixin, crotin, calicheamicin, chất ức chế *Saponaria officinalis*, và glucocorticoid và dược chất hóa trị liệu khác, cũng như các đồng vị phóng xạ như At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} hoặc 213 , P^{32} , các đồng vị phóng xạ của Lu bao gồm Lu^{177} , và độc tố theo sáng chế được thể hiện là AGD-0182.

Các kháng thể, bao gồm các kháng thể theo sáng chế, cũng có thể được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào bất kỳ trong số dược chất gây độc tế bào nêu trên và cũng được tiếp hợp với enzym có hoạt tính tiền dược chất kháng bệnh ung thư có khả năng chuyển hóa tiền dược chất thành dạng hoạt tính của nó.

Thuật ngữ “kháng thể kép” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh kháng thể nhỏ có hai vị trí gắn kết với kháng nguyên, mà các mảnh này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) được nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) trong cùng một chuỗi polypeptit (V_H-V_L). Bằng cách sử dụng liên kết quá ngắn để cho phép cặp đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, các miền này phải được cặp đôi với các miền bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết với kháng nguyên. Kháng thể kép được mô tả đầy đủ hơn trong, ví dụ, EP 404,097; WO 93/11161; và Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

Thuật ngữ “làm suy yếu” liên quan đến mức độ ảnh hưởng của dược chất gắn kết FLT3 trên các tế bào biểu hiện FLT3, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc giảm về số lượng hoặc việc loại trừ các tế bào biểu hiện FLT3. Nhằm mục đích sáng chế, FLT3, a.k.a., Fms tương tự thụ thể tyrosin kinaza 3, còn gọi là Flk2 (kinaza 2 của gan trong bào thai), STK1 (tyrosin kinaza 1 của tế bào gốc) và CD135, là thành phần của tyrosin kinaza của thụ thể loại III (RTK). FLT3 người mã hóa RTK của 993 axit amin, bao gồm thụ thể gắn kết với màng có năm miền ngoại bào tương tự globulin miễn dịch và hai miền tyrosin kinaza nội bào (TKD) được liên kết bởi miền xen kinaza (Stirewalt D L et al; Nat Rev Cancer; 650-665(2003). Gen *FLT3* người (Gene ID No.: 2322 (National Center for Biotechnology Information)) được nằm ở nhiễm sắc thể 13q12 và có độ tương đồng trình tự axit amin là 85% so với FLT3 của chuột nhắt (Rosnet O et al; Gen gây bệnh ung thư 8: 173- 179 (1993). FLT3 được biểu hiện trong tủy bào khỏe mạnh và tế bào lympho tổ tiên và bởi các tế bào bạch cầu của 70-90% đối tượng bị bệnh bị AML (Carow, C.E et al; Blood 87: 1089-1096 (1996); Rosnet O et al; Leukemia 10:238-248 (1996) và cả ở bệnh ALL.

Thuật ngữ “sản phẩm gen” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ peptit/protein hoặc ARN thông tin. Ví dụ, “sản phẩm gen theo sáng chế” đôi khi được gọi trong bản mô tả này là “trình tự axit amin gây bệnh ung thư”, “protein gây bệnh ung thư”, “protein của bệnh ung thư được nêu trong bảng I”, “ARN thông tin gây bệnh ung thư”, “ARN thông tin của bệnh ung thư được nêu trong bảng I”, v. v... Theo một phương án, protein gây bệnh ung thư được mã hóa bởi axit nucleic ở Fig.1. Protein gây bệnh ung thư có thể là mảnh, hoặc theo cách khác, là protein có chiều dài đầy đủ được mã hóa bởi axit nucleic ở Fig.1. Theo một phương án, trình tự axit amin gây bệnh ung thư được sử dụng để xác định độ tương đồng hoặc tương tự về trình tự. Theo một phương án khác, các trình tự là các biến thể alen có trong tự nhiên của protein được mã hóa bởi axit nucleic ở Fig.1. Theo một phương án khác, các trình tự là các biến thể trình tự như được nêu tiếp trong bản mô tả.

Các kháng thể “tiếp hợp khác loại” là hữu ích trong các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Thuật ngữ “kháng thể tiếp hợp khác loại” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hai kháng thể được liên kết cộng hóa trị. Các kháng thể như vậy có thể được tạo ra

bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực tổng hợp hóa học protein, bao gồm sử dụng được chất tạo liên kết ngang. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,676,980.

Thuật ngữ “thể tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử có tính tương đồng với phân tử khác, bằng cách ví dụ, có trình tự của các gốc hóa học giống hoặc tương tự ở các vị trí tương ứng.

Thuật ngữ “tương đồng” hoặc “độ tương đồng trình tự” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ tương đồng giữa hai axit nucleic hoặc hai trình tự axit amin khi được sắp hàng tối ưu và được so sánh với các đoạn cài xen hoặc đoạn loại bỏ thích hợp.

“Tỷ lệ tương đồng” giữa hai trình tự là hàm số của số vị trí tương đồng cùng có mặt trong các trình tự (tức là, % tương đồng = số vị trí tương đồng / tổng số vị trí nhân 100), liên quan đến số khe, và độ dài của mỗi khe, được đưa vào để sắp hàng tối ưu hai trình tự. Việc so sánh trình tự và xác định tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán, như được mô tả dưới đây.

Tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình GAP trong gói phần mềm GCG, bằng cách sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP và trọng lượng khoảng trống là 40, 50, 60, 70, hoặc 80 và trọng lượng dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của Meyers, et al., Comput. Appi. Biosci., 4: 11-17 (1988), đã được đưa vào trong chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), sử dụng bảng gốc trọng lượng PAM120, điểm phạt chiều dài khoảng trống là 12 và điểm phạt khoảng trống là 4. Ngoài ra, tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán nêu trong Needleman, et al., J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970) được đưa vào trong chương trình GAP trong gói phần mềm GCG, sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, và trọng lượng khoảng trống là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng lượng dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Bằng cách minh họa, trình tự polynucleotit có thể là tương đồng với trình tự polynucleotit tham chiếu có độ tương đồng là 100% so với trình tự tham chiếu, hoặc nó có thể bao gồm tới số nguyên nucleotit biến đổi nhất định khi được so sánh với trình tự tham chiếu, như độ tương đồng ít nhất là 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, hoặc 99%. Sự thay đổi này được chọn từ ít nhất một đoạn loại bỏ, thể nucleotit, bao gồm đoạn đồng hoán và dị hoán, hoặc đoạn cài xen, và trong đó các biến đổi này có thể xảy ra ở vị trí tận

cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham chiếu hoặc vị trí bất kỳ nằm giữa các vị trí tận cùng đó, nằm rải rác riêng rẽ trong số các nucleotit trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề trong trình tự tham chiếu. Số lượng đoạn biến đổi nucleotit được xác định bằng cách nhân tổng số nucleotit trong trình tự polynucleotit tham chiếu như được nêu trong bản mô tả với tỷ lệ tương đồng tương ứng (đã được chia cho 100) và trừ kết quả này cho tổng số nucleotit trong trình tự polynucleotit tham chiếu, hoặc: $n_{\text{sub.n}} \cdot \frac{y}{x_{\text{sub.n}}}$, trong đó $n_{\text{sub.n}}$ là số đoạn biến đổi nucleotit, $x_{\text{sub.n}}$ là tổng số nucleotit trong trình tự polynucleotit tham chiếu như được nêu trong bản mô tả (xem axit nucleic trình tự trong “Danh mục trình tự” đối với trình tự polynucleotit tham chiếu cụ thể), và y bằng 0,50 đối với 50%, 0,60 đối với 60%, 0,70 đối với 70%, 0,75 đối với 75%, 0,80 đối với 80%, 0,85 đối với 85%, 0,90 đối với 90%, 0,95 đối với 95%, 0,98 đối với 98%, 0,99 đối với 99% hoặc 1,00 đối với 100%, là ký hiệu của toán tử nhân, và trong đó kết quả không phải số nguyên bất kỳ của $x_{\text{sub.n}}$ và y được làm tròn xuống số nguyên gần nhất trước khi trừ nó với $x_{\text{sub.n}}$.

Tương tự, trình tự polypeptit có thể là tương đồng với trình tự polypeptit tham chiếu như được nêu trong bản mô tả (xem trình tự axit amin trong “Danh mục trình tự” đối với trình tự polypeptit tham chiếu cụ thể), với độ tương đồng là 100%, hoặc nó có thể bao gồm lên tới số nguyên nhất định của đoạn biến đổi axit amin như được so sánh với trình tự tham chiếu sao cho % tương đồng nhỏ hơn 100%, như % tương đồng ít nhất là 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, hoặc 99%. Sự thay đổi này được chọn từ nhóm bao gồm ít nhất một đoạn loại bỏ, thể axit amin deletion, bao gồm đoạn thể bảo thủ và không bảo thủ, hoặc đoạn cài xen, và trong đó các biến đổi này có thể xảy ra ở vị trí tận cùng amino hoặc carboxy của trình tự polypeptit tham chiếu hoặc vị trí bất kỳ nằm giữa các vị trí tận cùng đó, được nằm rải rác riêng rẽ trong số cá axit amin trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liên kề trong trình tự tham chiếu. Số lượng đoạn axit amin biến đổi đối với % tương đồng nhất định được xác định bằng cách nhân tổng số axit amin trong trình tự polypeptit được mã hóa bởi trình tự polypeptit tham chiếu với số tỷ lệ tương đồng tương ứng (đã được chia cho 100) và sau đó lấy kết quả này trừ cho tổng số axit amin này trong trình tự polypeptit tham chiếu như được nêu trong bản mô tả (xem, ví dụ SEQ ID NO.1-21), hoặc: $n_{\text{sub.a}} \cdot \frac{y}{x_{\text{sub.a}}}$, trong đó $n_{\text{sub.a}}$ là số đoạn axit amin biến đổi, $x_{\text{sub.a}}$ là tổng số axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, và y bằng 0,50 đối với 50%, 0,60 đối với 60%, 0,70 đối với 70%, 0,75 đối với 75%, 0,80 đối

với 80%, 0,85 đối với 85%, 0,90 đối với 90%, 0,95 đối với 95%, 0,98 đối với 98%, 0,99 đối với 99%, hoặc 1,00 đối với 100%, là ký hiệu của toán tử nhân, và trong đó kết quả không phải số nguyên bất kỳ của $x \cdot \text{sub.a}$ và y được làm tròn xuống số nguyên gần nhất trước khi trừ nó cho $x \cdot \text{sub.a}$.

Tỷ lệ tương đồng có thể được xác định theo độ dài của trình tự. Như được xác định thuật ngữ “lớn hơn 75% tương đồng” bao gồm lớn hơn 75%, 80%, 85%, 95% và 99% tương đồng cũng như toàn bộ trị số riêng rẽ, và khoảng phụ riêng rẽ, cùng với khoảng này.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là “kháng thể của người”. Thuật ngữ “kháng thể của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể trong đó về cơ bản toàn bộ trình tự của chuỗi nhẹ và trình tự của chuỗi nặng, bao gồm vùng xác định bổ sung (CDR), là từ gen người. Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bởi kỹ thuật trioma, kỹ thuật tế bào B của người (xem, ví dụ, Kozbor, et al, Immunol. Today 4: 72 (1983), kỹ thuật biến nạp EBV (xem, ví dụ, Cole et al. Monoclonal antibodies and cancer therapy 77-96 (1985)), hoặc sử dụng kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn (xem, ví dụ, Marks et al, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)). Theo phương án cụ thể, kháng thể của người được tạo ra trong chuột chuyển gen. Kỹ thuật tạo ra các kháng thể của người một phần hoặc đầy đủ như vậy đã biết trong lĩnh vực này và kỹ thuật bất kỳ như vậy có thể được sử dụng. Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, trình tự của kháng thể hoàn toàn của người được tạo ra trong chuột chuyển gen được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để biểu hiện gen kháng thể của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người. Việc mô tả cụ thể để chuẩn bị chuột nhất chuyển gen sản sinh các kháng thể của người được tìm thấy đơn số WO 02/43478 và Patent Mỹ số 6,657,103 (Abgenix) và con cháu của nó. Các tế bào B từ chuột nhất chuyển gen sản sinh kháng thể mong muốn sau đó có thể được ngưng tụ để tạo ra dòng tế bào lai để sản sinh liên tục kháng thể. Xem, ví dụ, các Patent Mỹ số 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; và 5,545,806; và Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42 (1998); Green, et al, J. Exp. Med. 188:483-95 (1998).

Thuật ngữ “kháng thể được làm giống như kháng thể của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các dạng kháng thể chứa trình tự từ kháng thể không phải của người (ví dụ, loài gặm nhấm) cũng như các kháng thể của người. Các kháng thể như vậy

là kháng thể khảm chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Nói chung, kháng thể được làm giống như kháng thể của người bao gồm về cơ bản là toàn bộ trong số ít nhất một, và thông thường hai, miền biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ vòng siêu biến tương ứng với miền của globulin miễn dịch không phải của người và toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ vùng FR là vùng của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm giống như kháng thể của người thường cũng bao gồm ít nhất một phần vùng hằng định của globulin miễn dịch (Fc), thường của globulin miễn dịch của người. Xem ví dụ, patent Mỹ số Cabilly 4,816,567; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; and antibody engineering: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press 1996).

Thuật ngữ “ức chế” hoặc “sự ức chế” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là sự giảm lượng đo được, hoặc để ngăn ngừa hoàn toàn.

Thuật ngữ “phân lập” hoặc “tinh khiết về mặt sinh học” để chỉ nguyên liệu về cơ bản là hoặc về cơ bản không chứa các thành phần thường đi cùng nguyên liệu như được tìm thấy ở trạng thái tự nhiên của nó. Do đó, peptit phân lập theo sáng chế tốt hơn là không chứa các nguyên liệu thường đi cùng với peptit trong môi trường tại chỗ của chúng. Ví dụ, polynucleotit được gọi là “phân lập” khi nó về cơ bản được tách khỏi polynucleotit tạp tương ứng hoặc bổ sung với các gen không phải là gen FLT3 hoặc mã hóa polypeptit không phải sản phẩm gen FLT3 hoặc các mảnh của nó. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể dùng phương pháp phân lập axit nucleic một cách dễ dàng để thu được polynucleotit FLT3 phân lập. Protein được gọi là “phân lập”, ví dụ, khi các phương pháp vật lý, cơ học hoặc phương pháp hóa học được sử dụng để loại bỏ các protein FLT3 ra khỏi thành phần tế bào thường được liên kết với protein. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể dùng các phương pháp tinh chế tiêu chuẩn một cách dễ dàng để thu được protein FLT3 phân lập. Theo cách khác, protein phân lập có thể được tạo ra bằng cách phương pháp hóa học.

“Nhãn” thích hợp bao gồm nuclid phóng xạ, enzym, chất, đồng yếu tố, chất ức chế, gốc phát huỳnh quang, gốc phát huỳnh quang hóa học, hạt từ tính, và chất tương tự. Các patent bộc lộ việc sử dụng các nhãn này bao gồm các Patent Mỹ số 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; và 4,366,241. Ngoài ra, các kháng thể theo

sáng chế có thể là hữu ích làm thành phần gắn kết với kháng nguyên của thể flo. Xem ví dụ, Zeytun et al., Nat. Biotechnol. 21 : 1473-79 (2003).

Thuật ngữ “động vật có vú” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sinh vật bất kỳ được phân loại thành động vật có vú, bao gồm chuột nhắt, chuột, thỏ, chó, mèo, bò, ngựa và người. Theo một phương án theo sáng chế, động vật có vú là chuột nhắt. Theo một phương án khác của sáng chế, động vật có vú là người.

Thuật ngữ “bệnh ung thư di căn” và “bệnh di căn” có nghĩa là bệnh ung thư đã lan tràn đến các u bạch huyết tại chỗ hoặc tới vị trí xa hơn, và bao gồm bệnh ở giai đoạn D theo hệ thống AUA và giai đoạn TxNxM+ theo hệ thống TNM.

Thuật ngữ “được cải biến”, như được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ sự có mặt của các thay đổi về axit amin tự nhiên, axit amin không có trong tự nhiên, polypeptit của axit amin tự nhiên hoặc polypeptit của axit amin không có trong tự nhiên. Các thay đổi, hoặc cải biến như vậy, có thể thu được bằng cách cải biến tổng hợp sau của axit amin tự nhiên, axit amin không có trong tự nhiên, polypeptit của axit amin tự nhiên hoặc polypeptit của axit amin không có trong tự nhiên, hoặc bằng cách dịch mã đồng thời, hoặc bằng cách cải biến sau dịch mã axit amin tự nhiên, axit amin không có trong tự nhiên, polypeptit của axit amin tự nhiên hoặc polypeptit của axit amin không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ “chất điều hòa” hoặc “hợp chất thử nghiệm” hoặc “dược chất chọn lọc” hoặc dạng tương đương về ngữ pháp như được sử dụng trong bản mô tả này mô tả phân tử bất kỳ, ví dụ, protein, oligopeptit, phân tử hữu cơ nhỏ, polysacarit, polynucleotit, v. v..., cần được thử nghiệm để thay đổi trực tiếp hoặc gián tiếp phenotip bệnh ung thư hoặc sự biểu hiện của trình tự bệnh ung thư, ví dụ, trình tự axit nucleic hoặc protein, hoặc tác dụng của trình tự bệnh ung thư (ví dụ, sự dẫn truyền, sự biểu hiện gen, quá trình tương tác protein, v. v.). Theo một khía cạnh, chất điều hòa sẽ trung hòa tác dụng của protein gây bệnh ung thư theo sáng chế. “Trung hòa” có nghĩa là hoạt tính của protein bị ức chế hoặc phong bế, cùng với tác dụng tác dụng tiếp theo trên tế bào. Theo một khía cạnh khác, chất điều hòa sẽ trung hòa tác dụng của gen, và protein tương ứng của nó, theo sáng chế bằng cách chuẩn hóa nồng độ protein này. Theo các phương án được ưu tiên, các chất điều hòa thay đổi profin biểu hiện, hoặc profin biểu hiện của axit nucleic hoặc protein theo sáng chế, hoặc con đường tác động ngược chiều. Theo một phương án, chất điều hòa

kìm hãm phenotip bệnh ung thư, ví dụ, thành dấu tay mô khỏe mạnh. Theo một phương án khác, chất điều hòa cảm ứng phenotip bệnh ung thư. Nói chung, nhiều hỗn hợp thử nghiệm được thực hiện song song với các nồng độ dược chất khác nhau để thu được đáp ứng khác nhau với các nồng độ khác nhau. Thông thường, một trong số các nồng độ này đóng vai trò là nồng độ đối chứng âm, nghĩa là, ở nồng độ 0 hoặc dưới mức phát hiện.

Các chất điều hòa, dược chất chọn lọc, hoặc hợp chất thử nghiệm bao gồm nhiều nhóm hóa học, mặc dù thông thường chúng là các phân tử hữu cơ, tốt hơn là hợp chất hữu cơ nhỏ có phân tử lượng lớn hơn 100 và nhỏ hơn khoảng 2.500 Dalton. Tốt hơn, nếu phân tử nhỏ nhỏ hơn 2000, hoặc nhỏ hơn 1500 hoặc nhỏ hơn 1000 hoặc nhỏ hơn 500 D. Các dược chất chọn lọc bao gồm các nhóm chức cần thiết cho sự tương tác cấu trúc với các protein, đặc biệt là gốc liên kết hydro, và thông thường bao gồm ít nhất nhóm amin, carbonyl, hydroxyl hoặc carboxyl, tốt hơn là ít nhất hai trong số nhóm chức hóa học. Các dược chất chọn lọc thường bao gồm cấu trúc cacbon vòng hoặc dị vòng và/hoặc thơm hoặc cấu trúc đa vòng thơm được thể bằng một hoặc nhiều nhóm chức nêu trên. Các chất điều hòa cũng bao gồm các phân tử sinh học như peptit, sacarit, axit béo, xteroid, purin, pyrimidin, các dẫn xuất, các chất tương tự về cấu trúc hoặc dạng kết hợp của nó. Đặc biệt được ưu tiên là các peptit. Một nhóm chất điều hòa là peptit, ví dụ là khoảng từ năm đến 35 axit amin, khoảng từ năm đến 20 axit amin được ưu tiên, và khoảng từ 7 đến 15 đặc biệt được ưu tiên. Tốt hơn, nếu protein điều hòa bệnh ung thư hòa tan được, bao gồm vùng không xuyên màng, và/hoặc, có Xys tận cùng N để hỗ trợ quá trình hòa tan. Theo một phương án, đầu tận cùng C của mảnh này được giữ ở dạng axit tự do và đầu tận cùng N là amin tự do để hỗ trợ quá trình ghép cặp, nghĩa là, với xystein. Theo một phương án, protein gây bệnh ung thư theo sáng chế được tiếp hợp với dược chất tạo miễn dịch như được nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án, protein gây bệnh ung thư được tiếp hợp với BSA. Peptit theo sáng chế, ví dụ, có chiều dài được ưu tiên, có thể được liên kết với nhau hoặc với axit amin khác để tạo ra peptit/protein dài hơn. Các peptit điều hòa có thể tiêu được protein có trong tự nhiên như được nêu trên, peptit ngẫu nhiên, hoặc peptit ngẫu nhiên “không đối xứng”. Theo một phương án được ưu tiên, các chất điều hòa trên cơ sở peptit/protein là các kháng thể, và các mảnh của nó, như được xác định trong bản mô tả này.

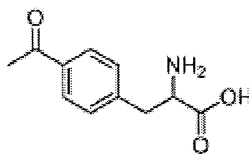
Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản là đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng rẽ chứa quần thể tương đồng ngoại trừ các đột biến có trong tự nhiên có thể có mặt với lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng này có tính đặc hiệu cao, trực tiếp kháng một epitop kháng nguyên. Trái lại, chế phẩm kháng thể (đa dòng) thông thường thường bao gồm vô số kháng thể hướng trực tiếp tới (hoặc đặc hiệu với) các epitop khác nhau. Theo một phương án, kháng thể đa dòng chứa nhiều kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu epitop, ái lực hoặc ái lực khác nhau trong một kháng nguyên chứa nhiều epitop kháng nguyên. Chất cải biến “đơn dòng” chỉ ra đặc điểm của kháng thể như thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản là đồng nhất, và không được coi là yêu cầu sản sinh kháng thể theo phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng đã sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bởi phương pháp lai đã được mô tả trước tiên bởi Kohler et al, *Nature* 256: 495 (1975), hoặc có thể tạo ra bởi phương pháp ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567). “Các kháng thể đơn dòng” cũng có thể được tách ra từ thư viện kháng thể thực khuẩn bằng cách sử dụng kỹ thuật được mô tả trong Clackson et al, *Nature* 352: 624-628 (1991) và Marks et al, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), chẳng hạn. Các kháng thể này đơn dòng thường gắn kết với ít nhất Kd khoảng 1 μ M, phổ biến hơn là ít nhất khoảng 300 nM, thông thường ít nhất khoảng 30 nM, tốt hơn là ít nhất khoảng 10 nM, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 3 nM hoặc lớn hơn, thường được xác định bởi ELISA.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản là đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng rẽ chứa quần thể tương đồng ngoại trừ các đột biến có trong tự nhiên có thể có mặt với lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, hướng trực tiếp tới một epitop kháng nguyên. Trái lại, chế phẩm kháng thể (đa dòng) thông thường thường bao gồm vô số kháng thể hướng trực tiếp tới (hoặc đặc hiệu với) các epitop khác nhau. Theo một phương án, kháng thể đa dòng chứa nhiều kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu epitop, ái lực hoặc ái lực khác nhau với một kháng nguyên chứa nhiều epitop kháng nguyên. Chất cải biến “đơn dòng” thể hiện đặc điểm của kháng thể như thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản là đồng nhất, và không được coi là cần thiết cho việc sản sinh kháng thể theo phương pháp cụ thể. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng cần dùng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp lai trước tiên được mô tả bởi Kohler et al, *Nature* 256: 495 (1975), hoặc có thể được tạo ra bằng phương pháp ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, patent

Mỹ số 4,816,567). “Các kháng thể đơn dòng” cũng có thể được tách ra từ thư viện kháng thể thực khuẩn bằng cách sử dụng kỹ thuật được mô tả trong Clackson et al, Nature 352: 624-628 (1991) và Marks et al, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), chẳng hạn. Các kháng thể này đơn dòng thường gắn kết với ít nhất Kd khoảng 1 μ M, phổ biến hơn ít nhất khoảng 300 nM, thông thường ít nhất khoảng 30 nM, tốt hơn là ít nhất khoảng 10 nM, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 3 nM hoặc cao hơn, thường được xác định bằng ELISA.

Thuật ngữ “axit amin không có trong tự nhiên” hoặc “nnAA” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit amin không là một trong số hai mươi (20) axit amin hoặc pyrrolysine hoặc selenocysteine thông thường. Thuật ngữ khác có thể được sử dụng đồng nghĩa với thuật ngữ nnAA là “axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên”, “axit amin không xuất hiện trong tự nhiên”, “axit amin không có trong tự nhiên”. Ngoài ra, thuật ngữ nnAA bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin không xuất hiện trong tự nhiên và có thể thu được bằng cách tổng hợp hoặc có thể thu được bằng cách cải biến axit amin không có trong tự nhiên. Ví dụ, nhằm mục đích sáng chế này, *para*-axetylphenylalanine được coi là nnAA.

Thuật ngữ “*para*-axetylphenylalanine” hoặc “pAF” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit 3-(4-axetylphenyl)-2-aminopropanoic được biểu thị bằng cấu trúc hóa học sau:



Thuật ngữ “tá dược được dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ nguyên liệu như chất bổ trợ, chất mang, chất điều chỉnh độ pH và chất đệm, chất điều chỉnh độ đẳng trương, chất gây ẩm, chất bảo quản, và chất tương tự.

Thuật ngữ “được dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ không độc, trơ, và/hoặc chế phẩm tương hợp về mặt sinh lý với người hoặc động vật có vú khác.

Thuật ngữ “polynucleotide” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng polyme của nucleotide có ít nhất 10 bazơ hoặc cặp bazơ, ribonucleotide hoặc deoxynucleotide hoặc dạng cải biến của loại nucleotide, và bao gồm dạng sợi đơn và sợi kép của ADN và/hoặc ARN. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, thuật ngữ này thường được sử dụng thay cho

“oligonucleotit”. Polynucleotit có thể bao gồm trình tự nucleotit theo sáng chế trong đó thymidin (T), như được thể hiện để minh họa ở Fig.1, cũng có thể là uraxil (U); định nghĩa này chỉ ra sự khác nhau giữa cấu trúc hóa học của ADN và ARN, cụ thể nhận thấy rằng một trong bốn bazơ chính trong ARN là uraxil (U) thay vì thymidin (T).

Thuật ngữ “polypeptit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyme có ít nhất khoảng 4, 5, 6, 7, hoặc 8 axit amin. Trong bản mô tả, ký hiệu của ba chữ cái tiêu chuẩn (Xem, Bảng III) hoặc một chữ cái đối với axit amin được sử dụng. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, thuật ngữ này thường được sử dụng thay cho “peptit” hoặc “protein”.

Thuật ngữ “phân tử AND” hoặc “ARN tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử ADN hoặc ARN được thao tác *in vitro*.

Thuật ngữ kháng thể “Fv chuỗi đơn” hoặc “scFv” hoặc “chuỗi đơn” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh kháng thể chứa miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong một chuỗi polypeptit. Nói chung, polypeptit Fv còn bao gồm liên kết polypeptit giữa các miền V_H và V_L cho phép scFv tạo ra cấu trúc mong muốn đối với kháng nguyên gắn kết. Đối với scFv, xem Pluckthun, PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg và Moore eds. Springer- Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Thuật ngữ “đặc hiệu”, “gắn kết đặc hiệu” và “gắn kết một cách đặc hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khả năng gắn kết chọn lọc của kháng thể với epitop kháng nguyên đích. Các kháng thể này có thể được thử nghiệm về tính đặc hiệu gắn kết bằng cách so sánh khả năng gắn kết với kháng nguyên thích hợp với khả năng gắn kết với kháng nguyên hoặc hỗn hợp kháng nguyên không thích hợp trong tổ hợp các điều kiện nhất định. Nếu kháng thể gắn kết với kháng nguyên thích hợp lớn hơn ít nhất 2, 5, 7, và tốt hơn là 10 lần so với kháng nguyên hoặc hỗn hợp kháng nguyên không thích hợp, thì được xem là đặc hiệu. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu là kháng thể chỉ gắn kết với kháng nguyên FLT3, nhưng không gắn kết với kháng nguyên không thích hợp. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu là kháng thể gắn kết với kháng nguyên FLT3 của người nhưng không gắn kết với kháng nguyên FLT3 không phải của người với độ tương đồng axit amin là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn so với kháng nguyên FLT3. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu là kháng thể gắn kết với kháng nguyên FLT3 người nhưng không gắn

kết với kháng nguyên FLT3 không phải của người với tỷ lệ tương đồng là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn so với trình tự axit amin của kháng nguyên FLT3. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu là kháng thể gắn kết với FLT3 người kháng nguyên và gắn kết với kháng nguyên FLT3 của loài gặm nhấm, nhưng với mức độ gắn kết với kháng nguyên người cao hơn. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu là kháng thể gắn kết với kháng nguyên FLT3 người và gắn kết với kháng nguyên FLT3 của loài linh trưởng, nhưng với mức độ gắn kết với kháng nguyên của người cao hơn. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu gắn kết với FLT3 người kháng nguyên và kháng nguyên FLT3 không phải của người bất kỳ, nhưng với mức độ gắn kết với kháng nguyên của người cao hơn hoặc dạng kết hợp của nó.

Thuật ngữ “đề điều trị” hoặc “điều trị” và thuật ngữ liên quan về mặt ngữ pháp, được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự cải tiến bất kỳ của hậu quả gây bệnh bất kỳ, như khả năng sống sót kéo dài, giảm nhẹ bệnh tình, và/hoặc giảm nhẹ các tác dụng phụ là sản phẩm phụ của cách thức điều trị khác; như được hiểu dễ dàng trong lĩnh vực kỹ thuật này, việc tiêu diệt hoàn toàn bệnh được ưu tiên cho dù không yêu cầu hành động điều trị.

Thuật ngữ “biến thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử có sự biến đổi so với loại hoặc dạng đã được mô tả, như protein có một hoặc nhiều gốc axit amin khác nhau ở các vị trí tương ứng của protein được mô tả cụ thể (ví dụ, protein FLT3 được thể hiện trên Fig.1.) Chất tương tự là ví dụ về biến thể protein. Các dạng đồng phân nổi và dạng đa hình đơn nucleotit (single nucleotide polymorphism - SNP) là các ví dụ khác về các biến thể.

“Protein FLT3” và/hoặc “protein liên quan đến FLT3” theo sáng chế bao gồm các protein được xác định cụ thể trong bản mô tả này (xem, Fig.1), cũng như các biến thể alen, các biến thể thể bảo thủ, các chất tương tự và tương đồng có thể được phân lập/tạo ra và được mô tả đặc điểm mà không được thử nghiệm bất thường theo các phương pháp đã nêu trong bản mô tả này hoặc sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này. Protein dung hợp kết hợp các phần khác nhau các protein FLT3 hoặc các mảnh của nó, cũng như protein dung hợp của protein FLT3 và polypeptit khác loại cũng được bao gồm. Các protein FLT3 như vậy thường được gọi là protein liên quan đến FLT3, các protein theo sáng chế, hoặc FLT3. Thuật ngữ “protein liên quan đến FLT3” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ

mảnh polypeptit hoặc trình tự protein FLT3 có 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, hoặc nhiều hơn 25 axit amin; hoặc, ít nhất 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 991, 992, hoặc 993 hoặc nhiều axit amin.

II.) Kháng thể FLT3

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với FLT3 -protein liên quan (Xem Fig.1). Theo một phương án, kháng thể gắn kết với protein liên quan đến FLT3 là kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein FLT3 chứa trình tự axit amin của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.: 2. Kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein FLT3 chứa trình tự axit amin của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.: 2 bao gồm các kháng thể có thể gắn kết với protein liên quan đến FLT3 khác. Ví dụ, các kháng thể gắn kết với protein FLT3 chứa trình tự axit amin của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.: 2 có thể gắn kết với protein liên quan đến FLT3 như các biến thể FLT3 và chất tương đồng hoặc các chất tương tự của nó.

Kháng thể FLT3 theo sáng chế đặc biệt là hữu ích trong bệnh ung thư (xem, ví dụ, Bảng I), đối với thử nghiệm tiên lượng, chụp, các phương pháp chẩn đoán, và điều trị. Theo một phương án, nó là thử nghiệm gắn kết FLT3 theo sáng chế dùng để phát hiện bệnh ung thư, ví dụ, trong thử nghiệm miễn dịch. Tương tự, các kháng thể như vậy là hữu ích (ví dụ, khi kết hợp với dược chất điều trị bệnh, trong ADC, trong điều trị, và/hoặc tiên lượng bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (“AML”) và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL), và bệnh ung thư khác, ở một mức độ nhất định mà FLT3 cũng được biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức trong các bệnh ung thư khác này. Hơn nữa, kháng thể biểu hiện nội bào (ví dụ, kháng thể chuỗi đơn) là hữu ích trong điều trị bệnh ung thư trong đó sự biểu hiện FLT3 được bao gồm, như bệnh ung thư AML hoặc ALL nặng hoặc di căn hoặc khác bệnh ung thư nặng hoặc di căn.

Các phương pháp khác nhau để sản xuất kháng thể, đặc biệt là các kháng thể đơn dòng, là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các kháng thể này có thể được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch động vật có vú chủ thích hợp bằng cách sử dụng protein liên quan đến

FLT3, peptit, hoặc mảnh, ở dạng phân lập hoặc được tiếp hợp miễn dịch (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, và Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Ngoài ra, protein dung hợp của FLT3 cũng có thể được sử dụng, như protein dung hợp GST của FLT3. Theo phương án cụ thể, protein dung hợp GST chứa toàn bộ hoặc hầu hết trình tự axit amin của Fig.1 được sản sinh, và sau đó được sử dụng làm chất gây miễn dịch để tạo ra các kháng thể. thích hợp Theo một phương án khác, protein liên quan đến FLT3 được tổng hợp và được sử dụng làm chất gây miễn dịch.

Ngoài ra, kỹ thuật gây miễn dịch ADN trần là đã biết trong lĩnh vực này được sử dụng (có hoặc không có protein liên quan đến FLT3 được tinh chế hoặc tế bào biểu hiện FLT3) để tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với chất gây miễn dịch mã hóa (tổng quan, xem Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

Trình tự axit amin của protein FLT3 như được thể hiện ở Fig.1 có thể được phân tích để chọn lọc vùng đặc hiệu của protein FLT3 để tạo ra các kháng thể. Ví dụ, phân tích kỵ nước và ưa nước của trình tự axit amin FLT3 được sử dụng để xác định vùng ưa nước trong cấu trúc FLT3. Vùng protein FLT3 có cấu trúc kháng nguyên, cũng như các vùng và miền khác, có thể được xác định dễ dàng bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, như phân tích Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz hoặc Jameson-Wolf. Profin ưa nước có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp của Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828. Profin thủy liệu pháp có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp của Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132. Tỷ lệ phần trăm (%) của profin gốc có thể thu được có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp của Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Profin mềm dẻo trung bình có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp của Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Profin quay beta có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp của Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294. Do đó, mỗi vùng xác định bởi chương trình bất kỳ trong số các chương trình hoặc phương pháp này là nằm trong phạm vi của sáng chế. Các phương pháp được ưu tiên để sản xuất kháng thể FLT3 còn được minh họa bằng cách ví dụ như được nêu trong bản mô tả này. Các phương pháp tạo ra protein hoặc polypeptit để dùng

làm chất gây miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực này. Đã biết trong lĩnh vực này are các phương pháp để tạo ra thể tiếp hợp kháng nguyên của protein với chất mang, như BSA, KLH hoặc protein mang khác. Trong một số trường hợp, việc tạo tiếp hợp trực tiếp sử dụng, ví dụ, các chất phản ứng carbodiimide được sử dụng; trong các trường hợp khác chất phản ứng liên kết như các chất được cung cấp bởi Pierce Chemical Co., Rockford, IL, là hữu hiệu. Việc sử dụng chất gây miễn dịch FLT3 thường được thực hiện bằng cách tiêm trong thời gian thích hợp và cùng với việc sử dụng chất bổ trợ thích hợp, như được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong phác đồ tạo miễn dịch, việc chuẩn độ kháng thể có thể được thực hiện để xác định sự phù hợp của việc sản xuất kháng thể.

Kháng thể FLT3 đơn dòng có thể được sản sinh bởi các cách khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các dòng tế bào bất động tiết kháng thể mong muốn đơn dòng được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật lai tiêu chuẩn của Kohler và Milstein hoặc cải biến làm bất động tế bào B sản sinh kháng thể, như đã biết theo cách thông thường. Các dòng tế bào bất động tiết các kháng thể mong muốn được sàng lọc bởi thử nghiệm miễn dịch trong đó kháng nguyên là protein liên quan đến FLT3. Khi môi trường nuôi cấy tế bào bất động thích hợp được xác định, thì các tế bào có thể được lan rộng và các kháng thể được sản sinh từ môi trường nuôi cấy in vitro hoặc từ dịch cổ trướng.

Các kháng thể hoặc các mảnh theo sáng chế cũng có thể được sản sinh bởi các kỹ thuật tái tổ hợp. Vùng gắn kết đặc hiệu với vùng mong muốn của protein FLT3 cũng có thể được sản sinh trong kháng thể khảm hoặc được ghép với vùng xác định bổ sung (CDR) có nguồn gốc từ nhiều loài. Kháng thể được làm giống như kháng thể của người hoặc kháng thể của người FLT3 cũng có thể được sản sinh, và được ưu tiên để dùng trong điều trị. Các phương pháp được làm giống như người của kháng thể của loài gặm nhấm và kháng thể không phải của người khác, bằng cách thế một hoặc nhiều CDR của kháng thể không phải của người đối với trình tự của kháng thể của người tương ứng, là đã biết (xem ví dụ, Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen et al, 1988, Science 239: 1534-1536). Ngoài ra, xem Carter et al, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 và Sims et al, 1993, J. Immunol. 151: 2296.

Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt VelocImmune mà trình tự của bộ gen mang các đoạn biến đổi nội sinh của chuột nhắt ở locus của chuỗi nặng của globulin

miễn dịch (các đoạn VH, DH, và JH) và/hoặc chuỗi nhẹ kappa (VK và JK) được thay thế, toàn bộ hoặc một phần, bằng trình tự của bộ gen của người mang các đoạn biến đổi của dòng phôi không được sắp hàng của locus của chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người (VH, DH, và JH) và/hoặc chuỗi nhẹ kappa (VK và JK) (Regeneron, Tarrytown, NY). Xem, ví dụ, Các patent Mỹ số 6,586,251, 6,596,541, 7,105,348, 6,528,313, 6,638,768, và 6,528,314.

Ngoài ra, các kháng thể của người theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt HuMAb (Medarex, Inc.) chứa locus nhỏ của gen globulin miễn dịch của người mã hóa trình tự globulin miễn dịch của chuỗi nặng không được sắp hàng (mu và gamma) và chuỗi nhẹ kappa của người, cùng với các thể đột biến bất hoạt locus của chuỗi mu và kappa nội sinh (xem ví dụ, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859).

Theo một phương án khác, các kháng thể hoàn toàn của người theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt mang globulin miễn dịch của người trình tự trên các gen chuyển và nhiễm sắc thể chuyển, như chuột nhắt mang gen chuyển của chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nhẹ của người. Chuột nhắt như vậy, được gọi trong bản mô tả này là “chuột nhắt KM”, chuột nhắt như vậy được mô tả trong Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 và Công bố đơn PCT số WO 02/43478 của Tomizuka, et al.

Các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn để sàng lọc thư viện gen của globulin miễn dịch của người. Phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn như vậy để phân lập các kháng thể của người được thiết lập trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem ví dụ: Patent Mỹ số 5,223,409; 5,403,484; và 5,571,698 của Ladner et al.; Patent Mỹ số 5,427,908 và 5,580,717 của Dower et al.; Patent Mỹ số 5,969,108 và 6,172,197 của McCafferty et al.; và Patent Mỹ số 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081 của Griffiths et al.

Các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt SCID mà các tế bào miễn dịch của người được tái sinh sao cho đáp ứng kháng thể của người có thể được tạo ra trong quá trình tạo miễn dịch. Chuột nhắt như vậy được mô tả trong, ví dụ, Patent Mỹ số 5,476,996 và 5,698,767 của Wilson, et al.

Ngoài ra, các kháng thể của người theo sáng chế có thể được tạo ra bằng kỹ thuật sử dụng chuột nhắt chuyển gen, được bất hoạt để sản sinh kháng thể, được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền với locus của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được gọi là XenoMouse (Amgen Fremont, Inc., trước đây là Abgenix, Inc.). Việc mô tả cụ thể về quá trình tạo ra chuột nhắt chuyển gen sản sinh các kháng thể của người có thể được tìm thấy trong U.S. 6,657,103. Xem, Ngoài ra, các Patent Mỹ số 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; và 5,545,806; và Mendez, et. al. *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1998); Kellerman, S.A. & Green, L.L., *Curr. Opin. Biotechnol* 13, 593-597 (2002).

Phương pháp bất kỳ trong số phương pháp sản xuất nêu trên để tạo ra các kháng thể có khả năng gắn kết với FLT3 nhất định, hoặc trình tự tương đồng hoặc các mảnh hoặc trình tự polypeptit có độ tương đồng trình tự là 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 9, 98, hoặc 99% so với FLT3. Ái lực gắn kết (K_D) của các kháng thể, các mảnh gắn kết của nó, và thể tiếp hợp kháng thể được chất chứa cùng FLT3 có thể là 1 mM hoặc nhỏ hơn, 100 nM hoặc nhỏ hơn, 10 nM hoặc nhỏ hơn, 2 nM hoặc nhỏ hơn hoặc 1 nM hoặc nhỏ hơn. Theo cách khác, K_D có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 10 nM; hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 2 nM. K_D có thể nằm trong khoảng từ 1 micromol đến 500 micromol hoặc nằm trong khoảng từ 500 micromol đến 1 nM.

Ái lực gắn kết của protein gắn kết với kháng nguyên được xác định bởi hằng số liên kết (K_a) và hằng số phân ly (K_d) ($K_D = K_d/K_a$). Ái lực gắn kết có thể được đo bằng BIACORE ví dụ, bằng cách bắt giữ kháng thể thử nghiệm trên bề mặt nhạy được bao protein A và FLT3 cho chảy trên bề mặt này. Theo cách khác, ái lực gắn kết có thể được đo bằng FORTEBIO ví dụ, với thụ thể kháng thể thử nghiệm được bắt giữ trên kim tiêm được phủ protein-A và FLT3 cho chảy trên bề mặt này. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định các thử nghiệm thích hợp khác đã biết trong lĩnh vực này Để đo ái lực gắn kết.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu”, như được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến khả năng gắn kết với kháng nguyên, các protein có nghĩa là protein gắn kết với kháng nguyên có thể gắn kết với FLT3 cũng như miền riêng biệt, hoặc trình tự axit amin riêng biệt, trong FLT3 không gắn kết đặc hiệu hoặc gắn kết không đặc hiệu với các protein khác (ví dụ, protein không liên quan). Thuật ngữ này, tuy nhiên, không loại trừ thực tế rằng các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết của nó cũng có thể được phản ứng chéo với

các phân tử liên quan mật thiết. Các kháng thể và các mảnh của nó cũng như thể tiếp hợp kháng thể được chất chứa các kháng thể này được nêu trong bản mô tả có thể gắn kết đặc hiệu với FLT3, với ái lực hơn hơn ít nhất 2, 5, 10, 50, 100, hoặc 1000 lần so với ái lực mà chúng được gắn kết với các phân tử liên quan mật thiết.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đơn dòng của FLT3 theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được gọi là CHv62.21 được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được nộp lưu với số hiệu lưu giữ của Trung tâm thu giữ môi trường nuôi cấy Hoa Kỳ (the American Type Culture Collection - ATCC): PTA-121831 (Xem, Fig.3A và/hoặc Fig.3B), hoặc các vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin đồng nhất với trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của CHv62.21, và trong đó các kháng thể này vẫn có đặc tính chức năng mong muốn của kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế. Vùng biến đổi chuỗi nặng của CHv62.21 được cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (E) đến gốc thứ 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của CHv62.21 được cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (D) đến gốc thứ 108 (R) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10. CDRI-3 (Kabat) của vùng biến đổi chuỗi nặng của CHv62.21 được cấu thành từ trình tự axit amin lần lượt nằm trong khoảng từ 31 đến 35, nằm trong khoảng từ 50 đến 65, và nằm trong khoảng từ 95 đến 102 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, và CDRI-3 (Kabat hoặc Chothia) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của CHv62.21 được cấu thành từ trình tự axit amin lần lượt nằm trong khoảng từ 24 đến 34, nằm trong khoảng từ 50 đến 56, và nằm trong khoảng từ 89 đến 97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 (Xem, Fig. 4 và Bảng V). Đối với vùng hằng định của kháng thể theo sáng chế, phân nhóm vùng hằng định bất kỳ có thể được chọn. Theo một phương án, vùng hằng định IgG1 của người là vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định kappa Ig của người là vùng ổn định chuỗi nhẹ có thể được sử dụng.

Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc kháng nguyên gắn kết phân của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 80% so với vùng biến đổi trình tự của chuỗi nặng axit amin được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B; và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 80% so với vùng biến đổi chuỗi nhẹ trình tự axit amin được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B.

Theo các phương án khác, trình tự axit amin của V_H và/hoặc V_L có độ tương đồng là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự V_H và V_L được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit hoặc axit nucleic mã hóa a hoặc b, hoặc trình tự của V_H hoặc V_L được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B, cũng như polynucleotit hoặc axit nucleic có tỷ lệ phần trăm tương đồng là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với các trình tự này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc kháng nguyên gắn kết phần của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người, trong đó:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vùng xác định bổ sung (CDRs) có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng CDR được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B;

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR được thể hiện trên Fig.3A và/hoặc Fig.3B.

Các kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền theo sáng chế bao gồm các kháng thể trong đó việc cải biến được thực hiện với các gốc khung nằm trong V_H và/hoặc V_L (ví dụ, để cải thiện các đặc tính của kháng thể). Thông thường, việc cải biến khung như vậy được tạo ra để làm giảm tính kháng nguyên kháng thể. Ví dụ, một phương pháp là tạo “đột biến ngược” một hoặc nhiều gốc khung với trình tự dòng phôi tương ứng. Đặc biệt hơn, kháng thể đã tạo đột biến soma có thể chứa các gốc khung khác so với trình tự dòng phôi thu được từ kháng thể này. Các gốc như vậy có thể được xác định bằng cách so sánh trình tự khung của kháng thể với trình tự dòng phôi thu được từ kháng thể. Để đưa trình tự vùng khung vào cấu hình dòng phôi của chúng, các đột biến soma có thể là “đột biến ngược” với trình tự dòng phôi bằng cách, ví dụ, tạo đột biến vị trí hoặc tạo đột biến qua trung gian PCR (ví dụ, “đột biến ngược” từ leuxin đến methionin). Các kháng thể “đột biến ngược” như vậy cũng được dự định để bao gồm trong sáng chế.

Loại cải biến khung khác liên quan đến việc đột biến một hoặc nhiều gốc trong vùng khung, hoặc ngay cả trong một hoặc nhiều vùng CDR, để loại bỏ epitop tế bào T từ đó làm giảm tính gây miễn dịch của kháng thể. Phương pháp này cũng được gọi là “khử miễn dịch” và được mô tả trong chi tiết hơn trong Công bố đơn patent Mỹ số 2003/0153043 của Carr, et al.

Ngoài ra hoặc cách cải biến khác tạo ra trong vùng khung hoặc vùng CDR, các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền bao gồm việc cải biến trong vùng Fc, thông thường để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể, như thời gian bán thải của huyết thanh, cố định bổ sung, gắn kết thụ thể Fc, và/hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Hơn thế nữa, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế có thể được cải biến hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc được cải biến để làm thay đổi quá trình glycosyl hoá của nó, để thay đổi tiếp một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể đơn dòng. Mỗi phương án trong số các phương án này được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 được cải biến sao cho số gốc xystein trong vùng bản lề được thay đổi, ví dụ, được tăng lên hoặc giảm xuống. Phương pháp này được mô tả tiếp trong patent Mỹ số 5,677,425 của Bodmer, et al. Số gốc xystein ở vùng bản lề CH1 được thay đổi để, ví dụ, thuận tiện cho việc lắp ráp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để làm tăng hoặc làm giảm độ ổn định của kháng thể đơn dòng FLT3.

Theo một phương án khác, vùng bản lề Fc của kháng thể được biến đổi để làm giảm thời gian bán thải sinh học của kháng thể đơn dòng FLT3. Đặc biệt hơn, một hoặc nhiều thể đột biến axit amin được đưa vào vùng bề mặt chung của miền CH2-CH3 của mảnh Fc-bản lề sao cho kháng thể này có khả năng gắn kết với protein Staphylococcal A (SpA) yếu hơn so với khả năng gắn kết SpA của miền Fc-bản lề tự nhiên. Phương pháp này được mô tả trong chi tiết hơn trong patent Mỹ số 6,165,745 của Ward, et al.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng FLT3 được cải biến để làm tăng thời gian bán thải sinh học của nó. Các phương pháp khác nhau có thể được đưa ra. Ví dụ, các thể đột biến có thể được đưa vào như được mô tả trong patent Mỹ số 6,277,375 của Ward. Theo cách khác, để làm tăng thời gian bán thải sinh học, kháng thể này có thể được biến đổi trong vùng CH1 hoặc CL vùng để chứa epitop gắn kết thụ thể dự phòng

thu được từ hai vòng của miền CH2 của vùng Fc của IgG, như được mô tả trong Patent Mỹ số 5,869,046 và 6,121,022 của Presta et al.

Theo các phương án khác, vùng Fc được biến đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng gốc axit amin khác để biến đổi chức năng tác động của kháng thể đơn dòng FLT3. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc đặc hiệu axit amin có thể được thay bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể này có ái lực biến đổi đối với phối tử tác động nhưng vẫn giữ được khả năng gắn kết với kháng nguyên của kháng thể bố mẹ. Phối tử tác động mà ái lực được biến đổi có thể là, ví dụ, thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương pháp này được mô tả trong chi tiết hơn trong Patent Mỹ số 5,624,821 và 5,648,260, cả hai patent này đều của Winter, et al.

Theo một phương án khác, chuỗi nặng được biến đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng axit amin không có trong tự nhiên nhờ kỹ thuật ReCODE được phát triển bởi Ambrx (La Jolla, CA). Một ví dụ về axit amin không có trong tự nhiên là para-axetylphenylalanin.

Khả năng phản ứng của kháng thể FLT3 với protein liên quan đến FLT3 có thể được thiết lập theo nhiều đã biết, bao gồm kỹ thuật thấm Tây, kết tủa miễn dịch, ELISA, và phân tích FACS bằng cách sử dụng, nếu thích hợp, protein liên quan đến FLT3, các tế bào biểu hiện FLT3 hoặc các phần chiết của nó. Kháng thể FLT3 hoặc mảnh của nó có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc được tiếp hợp với phân tử thứ hai. Các chất đánh dấu có thể phát hiện được thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đồng vị phóng xạ, hợp chất phát huỳnh quang, hợp chất phát quang sinh học, hợp chất phát quang hóa học, chất càn hóa kim loại hoặc enzym. Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép đặc hiệu với hai hoặc nhiều epitop FLT3 được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Kháng thể dimer cùng loại cũng có thể được tạo ra bởi kỹ thuật liên kết ngang đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565).

Theo một phương án khác nữa, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế là kháng thể chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có ký hiệu CHv62.21. Chuỗi nặng của CHv62.21 được cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (E) đến gốc thứ 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nhẹ của CHv62.21 được cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (D) đến gốc thứ

214 (C) của trình tự SEQ ID NO.10. Trình tự của các chuỗi này được thể hiện trên Fig.2A và/hoặc Fig.2B và Fig.3A và/hoặc Fig.3B. Theo một phương án được ưu tiên, CHv62.21 được cải biến bằng axit amin không có trong tự nhiên (“nnAA”) và được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào. Theo một phương án, nnAA là pAF. Theo một phương án được ưu tiên, dược chất gây độc tế bào được tạo tiếp hợp đặc hiệu ở nnAA.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế được sản xuất bởi phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ để biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, trong đó tế bào vật chủ này được chọn từ nhóm bao gồm các tế bào vật chủ (a) đến (c) sau:

(a) tế bào vật chủ được chuyển nhiễm với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

(b) tế bào vật chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 SEQ ID NO.10; và

(c) tế bào vật chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và tế bào vật chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế được sản xuất bởi phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào vật chủ để biểu hiện kháng thể, trong đó tế bào vật chủ được chọn từ nhóm bao gồm các tế bào vật chủ (a) đến (c) sau:

(a) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

(b) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10; và

(c) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO) sản sinh kháng thể có ký hiệu CHv62.21 được gửi (qua Federal Express) tới ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 vào ngày 09 tháng 12 năm 2014 và được ký gửi với tên truy cập PTA-121831.

Theo cách khác, hoặc ngoài ra, theo một phương án khác theo sáng chế, kháng thể đơn dòng gắn kết với FLT3, trong trường hợp này, kháng thể đơn dòng CHv62.21 có thể cải biến sau dịch mã như đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về các cải biến sau dịch mã bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cải biến hóa học, như liên kết disulfur, oligosacarit, tạo ra pyroglutamat có đầu tận cùng N, xử lý lysin có đầu tận cùng C, khử amin, oxy hóa, oxy hóa, glycosyl hóa không enzym, phân cắt liên kết peptit, liên kết ngang không khử, loại bỏ và các cải biến khác đã biết trong lĩnh vực này. Xem, Liu, et. al., Heterogeneity of Monoclonal Antibodies, J. Pharma. Sci. vol. 97, no. 7, pp. 2426-2447 (July 2008). Các loại cải biến khác bao gồm tương tác không cộng hóa trị, không đồng nhất cấu dạng, và kết tụ.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 bao vòng việc tạo vòng glutamat chuỗi nặng có đầu tận cùng N ở gốc 1 đến Pyro-Glutamat. Người có trình độ

trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu và biết được rằng việc tạo vòng như vậy xảy ra một cách tự động. Xem, Dick, et. al, Determination of the Origin of the N-Terminal Pyro-Glutamate Variation in Monoclonal Antibodies Model Peptides, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 97, no. 3, pp 544-553 (June 15, 2007).

Ngoài ra hoặc theo cách khác, axit amin của kháng thể đơn dòng CHv62.21 có thể cải biến tiếp sau dịch mã bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khử amin, oxy hóa, glycosyl hóa không enzym, và/hoặc oxy hóa. Các polypeptit theo sáng chế, hoặc các mảnh của nó, có thể cải biến sau dịch mã bổ sung, bao gồm glycosyl hoá, ví dụ, các vị trí glycosyl hoá được liên kết N hoặc được liên kết O là đã biết trong lĩnh vực này. Như được mô tả trên đây, các thay đổi có thể được tạo ra trong trình tự axit amin của polypeptit hoặc các điều kiện xử lý (như thay đổi môi trường nuôi cấy, tinh chế, và/hoặc điều kiện bảo quản) để loại trừ hoặc làm giảm đến mức tối thiểu sự thay đổi này, hoặc để tạo điều kiện thuận lợi cho chúng trong các trường hợp trong đó quá trình xử lý là thích hợp. Hơn nữa, các chế phẩm này có thể chứa polypeptit có nồng độ thay đổi của nhiều hơn một loại cải biến liên quan đến việc xử lý, ví dụ, polypeptit có thể có một số, hầu hết, hoặc về cơ bản là toàn bộ lysin có đầu tận cùng C được loại bỏ và/hoặc một số, hầu hết, hoặc về cơ bản là toàn bộ axit amin có đầu tận cùng N được chuyển hóa thành axit pyroglutamic (ví dụ, các polypeptit được thể hiện trên Fig.2A và/hoặc Fig.2B hoặc Fig.3A và/hoặc Fig.3B hoặc trong trình tự liên ứng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên). Các điều kiện xử lý như thay đổi thành phần chất đệm và nhiệt độ có thể có tác dụng đáng kể ở phạm vi cải biến này.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa đoạn loại bỏ của lysin trong chuỗi nặng có đầu tận cùng C ở gốc 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa các đoạn glycosyl hoá bổ sung với chuỗi nặng Asparagin ở gốc 303 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, GO (Asialo-, agalacto, N-glycan loại phức chất có râu kép được afucosyl hóa; G0F (Asialo-, agalacto, N-glycan loại phức chất có râu kép được fucosyl hóa lõi); Mannoza-5 (OligoMannoza-5 được liên kết N); G1F (Asialo-, monogalacto, N-glycan loại phức chất có râu kép được fucosyl hóa lõi); G2 (Asialo-, bigalacto, N-glycan loại phức chất có râu kép được afucosyl hóa); G2F (Asialo-, bigalacto, N-glycan loại phức chất có râu kép

được fucosyl hóa lõi); A1 (oligosacarit được liên kết N có râu kép, được monosialyl hóa, axit Neu5); và/hoặc A2 (oligosacarit được liên kết N có râu kép, được disialyl hóa, axit Neu5).

Ngoài ra, hoặc theo cách khác theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa glycosyl hóa không enzyme bổ sung với một hoặc nhiều gốc serin của chuỗi nhẹ. Nói chung, glycosyl hóa không enzym tạo ra từ phản ứng không enzym giữa đường khử và amin bậc một có đầu tận cùng N hoặc nhóm amin của chuỗi bên lysin. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu và biết được rằng quá trình glycosyl hóa không enzym có thể có thể che chắn điện tích dương trên nhóm axit amin bậc một có đầu tận cùng N hoặc chuỗi bên của gốc lysin, có thể sản xuất kháng thể có tính axit hơn.

Trình tự axit amin của các polypeptit theo sáng chế có thể được kiểm tra bởi nhiều bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, khối phổ) và có thể là tương đồng với các trình tự theo sáng chế (Xem, Fig.2A và/hoặc Fig.2B và Fig.3A và/hoặc Fig.3B) hoặc có thể khác so với các trình tự đó ở một hoặc nhiều gốc axit amin do quá trình cải biến sau dịch mã. Bằng ví dụ không giới hạn, trên toàn bộ hoặc một phần polypeptit về cơ bản là đồng nhất, axit amin có đầu tận cùng C từ chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng có thể được loại bỏ, bằng cách phân giải protein hoặc quy trình khác xảy ra trong quá trình nuôi cấy. Tương tự, axit amin có đầu tận cùng N có thể không có mặt, ví dụ, một (1), hai (2), ba (3), bốn (4), hoặc năm (5) axit amin có đầu tận cùng N có thể không có mặt.

Theo một phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng CHv62.21 được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic.

Theo một phương án khác, chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng CHv62.21 được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó

gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ, và trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là hỗn hợp đã được tạo ra bằng cách tái tổ hợp chứa các protein thu được bằng cách biểu hiện ở tế bào vật chủ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 là hỗn hợp đã được tạo ra bằng cách tái tổ hợp chứa các protein thu được bằng cách biểu hiện ở tế bào vật chủ, trong đó chuỗi nặng của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ, và trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó E thứ nhất được cải biến thành pyro-glutamat và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự

như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó E thứ nhất được cải biến thành pyro-glutamat và gốc K thứ 453 có đầu tận cùng C được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc K thứ 453 có đầu tận cùng C được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án ưu tiên hơn nữa là theo sáng chế, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế, và đặc biệt, kháng thể đơn dòng được ký hiệu CHv62.21 được cải biến bằng axit amin không có trong tự nhiên (“nAA”) ở chuỗi nặng. Theo một phương án được ưu tiên, bộ ba mã hóa amber được nằm ở vị trí axit amin 124 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 đối với đoạn cài xen của nAA được ký hiệu là *para*-axetylphenylalanin (Fig.3C). CHv62.21 được cải biến được ký hiệu là CHv62.21pAF nhằm mục đích của sáng chế này.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, CHv62.21pAF bao gồm vùng sau:

Vùng biến đổi chuỗi nặng được cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (E) đến gốc thứ 123 (S) gốc của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (D) đến gốc thứ 108 (R) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10. CDR1-3 (Kabat) của vùng biến đổi chuỗi nặng được cấu thành từ trình tự axit amin lần lượt nằm trong khoảng từ 31-35, từ 50-65, và từ 95- 102 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11, và CDR1-3 (Kabat hoặc Chothia) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được cấu thành từ trình tự axit amin lần lượt nằm trong khoảng từ 24-34, từ 50-56, và từ 89-97 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 (Xem, Fig.3B, Fig.3C và Bảng V).

Chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (E) đến gốc thứ 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 với mAA của *para*-axetylphenylalanin được cài xen vào ở gốc 124 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nhẹ của CHv62.21 cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc thứ nhất (D) đến gốc thứ 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10. Các trình tự của chúng được thể hiện trên Fig.2B và/hoặc 2C và Fig.3B và/hoặc 3C. Theo một phương án được ưu tiên, CHv62.21pAF được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế được sản xuất bởi phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm việc nuôi cấy tế bào vật chủ để biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, trong đó tế bào vật chủ này được chọn từ nhóm bao gồm các tế bào vật chủ từ (a) đến (c) sau:

(a) tế bào vật chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

(b) tế bào vật chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 SEQ ID NO.10; và

(c) tế bào vật chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và tế bào vật chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, FLT3 theo sáng chế được sản xuất bởi phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào vật chủ để biểu hiện kháng thể, trong đó tế bào vật chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vật chủ (a) đến (c) sau:

(a) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

(b) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10; và

(c) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế được sản xuất bởi phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào vật chủ để biểu hiện kháng thể, trong đó tế bào vật chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào vật chủ (a) đến (d) sau:

(a) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

(b) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ

nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

(c) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10; và

(d) tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit chứa trình tự cơ bản mã hóa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất to G thứ 452 SEQ ID NO.11 trong đó E thứ nhất được cải biến thành pyroglutamat và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic.

Theo một phương án khác, chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ, và trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là hỗn hợp đã được tạo ra bằng cách tái tổ hợp chứa các protein thu

được bằng cách biểu hiện ở tế bào vật chủ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và trình tự gốc axit amin 1 (E) đến gốc 123 (S) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF là hỗn hợp đã được tạo ra bằng cách tái tổ hợp chứa các protein thu được bằng cách biểu hiện ở tế bào vật chủ, trong đó chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic, trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ, và trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó E thứ nhất được cải biến thành pyro-glutamat và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó E thứ nhất được cải biến thành pyro-glutamat và gốc K thứ 453 có đầu tận cùng C được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc K thứ 453 có đầu tận cùng C được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) sản sinh kháng thể có ký hiệu CHv62.21pAF được gửi (thông qua Federal Express) đến ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 vào ngày 09 tháng 12 năm 2014 và được ký gửi với tên truy cập PTA-121836.

III.) Thể tiếp hợp kháng thể được chất

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể được chất (ADC), chứa kháng thể được tiếp hợp với dược chất điều trị bệnh. Dược chất điều trị bệnh này có thể là dược chất gây độc tế bào, chất kìm hãm tế bào, dược chất hóa trị liệu, dược chất, chất ức chế sự phát triển, độc tố (ví dụ, độc tố có hoạt tính enzym của vi khuẩn, nấm, có nguồn gốc thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của nó), hoặc đồng vị phóng xạ (tức là, thể tiếp hợp phóng xạ). Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn mô tả các phương pháp sử dụng ADC. Theo một khía cạnh, ADC chứa kháng thể đơn dòng bất kỳ trong số MAb FLT3 cộng hóa trị được gắn vào hoặc có thể được gắn kết qua liên kết oxim với dược chất gây độc tế bào hoặc dược chất có thể phát hiện được.

Việc sử dụng thể tiếp hợp kháng thể được chất để phân phối tại chỗ dược chất gây độc tế bào hoặc chất kìm hãm tế bào, tức là dược chất để tiêu diệt hoặc ức chế tế bào khối u để điều trị bệnh ung thư (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz và Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; Patent Mỹ 4,975,278) để phân phối hướng đích gốc dược chất tới khối u, và tích lũy nội bào trên đó, trong đó việc sử dụng toàn thân các dược chất dược chất không được tiếp hợp có thể tạo ra nồng độ độc tính không được chấp nhận với các tế bào bình thường cũng như tế bào khối u cần loại bỏ (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Từ đó, thu được hiệu quả tối đa với độc tính tối thiểu. Cả kháng thể đa dòng lẫn các kháng thể đơn dòng được thông báo là hữu ích trong các chiến lược này

(Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Dược chất được sử dụng trong các phương pháp này bao gồm daunomycin, doxorubixin, methotrexate, và vindesine (Rowland et al., (1986) nêu trên). Độc tố được sử dụng trong thể tiếp hợp kháng thể-độc tố bao gồm độc tố vi khuẩn như độc tố gây bệnh bạch hầu, thực vật độc tố như rixin, độc tố phân tử nhỏ như geldanamycin (Mandler et al (2000) *Jour, of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573- 1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maytansinoids (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), và calicheamicin (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Các độc tố có thể ảnh hưởng tác dụng gây độc tế bào và kìm hãm tế bào của chúng theo các cơ chế bao gồm gắn kết tubulin, gắn kết ADN, hoặc ức chế topoisomeraza. Một số dược chất gây độc tế bào có xu hướng bất hoạt hoặc có hoạt tính yếu hơn khi được tiếp hợp với các kháng thể hoặc phối tử thụ thể protein lớn hơn.

Ví dụ về thể tiếp hợp kháng thể dược chất là, ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) là thể tiếp hợp kháng thể- đồng vị phóng xạ được cấu thành từ kháng thể đơn dòng IgG1 kappa của loài gặm nhấm hướng trực tiếp với kháng nguyên CD20 được tìm thấy trên bề mặt của tế bào lympho B bình thường và ác tính và đồng vị phóng xạ ^{111}In hoặc ^{90}Y đã được gắn kết bởi chất cang hóa liên kết thioure (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69).

Ngoài ra, MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), thể tiếp hợp kháng thể dược chất được cấu thành từ kháng thể hu CD33 đã được liên kết với calicheamicin, được phê chuẩn năm 2000 để điều trị bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính bằng cách tiêm (*Drug of the Future* (2000) 25(7):686; Patent Mỹ Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001).

Ngoài ra, FLT3 kháng người được đánh giá trước đó là chất điều trị bệnh tiềm năng đối với bệnh bạch cầu tủy bào. Ví dụ, IMC-EB 10, kháng thể kháng FLT3 được phát triển bởi Imclone. Kháng thể này là chất phong bế phối tử ức chế quá trình hoạt hóa qua trung gian FLT3 của kinaza ngược chiều (MAPK, Akt và Stat5). Kháng thể này cũng ức chế quá trình tăng sinh của các tế bào bạch cầu in vitro; và đã biết là tác động thông

qua độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC). EB 10 làm kéo dài khả năng sống sót của mô dị ghép của bệnh bạch cầu khi được điều trị riêng rẽ và kết hợp với methotrexate (Xem, WO2009/155015 và US2011/0008355). Kháng thể này cũng được đánh giá trong thử nghiệm lâm sàng của người (NCT00887926), nhưng bị dừng lại do không có hiệu quả. Xem Ngoài ra, EB 10 được tiếp hợp với MMAF được phát triển bởi ImClone (Xem, Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 46, 2005).

Đã biết trong lĩnh vực này rằng kháng thể chủ vận được phát triển kháng lại FLT3 có thể tăng cường quá trình tăng sinh và/quá trình biệt hóa của tế bào máu gốc. (Xem, WO 95/27062)

Ngoài lĩnh vực sinh học, nhiều chất ức chế phân tử nhỏ được phát triển và được thử nghiệm trong thử nghiệm lâm sàng của người. Hầu hết trong số các chất ức chế hướng đích FLT3 và các kinaza khác không đặc hiệu với chính FLT3 kinaza. Trong hầu hết các trường hợp, các chất ức chế này kháng FLT3-ITD và có thể kháng FLT-TKD. Do đó, không có chất nào kháng FLT3 kiểu hoang riêng rẽ. Đã biết rằng chất ức chế phân tử nhỏ được thực hiện thử nghiệm lâm sàng của người là:

Midostaurin hoặc PKC-412 (Novartis), Quizartinib hoặc AC220 (Ambit), Nexavar (Onyx/Bayer), AZD1152 hoặc Barasertib (Astrazeneca), Crenolinib (Arog), Plexxicon (Daichii Sankyo), và ASP2215 (Astellas). Nói chung, hầu hết các thử nghiệm lâm sàng của người vẫn được thực hiện. Trong hầu hết các trường hợp, lượng giảm tiểu cầu, giảm bạch cầu, bệnh thiếu máu được coi là các tác dụng phụ.

Ngoài ra, Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), thể tiếp hợp kháng thể được chất bao gồm kháng thể huC242 được liên kết thông qua gốc liên kết disulfua SPP với gốc được chất maytansinoid, DM1, được đưa vào thử nghiệm pha II để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CanAg, như ruột kết, tụy, dạ dày, và bệnh khác.

Ngoài ra, MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), thể tiếp hợp kháng thể được chất bao gồm kháng thể đơn dòng của kháng nguyên mang đặc hiệu kháng tuyến tiền liệt (PSMA) được liên kết với gốc được chất maytansinoid, DM1, được phát triển để điều trị khối u tuyến tiền liệt.

Cuối cùng, peptit auristatin, auristatin E (AE) và monomethylauristatin (MMAE), các chất tổng hợp tương tự của dolastatin, được tiếp hợp với kháng thể khảm đơn dòng

cBR96 (đặc hiệu với Lewis Y đối với caxinom) và cAC10 (đặc hiệu với CD30 đối với bệnh máu ác tính) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784).

MAB CD30 được tiếp hợp với MMAE hiện đang có bán trên thị trường dưới tên ADCETRIS (Seattle Genetics, Bothell, WA). ADCETRIS (brentuximab vedotin) là thể tiếp hợp kháng thể được chất kháng CD-30 được cấu thành từ ba hợp phần: 1) kháng thể khâm IgG1 được ký hiệu là cAC10, đặc hiệu với người CD30, 2) được chất phá vỡ vi ống MMAE, và 3) liên kết phân cắt proteaza gắn kết cộng hóa trị MMAE với caC10. Xem, ADCENTRIS đưa ra thông tin.

Ngoài ra, các dược chất điều trị bệnh bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở dược chất hóa trị liệu thích hợp trong việc tạo ra ADC được nêu trong bản mô tả. Độc tố có hoạt tính enzym và các mảnh của nó có thể được sử dụng bao gồm chuỗi A gây bệnh bạch hầu, mảnh có hoạt tính gắn kết của độc tố gây bệnh bạch hầu, chuỗi A chứa ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A của rixin, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, protein Aleurites fordii, protein dianthin, protein Phytolaca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crocin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, và tricothecene. Xem, ví dụ, WO 93/21232 được công bố ngày 28 tháng 10 năm 1993. Nhiều nuclit phóng xạ có sẵn trên thị trường để sản xuất các kháng thể được tiếp hợp phóng xạ. Ví dụ bao gồm ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , và ^{186}Re . Thể tiếp hợp của kháng thể và dược chất gây độc tế bào được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều dược chất ghép cặp protein hai chức như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionat (SPDP), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este của hoạt tính (như disuccinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazo (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diizoxyanat (như toluen 2,6-diizoxyanat), và hợp chất flo có hoạt tính bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được tạo ra như được mô tả trong Vitetta et al (1987) Science, 238: 1098. Axit l-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminepentaxetic được đánh dấu cabon-14 (MX-DTPA) là chất cang hóa cụ thể để tạo tiếp hợp của nucleotit phóng xạ với kháng thể (WO94/11026).

Thể tiếp hợp của kháng thể và một hoặc nhiều độc tố phân tử nhỏ, như acalicheamicin, maytansinoid, dolastatin, auristatin, trichothecene, và CC1065, và các dẫn xuất của các độc tố này có hoạt tính độc tố, cũng được dự định trong bản mô tả này.

III(A). Maytansinoid

Các hợp chất maytansine thích hợp để dùng làm gốc được chất maytansinoid đã biết trong lĩnh vực này, và có thể được tách ra từ các nguồn tự nhiên theo các phương pháp đã biết, được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp kỹ thuật di truyền (xem Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973), hoặc các chất tương tự maytansinol và maytansinol được tạo ra bằng cách tổng hợp theo các phương pháp đã biết.

Gốc được chất maytansinoid cụ thể bao gồm các gốc có nhân thom được cải biến, như: C-19-declo (US 4256746) (được tạo ra bằng cách khử lithi nhôm hydrua ansamytocin P2); C-20-hydroxy (hoặc C-20-demetyl) +/-C-19-declo (Patent Mỹ số 4,361,650 và 4,307,016) (được tạo ra bằng cách khử metyl có sử dụng Streptomyces hoặc Actinomyces hoặc khử clo hóa sử dụng LAH); và C-20-demetoxy, C-20-axyloxy (-OCOR), +/-declo (patent Mỹ số 4,294,757) (được tạo ra bằng cách axyl hóa sử dụng axyl clorua), và các gốc này có các cải biến ở các vị trí khác.

Gốc được chất maytansinoid cụ thể cũng bao gồm các gốc có cải biến như: C-9-SH (US 4,424,219) (được tạo ra bằng cách cho maytansinol phản ứng với H₂S hoặc P₂S₅); C-14-alkoxymetyl(demetoxy/CH₂ OR)(US 4331598); C-14-hydroxymetyl hoặc axyloxymetyl (CH₂OH hoặc CH₂OAc) (US 4450254) (được tạo ra từ Nocardia); C-15-hydroxy/axyloxy (US 4,364,866) (được tạo ra bằng cách chuyển hóa hợp chất maytansinol bởi Streptomyces); C-15-metoxy (Patent Mỹ số 4,313,946 và 4,315,929) (được tách ra từ Trewia nudiflora); C-18-N-demetyl (Patent Mỹ số 4,362,663 và 4,322,348) (được tạo ra bằng cách khử metyl của maytansinol bởi Streptomyces); và 4,5-deoxy (US 4,371,533) (được tạo ra bằng cách khử titan trichlorua/LAH của maytansinol).

ADC chứa maytansinoid, các phương pháp tạo ra chúng, và việc sử dụng chúng trong điều trị được mô tả, ví dụ, trong các Patent Mỹ số 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 và Patent Châu Âu EP 0 425 235 B1, nội dung của chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) mô tả ADC chứa maytansinoid được ký hiệu là DM1 được liên kết với kháng thể đơn dòng C242 hướng trực tiếp với bệnh ung thư ruột kết của người. Nhận thấy rằng thể tiếp hợp này có

hoạt tính gây độc tế bào mạnh kháng các tế bào bệnh ung thư ruột kết đã được nuôi cấy, và có hoạt tính kháng khối u trong thử nghiệm phát triển khối u in vivo. Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) mô tả ADC trong đó maytansinoid được tạo tiếp hợp thông qua gốc liên kết disulfua với kháng thể của loài gặm nhấm A7 gắn kết với kháng nguyên trên dòng tế bào bệnh ung thư ruột kết của người, hoặc với kháng thể đơn dòng của loài gặm nhấm khác TA.1 gắn kết với gen gây bệnh ung thư HER-2/neu. Độc tính tế bào của thể tiếp hợp TA.1-maytansinoid được thử nghiệm in vitro trên dòng tế bào bệnh ung thư vú của người SK-BR-3, biểu hiện 3×10^5 HER-2 các kháng nguyên bề mặt/tế bào. Thể tiếp hợp được chất có mức độ gây độc tế bào tương tự như được chất maytansinoid tự do, có thể được tăng lên bằng cách làm tăng số lượng phân tử maytansinoid/phân tử kháng thể. Thể tiếp hợp A7-maytansinoid có hoạt tính gây độc tế bào toàn thân thấp ở chuột nhắt.

III(B). Auristatin và dolastatin

Theo một số phương án, ADC chứa kháng thể theo sáng chế được tiếp hợp với dolastatin hoặc các chất tương tự và các dẫn xuất của dolostatin peptit, auristatin (Patent Mỹ số 5,635,483; 5,780,588). Nhận thấy rằng dolastatin và auristatin gây ảnh hưởng tới động lực học vi ống, thủy phân GTP, và phân chia nhân và tế bào (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) và có hoạt tính kháng bệnh ung thư (US 5,663,149) và hoạt tính kháng nấm (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Gốc được chất dolastatin hoặc auristatin có thể được gắn với kháng thể thông qua đầu tận cùng N (amino) hoặc C (carboxyl) của gốc được chất peptit (WO 02/088172).

Các phương án về auristatin cụ thể bao gồm các gốc được chất monomethylauristatin được liên kết với đầu tận cùng N là DE và DF, được bộc lộ trong "Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004 và được mô tả trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0238649, nội dung của nó được kết hợp hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Thông thường, các gốc được chất trên cơ sở peptit có thể được tạo ra bằng cách tạo liên kết peptit giữa hai hoặc nhiều axit amin và/hoặc mảnh peptit. Các liên kết peptit như vậy có thể được tạo ra, ví dụ, theo phương pháp tổng hợp pha lỏng (xem E. Schroder

and K. Liibke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) đã biết trong lĩnh vực hoá học peptit. Các gốc được chất auristatin/dolastatin có thể được tạo ra theo các phương pháp của: US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; và Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784.

III(C). Calicheamicin

Theo các phương án khác, ADC chứa kháng thể theo sáng chế được tiếp hợp với một hoặc nhiều phân tử calicheamicin. Họ calicheamicin là chất kháng sinh có khả năng tạo ra AND sợi kép bị phá hủy ở nồng độ dưới picomol. Để tạo ra thể tiếp hợp của họ calicheamicin, xem các Patent Mỹ 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (toàn bộ các patent này của American Cyanamid Company). Các chất tương tự về cấu trúc của calicheamicin có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl- γ_1^I , PSAG và θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) và các Patent Mỹ nêu trên là của American Cyanamid). Dược chất kháng khối u khác mà kháng thể có thể được tiếp hợp là QFA là chất kháng folat. Cả calicheamicin và QFA có vị trí tác động nội bào và không qua được màng huyết tương một cách dễ dàng. Do đó, mức độ hấp thụ tế bào của các dược chất này thông qua kháng thể qua trung gian tương tác nội phân tử làm tăng mạnh tác dụng gây độc tế bào của chúng.

III(D). Dược chất gây độc tế bào khác

Các dược chất kháng khối u khác có thể được tiếp hợp với các kháng thể theo sáng chế bao gồm BCNU, streptozocin, vincristine và 5-flouraxil, họ các dược chất này thường được gọi là phức chất LL-E33288 được mô tả trong các Patent Mỹ 5,053,394, 5,770,710, cũng như esperamicin (Patent Mỹ 5,877,296).

Độc tố có hoạt tính enzym và các mảnh của nó có thể được sử dụng bao gồm chuỗi A gây bệnh bạch hầu, mảnh có hoạt tính gắn kết của độc tố gây bệnh bạch hầu, chuỗi A chứa ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A của rixin, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, Protein Aleurites fordii, protein dianthin, protein Phytolacca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin,

crotin, chất ức chế saponaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin và tricothecene. Xem, ví dụ, WO 93/21232 (công bố ngày 28 tháng 10 năm 1993).

Sáng chế cũng đề cập đến ADC được tạo ra giữa kháng thể và hợp chất có hoạt tính phân giải nucleic (ví dụ, ribonucleaza hoặc ADN endonucleaza như deoxyribonucleaza; DNaza).

Để phá huỷ chọn lọc khối u, kháng thể có thể chứa nguyên tử phóng xạ mạnh. Nhiều đồng vị phóng xạ có sẵn trên thị trường để sản xuất các kháng thể được tiếp hợp phóng xạ. Ví dụ bao gồm At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} và các đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp này được sử dụng để phát hiện, thì nó có thể chứa nguyên tử phóng xạ để nghiên cứu lấp lánh đồ, ví dụ $\text{tc}^{99\text{m}}$ hoặc I^{123} , hoặc nhãn quay để chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn gọi là chụp cộng hưởng từ, mri), như iot-123 tiếp, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Trình tự đánh dấu phóng xạ hoặc trình tự đánh dấu khác có thể được đưa vào thể tiếp hợp theo các cách đã biết. Ví dụ, peptit có thể được sinh tổng hợp hoặc có thể được tổng hợp bằng cách tổng hợp hóa học axit amin sử dụng các tiền chất axit amin thích hợp bao gồm, ví dụ, flo-19 thay vào chỗ hydro. Các nhãn như $\text{tc}^{99\text{m}}$ hoặc I^{123} , Re^{186} , Re^{188} và In^{111} có thể được liên kết qua gốc xystein ở peptit. Yttri-90 có thể được liên kết qua gốc lysin. Phương pháp IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 có thể được sử dụng để đưa iot-123 vào. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) mô tả chi tiết các phương pháp khác.

IV.) Các hợp chất thể tiếp hợp kháng thể được chất gắn kết với FLT3

Sáng chế đề cập đến, không kể những cái khác, các hợp chất thể tiếp hợp kháng thể được chất để phân phối hướng đích các dược chất điều trị bệnh. Tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng các hợp chất thể tiếp hợp kháng thể được chất có hoạt tính gây độc tế bào và/hoặc kìm hãm tế bào tiềm năng kháng lại các tế bào biểu hiện FLT3.

Các thể tiếp hợp kháng thể được chất như vậy không phong bế khả năng gắn kết của FL với FLT3, sao cho FL có thể truyền tín hiệu thông qua FLT3 ngay cả khi kháng

thể này được gắn kết. Các kháng thể như vậy có hoạt tính gây độc tế bào không bị giảm sút khi có mặt FL (trong đó thể tiếp hợp kháng thể được chất kháng FLT3 lại phong bế FL gắn kết với FLT3 có độc hoạt tính gây độc tế bào giảm khi có mặt FL. Theo các phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp được chất kháng FLT3 được nêu trong bản mô tả về cơ bản là không ức chế gắn kết FL với FLT3.

Các hợp chất thể tiếp hợp kháng thể được chất bao gồm đơn vị kháng thể được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một đơn vị dược chất. Đơn vị dược chất có thể được liên kết cộng hóa trị trực tiếp với đơn vị kháng thể hoặc thông qua đơn vị liên kết (-LU-).

Theo một số phương án, hợp chất thể tiếp hợp kháng thể được chất có công thức sau:



hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó; trong đó:

L là đơn vị kháng thể, ví dụ, kháng thể đơn dòng FLT3 theo sáng chế, như CHv62.21 hoặc CHv62.21pAF, và

(LU-D) là gốc đơn vị liên kết-đơn vị dược chất, trong đó:

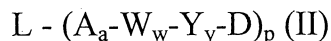
LU- là đơn vị liên kết, và

-D là đơn vị dược chất có hoạt tính kìm hãm tế bào hoặc gây độc tế bào kháng lại tế bào đích; và

p nằm trong khoảng từ 1 đến 20.

Theo một số phương án, p nằm trong khoảng từ 1 đến 10, nằm trong khoảng từ 1 đến 9, nằm trong khoảng từ 1 đến 8, nằm trong khoảng từ 1 đến 7, nằm trong khoảng từ 1 đến 6, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 2. Theo một số phương án, p nằm trong khoảng từ 2 đến 10, nằm trong khoảng từ 2 đến 9, nằm trong khoảng từ 2 đến 8, nằm trong khoảng từ 2 đến 7, nằm trong khoảng từ 2 đến 6, nằm trong khoảng từ 2 đến 5, nằm trong khoảng từ 2 đến 4 hoặc 2 đến 3. Theo các phương án khác, p bằng 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6. Theo một số phương án, p bằng 2 hoặc 4. Theo một số phương án, p là số nguyên. Theo các phương án khác, p được đo bằng tỷ lệ của dược chất trung bình và kháng thể và có thể là số nguyên hoặc không phải số nguyên.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp kháng thể được chất hợp chất có công thức sau:



hoặc muối được dung hoặc solvat của nó, trong đó:

L là đơn vị kháng thể, ví dụ, kháng thể đơn dòng FLT3, như CHv62.21 hoặc CHv62.21pAF; và $-A_a - W_w - Y_y -$ là đơn vị liên kết (LU), trong đó:

$-A-$ là đơn vị kéo dài,

a bằng 0 hoặc 1 hoặc 2 hoặc 3,

mỗi $-W-$ độc lập là đơn vị axit amin,

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

$-Y-$ là đơn vị đệm tự tiêu diệt,

y bằng 0, 1 hoặc 2;

$-D$ là đơn vị được chất có hoạt tính kìm hãm tế bào hoặc gây độc tế bào kháng lại tế bào đích; và

p là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20.

Theo một số phương án, a bằng 0 hoặc 1, w bằng 0 hoặc 1, và y bằng 0, 1 hoặc 2. Theo một số phương án, a bằng 0 hoặc 1, w bằng 0 hoặc 1, và y bằng 0 hoặc 1. Theo một số phương án, p nằm trong khoảng từ 1 đến 10, nằm trong khoảng từ 1 đến 9, nằm trong khoảng từ 1 đến 8, nằm trong khoảng từ 1 đến 7, nằm trong khoảng từ 1 đến 6, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, nằm trong khoảng từ 1 đến 3, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 2. Theo một số phương án, p nằm trong khoảng từ 2 đến 8, nằm trong khoảng từ 2 đến 7, nằm trong khoảng từ 2 đến 6, nằm trong khoảng từ 2 đến 5, nằm trong khoảng từ 2 đến 4 hoặc 2 đến 3. Theo các phương án khác, p bằng 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6. Theo một số phương án, p bằng 2 hoặc 4. Theo một số phương án, khi w không bằng 0, y bằng 1 hoặc 2. Theo một số phương án, nếu w bằng 1 đến 12, thì y bằng 1 hoặc 2. Theo một số phương án, w bằng 2 đến 12 và y bằng 1 hoặc 2. Theo một số phương án, a bằng 1 và w và y bằng 0.

Đối với chế phẩm chứa nhiều kháng thể, khả năng mang dược chất được thể hiện trong p , số lượng trung bình của các phân tử dược chất/kháng thể. Khả năng mang dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20 dược chất (D)/kháng thể. Số lượng trung bình của dược chất/kháng thể trong quá trình tạo ra các phản ứng tiếp hợp có thể được đặc trưng bởi các cách thông thường như khối phổ, thử nghiệm ELISA, và HPLC. Phân phối định lượng của thể tiếp hợp kháng thể dược chất liên quan đến p cũng có thể được xác định. Trong một số trường hợp, việc tách, tinh chế, và mô tả đặc điểm của thể tiếp hợp kháng thể dược chất đồng nhất trong đó p là trị số nhất định thu được từ thể tiếp hợp kháng thể dược chất với với khả năng mang dược chất khác có thể thu được bằng cách các như HPLC pha đảo hoặc điện di. Theo các phương án cụ thể, p nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

Việc tạo ra các hợp chất thể tiếp hợp kháng thể dược chất có thể được thực hiện bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Tóm lại, các hợp chất thể tiếp hợp kháng thể dược chất bao gồm MAb FLT3 theo sáng chế làm đơn vị kháng thể, dược chất, và tùy ý liên kết nối giữa dược chất và các chất gắn kết. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể là kháng thể đơn dòng FLT3 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể ký hiệu CHv62.21 nêu trên. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, kháng thể là kháng thể đơn dòng FLT3 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể ký hiệu CHv62.21pAF nêu trên (Xem, Công thức (I)).

Nhiều phản ứng khác nhau là có sẵn để gắn kết cộng hóa trị dược chất và/hoặc liên kết với các chất gắn kết. Thao tác này thường được thực hiện bằng cách cho phản ứng gốc axit amin của các chất gắn kết kết, ví dụ, phân tử kháng thể, bao gồm nhóm amin của lysin, các nhóm carboxylic axit tự do của axit glutamic và axit aspartic, nhóm sulfhydryl của cystein và gốc khác nhau của axit amin thơm. Một trong số phương pháp không đặc hiệu được sử dụng phổ biến nhất về việc liên kết cộng hóa trị là phản ứng carbodiimide để liên kết nhóm carboxy (hoặc amino) của hợp chất với các nhóm amino (hoặc carboxy) của kháng thể. Ngoài ra, dược chất chức kép như dialdehyt hoặc imidoeste được sử dụng để liên kết nhóm amino của hợp chất với nhóm amino của phân tử kháng thể. Cũng đã biết phản ứng liên kết của dược chất với các chất gắn kết là phản ứng bazơ Schiff. Phương pháp này bao gồm quá trình oxy hóa periodat dược chất chứa nhóm glycol hoặc hydroxy, từ đó tạo ra aldehyt mà sau đó được phản ứng với các chất gắn kết. Việc liên kết

xảy ra thông qua việc tạo ra bazơ Schiff với các nhóm amino của các chất gắn kết. Izothioxyanat cũng có thể được sử dụng làm các chất ghép cặp để liên kết cộng hóa trị được chất với các chất gắn kết. Kỹ thuật khác là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này và nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo các phương án nhất định, hợp chất trung gian, là sản phẩm tiền thân của liên kết, được phản ứng với dược chất các điều kiện thích hợp. Theo các phương án nhất định, nhóm hoạt động được sử dụng trên dược chất và/hoặc hợp chất trung gian. Sản phẩm của phản ứng giữa dược chất và hợp chất trung gian, hoặc dược chất dẫn xuất, được phản ứng sau đó với kháng thể đơn dòng FLT3 trong các điều kiện thích hợp.

V.) Đơn vị liên kết

Thông thường, các hợp chất thể tiếp hợp kháng thể dược chất bao gồm đơn vị liên kết nằm giữa đơn vị dược chất và đơn vị kháng thể. Theo một số phương án, liên kết có thể được phân cắt trong các điều kiện nội bào, sao cho quá trình phân cắt liên kết giải phóng đơn vị dược chất ra khỏi kháng thể trong môi trường nội bào. Theo các phương án khác, đơn vị liên kết không được phân cắt và dược chất được giải phóng, ví dụ, bằng cách thoái biến kháng thể.

Theo một số phương án, liên kết có thể được phân cắt bởi dược chất phân cắt có mặt trong môi trường nội bào (ví dụ, trong tiêu thể hoặc nội thể hoặc caveolea). Liên kết có thể là, ví dụ, liên kết peptidyl được phân cắt bởi enzym peptidaza hoặc proteaza nội bào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proteaza ở tiêu thể hoặc nội thể. Liên kết cũng có thể được phân cắt bởi dược chất phân cắt có mặt trong môi trường nội bào (ví dụ, nằm gần màng tế bào hoặc vùng mô). Liên kết có thể là, ví dụ, liên kết peptidyl được phân cắt bởi enzym peptidaza hoặc proteaza ngoại bào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, enzym thuộc họ cathepsin hoặc metalloproteinaza nên). Theo một số phương án, liên kết peptidyl là ít nhất hai axit amin hoặc ít nhất ba axit amin. Theo một phương án được ưu tiên, liên kết peptidyl chứa ít nhất một đơn vị amino-oxy axit (Ambrx, Inc., La Jolla, CA). Dược chất phân cắt có thể bao gồm các dược chất đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67- 123 và patent Mỹ số: 6,214,345). Một ưu điểm trong việc sử dụng quá trình giải phóng dược chất điều trị bệnh nhờ protein phân giải nội bào, là dược chất thông thường bị suy yếu khi được tiếp hợp và độ ổn định trong huyết thanh của thể tiếp hợp thường cao.

Theo các phương án khác, liên kết phân cắt được là gốc liên kết nhạy với độ pH, nghĩa là, nhạy với quá trình thủy phân ở các trị số pH nhất định. Thông thường, liên kết nhạy với độ pH có khả năng thủy phân trong các điều kiện axit. Ví dụ, liên kết dễ phân hủy bởi axit có thể thủy phân được trong tiêu thể (ví dụ, oxim, hydrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, cis-aconitic amit, orthoeste, axetal, ketal, hoặc chất tương tự) có thể được sử dụng. (Xem, ví dụ, các Patent Mỹ số 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al, 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661.) Các liên kết như vậy là tương đối ổn định trong điều kiện pH trung tính, như trong máu, nhưng lại không ổn định hoặc kém ổn định hơn ở độ pH dưới 5,5 hoặc 5,0, khoảng pH của tiêu thể. Theo các phương án nhất định, liên kết có thể thủy phân được là gốc liên kết thioete (như, ví dụ, thioete được gắn vào dược chất điều trị bệnh thông qua gốc liên kết axylhydrazon (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,622,929).

Theo các phương án khác, liên kết có thể được phân cắt trong các điều kiện khử đã biết trong lĩnh vực này. (Xem, ví dụ, Thorpe et al, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Cũng xem patent Mỹ số 4,880,935.). Liên kết cũng có thể được phân giải trong các điều kiện khử trong tế bào (hoặc ngoài tế bào). Ví dụ, theo một phương án được ưu tiên, liên kết đặc hiệu gắn kết N-O có thể được khử thông thường và bị phá vỡ làm cho phân cắt liên kết.

Theo các phương án khác, đơn vị liên kết không thể phân cắt và dược chất được giải phóng bằng cách thoái biến kháng thể. (Xem Công bố đơn PCT số WO2012/166560 (Ambrx, Inc.) được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn và nhằm toàn bộ các mục đích).

Mặc khác, theo phương án không loại trừ lẫn nhau, liên kết thúc đẩy sự tương tác trong tế bào như đã biết trong lĩnh vực này.

Nhiều liên kết cụ thể có thể được sử dụng cùng với chế phẩm và các phương pháp được mô tả trong WO 2004/010957, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0074008, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 20050238649, và Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0024317 (mỗi tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn và nhằm toàn bộ các mục đích).

Theo một phương án được ưu tiên, LU theo sáng chế được ký hiệu là AGL và thường được gọi là axit 2-(aminooxy)axetic hoặc $C_2H_5NO_3$.

VI.) Đơn vị kéo dài

Đơn vị kéo dài (A), khi có mặt, có khả năng liên kết đơn vị kháng thể với đơn vị axit amin (-W-), nếu có, với đơn vị đệm (-Y-), nếu có; hoặc với đơn vị dược chất (-D). Các nhóm chức thích hợp có thể có mặt trên MAb FLT3 (ví dụ CHv62.21 hoặc CHv62.21pAF), có trong tự nhiên hoặc bằng cách hóa học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, keto, aldehyt, sulfhydryl, amino, hydroxyl, nhóm anomeric hydroxyl của hydrat cacbon, và carboxyl. Các nhóm chức thích hợp là keto, aldehyt, sulfhydryl, và amino. Theo một ví dụ, nhóm keto nằm trên axit amin không có trong tự nhiên (nnAA) được đưa vào trong MAb theo sáng chế. Theo ví dụ khác, nhóm aldehyt nằm trên nnAA được đưa vào trong MAb theo sáng chế. Theo ví dụ khác, các nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng cách khử liên kết disulfur nội phân tử của kháng thể đơn dòng FLT3. Theo một phương án khác, các nhóm sulfhydryl có thể được tạo ra bằng cách cho nhóm amino phản ứng với gốc lysin của kháng thể đơn dòng FLT3 với 2-iminothiolan (chất phản ứng Traut) hoặc các chất phản ứng tạo ra sulfhydryl khác. Theo các phương án nhất định, kháng thể đơn dòng FLT3 là kháng thể tái tổ hợp và được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để mang một hoặc nhiều lysin. Theo các phương án nhất định khác, kháng thể đơn dòng FLT3 tái tổ hợp được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để mang nhóm sulfhydryl bổ sung, ví dụ, xystein bổ sung.

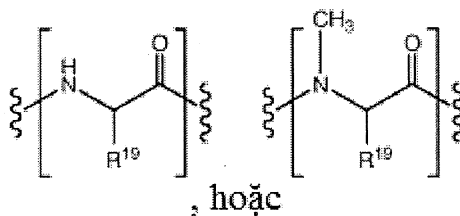
Theo một phương án, đơn vị kéo dài tạo ra liên kết oxim với nhóm keto của đơn vị kháng thể. Nhóm keto có mặt trên nnAA được đưa vào MAb.

Cần phải hiểu rằng từ toàn bộ các phương án cụ thể ngay cả khi không được thể hiện rõ ràng, nằm trong khoảng từ 1 đến 20 gốc dược chất có thể được liên kết với kháng thể ($p = 1-20$).

Đơn vị axit amin

Đơn vị axit amin (-W-), khi có mặt, sẽ liên kết đơn vị kéo dài với đơn vị đệm nếu đơn vị đệm có mặt, liên kết đơn vị kéo dài với gốc dược chất nếu đơn vị đệm có mặt, và liên kết đơn vị kháng thể với đơn vị dược chất nếu đơn vị kéo dài và đơn vị đệm không có mặt.

Ww- có thể là, ví dụ, đơn vị mono-peptit, dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit, hexapeptit, heptapeptit, octapeptit, nonapeptit, decapeptit, undecapeptit hoặc dodecapeptit. Mỗi đơn vị -W- độc lập có công thức được nêu dưới đây trong dấu ngoặc vuông, và w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12:



trong đó R¹⁹ bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở hydro, methyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, benzyl, p-hydroxybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, phenyl, xyclohexyl. Để viện dẫn tiếp, xem (US2014/0072586 & WO2012/047724, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn).

Theo các phương án nhất định, đơn vị axit amin có thể bao gồm axit amin tự nhiên. Theo các phương án khác, đơn vị axit amin có thể bao gồm axit amin không có trong tự nhiên.

Theo một số phương án, đơn vị axit amin có thể được phân giải enzym bởi một hoặc nhiều enzym, bao gồm proteaza liên quan đến bệnh ung thư hoặc khối u, để giải phóng đơn vị dược chất (-D), theo một phương án được thêm proton in vivo trong quá trình giải phóng để tạo ra dược chất (D).

Theo một khía cạnh về đơn vị axit amin, đơn vị axit amin là valin-xitrulin (vc hoặc val-xit). Theo một khía cạnh khác, đơn vị axit amin là phenylalanin-lysin (tức là, fk). Theo một khía cạnh khác nữa về đơn vị axit amin, đơn vị axit amin là N-metylvalin-xitrulin.

VII.) Đơn vị đệm

Đơn vị đệm (-Y-), khi có mặt, liên kết đơn vị axit amin với đơn vị dược chất khi đơn vị axit amin có mặt. Theo cách khác, đơn vị đệm liên kết đơn vị kéo dài với đơn vị dược chất khi đơn vị axit amin không có mặt. Đơn vị đệm cũng liên kết đơn vị dược chất với đơn vị kháng thể khi cả hai đơn vị axit amin lẫn đơn vị kéo dài không có mặt. Các đơn vị đệm có hai loại chung: không tự diệt hoặc tự diệt. Ví dụ về các đơn vị đệm có thể có mặt theo sáng chế đã biết trong lĩnh vực này. Xem, Toki et al., 2002, *J. Org. Chem.* 67: 1866-1872 và *Nature Biotechnology* 21(7):778-784).

Ví dụ khác về tự diệt các đơn vị đệm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất thơm là tương tự về mặt điện tử với nhóm PAB như các dẫn xuất 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al., 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) và ortho hoặc para-aminobenzylaxetal. Các đơn vị đệm có thể được sử dụng cho quá trình tạo vòng khi thủy phân liên kết amit, như amit của axit 4-aminobutyric được thể và không được thể (Rodrigues et al., 1995, *Chemistry Biology* 2:223), hệ vòng bixyclo[2.2.1] và bixyclo[2.2.2] được thể thích hợp (Storm et al., 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) và amit của axit 2-aminophenylpropionic (Amsberry et al., 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). Việc loại trừ dược chất chứa amin được thể ở vị trí mở glyxin (Kingsbury et al., 1984, *J. Med. Chem.* 27:1AAAT) cũng là ví dụ về các đơn vị đệm tự diệt.

VIII.) Đơn vị dược chất

Đơn vị dược chất (D) có thể là dược chất điều trị bệnh bất kỳ. Ví dụ, đơn vị dược chất có thể là gốc gây độc tế bào, kìm hãm tế bào hoặc điều hòa miễn dịch (ví dụ, kìm hãm miễn dịch) hoặc dược chất hóa trị liệu. D là đơn vị dược chất (gốc) có nguyên tử có thể tạo ra liên kết với đơn vị đệm (nếu có mặt), với đơn vị axit amin (nếu có mặt), với đơn vị kéo dài (nếu có mặt) hoặc với đơn vị kháng thể. Theo một số phương án, đơn vị dược chất D có nguyên tử nitơ có thể tạo ra liên kết với đơn vị đệm (nếu được sử dụng). Thuật ngữ “đơn vị dược chất” và “gốc dược chất” là đồng nghĩa và được sử dụng thay thế cho nhau.

Nhóm dược chất gây độc tế bào hoặc điều hòa miễn dịch thích hợp bao gồm, ví dụ, dược chất kháng tubulin, chất kết dính rãnh ADN nhỏ, chất ức chế quá trình sao chép ADN, và chất alkyl hóa. Theo một số phương án, dược chất là auristatin, như auristatin E (cũng đã biết trong lĩnh vực này là dẫn xuất của dolastatin-10) hoặc dẫn xuất của nó. Các auristatin khác thông thường bao gồm AFP, MMAF, và MMAE. Sự tổng hợp và cấu trúc

của auristatin cụ thể được mô tả trong các Patent Mỹ số 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; và 4,486,414, mỗi tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn và nhằm toàn bộ các mục đích.

Theo một số phương án, đơn vị dược chất là calicheamicin, camptothecin, maytansinoid, hoặc antraxyclin. Theo một số phương án, dược chất là taxan, chất ức chế topoisomeraza, alkaloit của dừa cạn, hoặc tương tự.

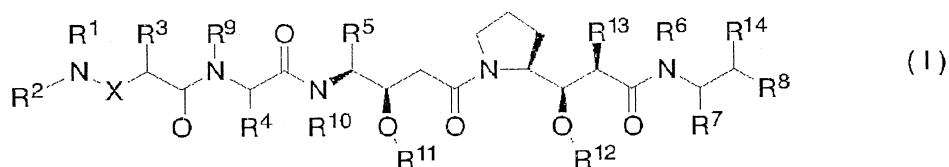
Theo một số phương án thông thường, dược chất gây độc tế bào thích hợp bao gồm, ví dụ, chất kết dính rãnh ADN nhỏ (ví dụ, enediyne và lexitropsin, hợp chất CBI; cũng xem patent Mỹ số 6,130,237), duocarmycin, taxan (ví dụ, paclitaxel và doxorubicin), puromycin, và alkaloit của dừa cạn. Dược chất gây độc tế bào khác bao gồm, ví dụ, CC-1065, SN-38, topotecan, morpholino-doxorubicin, rhizoxin, xyanomorpholino-doxorubicin, echinomycin, combretastatin, netropsin, epothilone A và B, estramustine, cryptophysins, cemadotin, maytansinoids, discodermolide, eleutherobin, và mitoxantrone.

Theo một số phương án, dược chất là dược chất kháng tubulin. Ví dụ về chất kháng tạo ống bao gồm, auristatin, taxan (ví dụ, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (doxorubicin)), T67 (Tularik) và alkyloit của dừa cạn (ví dụ, vincristine, vinblastine, vindesine, và vinorelbine). Dược chất kháng tubulin khác bao gồm, ví dụ, dẫn xuất baccatin, chất tương tự taxan (ví dụ, epothilone A và B), nocodazol, colchicine và colcimid, estramustine, cryptophycins, cemadotin, maytansinoids, combretastatins, discodermolide, và eleutherobin.

Theo các phương án nhất định, dược chất gây độc tế bào là maytansinoid, nhóm dược chất kháng tubulin khác. Ví dụ, theo các phương án cụ thể, maytansinoid là maytansine hoặc DM-1 (ImmuniGen, Inc.; cũng xem Chari et al., 1992, Cancer Res. 52: 127-131).

Theo các phương án nhất định, dược chất gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào là dolastatin. Theo các phương án nhất định, dược chất gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào là nhóm auristatin.

Theo một phương án khác, đơn vị được chất là các chất tương tự peptit Dolaproin-dolaisoleuin. Do đó, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I):

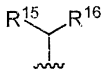


trong đó

R^1 và R^2 độc lập với nhau là -H hoặc alkyl;

X là -O-, $-NR^Z$ -, -S-, hoặc không có mặt;

trong đó R^Z là -H hoặc alkyl;

R^3 là nhóm có công thức:  ;

trong đó mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, $-NH_2$, -SH, $-N_3$, alkyl, alkenyl, alkynyl, alkyl-OH, -alkyl- NH_2 , -alkyl-SH, hoặc -alkyl- N_3 ;

R^4 là nhóm có công thức:  ;

trong đó mỗi R^{17} và R^{18} độc lập là -H, -OH, $-NH_2$, -SH, -N, $-CO_2H$, alkyl, alkenyl, alkynyl, -alkyl-OH, -alkyl- NH_2 , -alkyl-SH, -alkyl- N_3 hoặc -alkyl- $-CO_2H$

R^5 là *sec*-butyl hoặc isobutyl;

R^6 là -H hoặc alkyl;

mỗi R^7 và R^8 độc lập là -H, alkyl, $-CO_2R^a$, $CONR^bR^c$, phenyl được thế hoặc không được thế, hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế;

trong đó R^a là -H hoặc alkyl;

mỗi R^b và R^c độc lập là H hoặc alkyl;

R^9 là -H hoặc alkyl; hoặc R^9 cùng với R^4 và các nguyên tử mà chúng được gắn vào để tạo ra nhân heteroxycloalkyl được thế hoặc không được thế;

R^{10} là -H hoặc alkyl;

R^{11} là -H hoặc alkyl;

R^{12} là -H hoặc alkyl;

R^{13} là -H hoặc alkyl; và

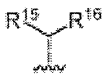
R^{14} là -H, -OH hoặc alkyl;

với điều kiện khi X không có mặt và mỗi R^{15} , R^{16} , R^{17} và R^{18} là metyl, thì R^8 không là phenyl được thế hoặc không được thế, hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế;

hoặc muối được dụng của nó.

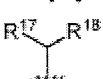
Theo một số phương án, mỗi R^1 và R^2 độc lập là -H hoặc alkyl, ví dụ, C_{1-6} alkyl. Theo một số phương án, mỗi R^1 và R^2 độc lập là -H hoặc metyl. Theo một số phương án, mỗi R^1 và R^2 độc lập là alkyl. Theo một số phương án, R^1 và R^2 đều là metyl. Theo một số phương án, R^1 và R^2 đều là -H.

Theo một số phương án, X không có mặt. Theo các phương án khác, X là -O-. Theo một số phương án, mỗi R^1 và R^2 độc lập là alkyl, và X không có mặt. Theo một số phương án, R^1 và R^2 đều là metyl, và X không có mặt. Theo các phương án khác, R^1 và R^2 đều là -H, và X là -O-. Theo một số phương án, X là $-NR^Z$, trong đó R^Z là -H hoặc alkyl. Theo một số phương án, R^Z là -H. Theo một số phương án, X là R^Z là alkyl, ví dụ, C_{1-6} alkyl hoặc metyl.

Theo các phương án nhất định, R^3 là , trong đó mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, $-NH_2$, -SH, $-N_3$, alkyl, alkenyl, alkynyl, -alkyl-OH, -alkyl- NH_2 , -alkyl-SH, hoặc -alkyl- N_3 . Vẫn theo các phương án khác, mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, alkyl, $-(CH_2)_{0-6}C\equiv CH$, $-(CH_2)_{0-6}CH=CH_2$, $-(CH_2)_{0-6}OH$, $-(CH_2)_{0-6}NH_2$, $-(CH_2)_{0-6}SH$, hoặc $-(CH_2)_{0-6}N_3$. Theo một số phương án, mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, hoặc alkyl. Theo một số phương án, mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, hoặc metyl. Theo một số phương án, R^{15} là -OH và R là hydro. Theo một số phương án, R^{15} là -OH và R^{16} là metyl.

Theo các phương án nhất định, R^3 ở dạng cấu hình hóa lập thể R đối với phần còn lại của phân tử. Theo các phương án khác, R ở dạng cấu hình hóa lập thể S đối với phần còn lại của phân tử. Theo các phương án nhất định, bản thân nhóm R chứa một hoặc nhiều tâm không đối xứng, và mỗi tâm lập thể độc lập ở dạng cấu hình R hoặc S.

Theo các phương án nhất định, R^4 là , trong đó mỗi R^{17} và R^{18} độc lập là -H, -OH, -NH₂, -SH, -N₃, -CO₂H, alkyl, alkenyl, alkynyl, -alkyl-OH, -alkyl-NH₂, -alkyl-

SH, -alkyl-N₃ hoặc -alkyl-CO₂H. Theo các phương án khác, R^4 là , trong đó R^{17} là -H, -OH, -NH₂, -SH, -N₃, -CO₂H, alkyl, alkenyl, alkynyl, -alkyl-OH, -alkyl-NH₂, -alkyl-SH, -alkyl-N₃ hoặc -alkyl-CO₂H, và R^{18} là -H, -OH, -NH₂, -SH, -N₃, -CO₂H, alkenyl, alkynyl, -alkyl-OH, -alkyl-NH₂, -alkyl-SH, -alkyl-N₃ hoặc -alkyl-CO₂H. Vẫn theo các phương án khác, R^{17} và R^{18} độc lập với nhau là -H, alkyl, -(CH₂)₀₋₆C≡CH, -(CH₂)₀₋₆CH=CH₂, -(CH₂)₀₋₆OH, -(CH₂)₀₋₆NH₂, -(CH₂)₀₋₆SH, hoặc -(CH₂)₀₋₆N₃. Theo một số phương án, mỗi R^{17} và R^{18} độc lập là -H, -OH, -NH₂, -SH, -N₃, -CO₂H, alkyl, -alkyl-NH₂, hoặc -alkyl-N₃. Theo một số phương án, mỗi R^{17} và R^{18} độc lập là -H, -OH, -NH₂, -SH, -N₃, -CO₂H, methyl, -CH₂NH₂, hoặc -CH₂N₃.

Theo các phương án nhất định, R^4 cùng với R^9 và các nguyên tử mà chúng được gắn vào để tạo ra nhân heteroxycloalkyl được thể hoặc không được thể. Theo các phương án nhất định, R^4 cùng với R^9 và các nguyên tử mà chúng được gắn vào để tạo ra nhân heteroxycloalkyl có 5 đến 7 cạnh, có thể không được thể hoặc được thể bằng một hoặc nhiều nhóm được chọn từ -OH, -NH₂, -SH, và -N₃. Theo các phương án nhất định, nhân heteroxycloalkyl là nhân pyrrolidin, có thể không được thể hoặc được thể bằng một hoặc nhiều nhóm được chọn từ -OH, -NH₂, -SH, và -N₃.

Theo các phương án nhất định, R^4 ở dạng cấu hình hóa lập thể R đối với phần còn lại của phân tử. Theo các phương án khác, R^4 ở dạng cấu hình hóa lập thể S đối với phần còn lại của phân tử. Theo các phương án nhất định, bản thân nhóm R^4 chứa một hoặc nhiều tâm không đối xứng, và mỗi tâm lập thể này độc lập ở dạng cấu hình R hoặc S.

Theo các phương án nhất định, R^5 là *sec*-butyl. Theo các phương án khác, R^5 là isobutyl. Theo các phương án nhất định, R^5 ở dạng cấu hình hóa lập thể R đối với phần còn lại của phân tử.

Theo các phương án khác, R^5 ở dạng cấu hình hóa lập thể S đối với phần còn lại của phân tử. Theo một số phương án, tâm không đối xứng trong nhóm R^5 ở dạng cấu hình R, và theo các phương án khác, tâm này ở dạng cấu hình S.

Theo các phương án nhất định, R^6 là -H. Theo các phương án khác, R^6 là alkyl, ví dụ C_{1-8} alkyl, C_{1-4} alkyl, metyl, hoặc etyl.

Theo một số phương án, R^7 và R^8 độc lập với nhau là -H, alkyl, $-\text{CO}_2R^a$ hoặc $-\text{CONR}^bR^c$; trong đó R^a là -H hoặc alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl hoặc metyl; và mỗi R^b và R^c độc lập là -H hoặc alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl hoặc metyl.

Theo các phương án nhất định, mỗi R^7 và R^8 độc lập là phenyl được thế hoặc không được thế hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế, trong đó phenyl hoặc nhân dị vòng có thể được thế bằng một hoặc nhiều nhóm được chọn từ halo, oxo, hydroxy, amino, alkyl, và alkoxy. Theo các phương án nhất định khác, R^7 là nhân dị vòng có 3 đến 8 cạnh không được thế. Theo các phương án nhất định khác, R^7 là nhân dị vòng có 3 đến 8 cạnh được thế. Theo các phương án nhất định khác, R^8 là phenyl mà tùy ý được thế bằng halo.

Theo các phương án nhất định, R^7 ở dạng cấu hình hóa lập thể *R* đối với phần còn lại của phân tử. Theo các phương án khác, R^7 ở dạng cấu hình hóa lập thể *S* đối với phần còn lại của phân tử.

Theo các phương án nhất định, R^8 ở dạng cấu hình hóa lập thể *R* đối với phần còn lại của phân tử. Theo các phương án khác, R^8 ở dạng cấu hình hóa lập thể *S* đối với phần còn lại của phân tử.

Theo một số phương án, R^7 là $-\text{CO}_2R^a$ $-\text{CONR}^bR^c$; tetrazolyl hoặc thiazolyl, trong đó R^a là -H hoặc alkyl, ví dụ, C_{1-6} alkyl hoặc metyl; và mỗi R^b và R^c độc lập là -H hoặc alkyl, ví dụ, C_{1-6} alkyl hoặc metyl; và *R* là phenyl mà tùy ý được thế bằng halo.

Theo một số phương án, R^9 là -H. Theo các phương án khác, R^9 là alkyl, ví dụ C_{1-8} alkyl, C_{1-4} alkyl, metyl, hoặc etyl. Theo một số phương án, R^9 là -H hoặc metyl. Theo một số phương án, R^9 là metyl.

Theo một số phương án, R^{10} là -H. Theo các phương án khác, R^{10} là alkyl, ví dụ C_{1-8} alkyl, C_{1-4} alkyl, metyl, hoặc etyl. Theo một số phương án, R^{10} là -H hoặc metyl. Theo một số phương án, R^{10} là metyl.

Theo một số phương án, R^{11} là -H. Theo các phương án khác, R^{11} là alkyl, ví dụ, C_{1-8} alkyl, C_{1-6} alkyl, metyl, hoặc etyl. Theo một số phương án, R^{11} là -H hoặc metyl. Theo một số phương án, R^{11} là metyl.

Theo một số phương án, R^{12} là -H. Theo các phương án khác, R^{12} là alkyl, ví dụ C_{1-8} alkyl, C_{1-4} alkyl, metyl, hoặc etyl. Theo một số phương án, R^{12} là -H hoặc metyl. Theo một số phương án, R^{12} là metyl.

Theo một số phương án, R^{13} là -H. Theo các phương án khác, R^{13} là alkyl, ví dụ C_{1-8} alkyl, C_{1-4} alkyl, metyl, hoặc etyl. Theo một số phương án, R^{13} là -H hoặc metyl. Theo một số phương án, R^{13} là metyl.

Theo một số phương án, R^{14} là -H. Theo một số phương án, R^{14} là alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl, metyl, hoặc etyl. Theo một số phương án, R^{14} là -OH.

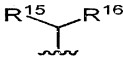
Theo các phương án nhất định, R^{14} ở dạng cấu hình hóa lập thể *R* đối với phần còn lại của phân tử. Theo các phương án khác, R^{14} ở dạng cấu hình hóa lập thể *S* đối với phần còn lại của phân tử.

Theo một số phương án, R^7 là $-\text{CO}_2\text{R}^a$, trong đó R^a là -H hoặc alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl hoặc metyl; R^8 là phenyl; và R^{14} là -H. Theo một số phương án, R^7 là $-\text{CONR}^b\text{R}^c$, trong đó mỗi R^b và R^c độc lập là -H hoặc alkyl, ví dụ, C_{1-6} alkyl hoặc metyl; R^8 là phenyl; và R^{14} là -H. Theo một số phương án, R^7 là alkyl, ví dụ, C_{1-6} alkyl hoặc metyl; R^8 là phenyl; và R^{14} là -OH. Theo một số phương án, R^7 là metyl, R^8 là phenyl, và R^{14} là -OH. Theo một số phương án, R^7 và R^{14} đều là -H, và R^8 là pyridinyl, piperidinyl, phenyl không được thế, hoặc phenyl được thế bằng halo, ví dụ, flo, clo, hoặc brom. Theo một số phương án, R^7 là $-\text{CO}_2\text{R}^a$, trong đó R^a là -H hoặc alkyl, ví dụ, C_{1-6} alkyl hoặc metyl; R^8 là -H hoặc alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl hoặc metyl; và R^{14} là alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl, metyl, hoặc etyl. Theo một số phương án, R^7 là $-\text{CO}_2\text{R}^a$, trong đó R^a là -H hoặc alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl hoặc metyl; R^8 là -H hoặc alkyl, ví dụ C_{1-6} alkyl hoặc metyl; và R^{14} là -OH.

Theo các phương án nhất định,

R^1 và R^2 độc lập với nhau là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

X là -O- hoặc không có mặt;

R^3 là ; trong đó mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, hoặc C_{1-6} alkyl;

R^4 là ; trong đó R^{17} là -OH, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{N}_3$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{C}_{1-6}$ alkyl- NH_2 , alkynyl, alkenyl, hoặc $-\text{C}_{1-6}$ alkyl- N_3 ; và R^{18} là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

R^5 là *sec*-butyl;

R^6 là -H;

R^7 là -H, C_{1-6} alkyl, $-CO_2R^a$, $-CONR^bR^c$, tetrazolyl hoặc thiazolyl; trong đó R^a là -H hoặc C_{1-6} alkyl; và

mỗi R^b và R^c là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

R^8 là -H, C_{1-6} alkyl, được thế hoặc phenyl không được thế hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế;

R^9 là -H;

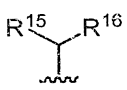
mỗi R^{10} , R^{11} , R^{12} , và R^{13} độc lập là C_{1-6} alkyl; và

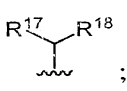
R^{14} là -H, C_{1-6} alkyl hoặc -OH.

Theo các phương án nhất định,

mỗi R^1 và R^2 độc lập là -H hoặc metyl;

X là -O- hoặc không có mặt;

R^3 là ; trong đó mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, hoặc metyl;

R^4 là ; trong đó R^{17} là -OH, $-NH_2$, $-SH$, $-N_3$, $-CO_2H$, aminometyl, alkynyl, alkenyl, hoặc azidometyl; và R^{18} là -H hoặc metyl;

R^5 là *sec*-butyl;

R^6 là -H;

R^7 là -H, metyl, $-CO_2R^a$, hoặc $-CONR^bR^c$; trong đó R^a là -H hoặc metyl; và mỗi R^b và R^c là -H hoặc metyl;

R^8 là -H, metyl, etyl, pyridinyl, piperidinyl, phenyl không được thế, phenyl được thế bằng halo; R^9 là -H;

mỗi R^{10} , R^{11} , R^{12} , và R^{13} là metyl; và

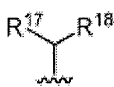
R^{14} là -H, metyl hoặc -OH.

Theo các phương án nhất định,

mỗi R^1 và R^2 độc lập là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

X không có mặt;

R^3 là ; trong đó mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, hoặc C_{1-6} alkyl;

R^4 là ; trong đó R^{17} là $-N_3$, và R^{18} là -H hoặc metyl;

R^5 là *sec*-butyl;

R^6 là -H;

R^7 là -H, C_{1-6} alkyl, $-CO_2R^a$, $-CONR^bR^c$, tetrazolyl hoặc thiazolyl; trong đó R^a là -H hoặc C_{1-6} alkyl; và mỗi R^b và R^c là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

R^8 là -H, C_{1-6} alkyl, được thế hoặc phenyl không được thế hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế;

R^9 là -H;

R^{10} , R^{11} , R^{12} , và R^{13} độc lập với nhau là C_{1-6} alkyl; và

R^{14} là -H, C_{1-6} alkyl hoặc -OH.

Theo các phương án nhất định,

mỗi R^1 và R^2 độc lập là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

X là -O-;

R^3 là ; trong đó mỗi R^{15} và R^{16} độc lập là -H, -OH, hoặc C_{1-6} alkyl;

R^4 là ; trong đó R^{17} là $-N_3$, và R^{18} là -H hoặc metyl;

R^5 là *sec*-butyl;

R^6 là -H;

R^7 là -H, C_{1-6} alkyl, $-CO_2R^a$, $-CONR^bR^c$, tetrazolyl hoặc thiazolyl; trong đó R^a là -H hoặc C_{1-6} alkyl; và mỗi R^b và R^c là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

R^8 là -H, C_{1-6} alkyl, được thế hoặc phenyl không được thế hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế;

R^9 là -H;

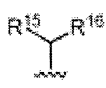
mỗi R^{10} , R^{11} , R^{12} , và R^{13} độc lập là C_{1-6} alkyl; và

R^{14} là -H, C_{1-6} alkyl hoặc -OH.

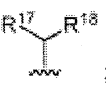
Theo một số phương án có công thức (I), trong đó,

mỗi R^1 và R^2 là methyl;

X không có mặt;

R^3 là nhóm có công thức : 

trong đó mỗi R^{15} và R^{16} là methyl;

R^4 là nhóm có công thức : 

trong đó R^{17} là -N₃, -NH₂, -OH, -SH, và R^{18} là -H hoặc methyl

R^5 là *sec*-butyl;

R^6 là -H;

R^7 là -CO₂R^a hoặc CONR^bR^c,

trong đó R^a là -H hoặc C_{1-6} alkyl;

mỗi R^b và R^c độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl;

R^8 là phenyl;

R^9 là -H;

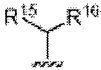
mỗi R^{10} , R^{11} , R^{12} , và R^{13} độc lập là methyl; và

R^{14} là -H.

Theo một số phương án của hợp chất có công thức (I), trong đó,

mỗi R^1 và R^2 là -H;

X là -O-;

R^3 là nhóm có công thức:  ;

trong đó mỗi R^{15} và R^{16} là methyl;

R^4 là nhóm có công thức:  ;

trong đó R^{17} là $-N_3$, và R^{18} là $-H$ hoặc methyl;

R^5 là *sec*-butyl;

R^6 là $-H$;

R^7 là $-CO_2R^a$ hoặc $CONR^bR^c$,

trong đó R^a là $-H$ hoặc $C_{1-6}alkyl$;

mỗi R^b và R^c độc lập là H hoặc $C_{1-6}alkyl$;

R^8 là phenyl;

R^9 là $-H$;

mỗi R^{10} , R^{11} , R^{12} , và R^{13} độc lập là methyl; và

R^{14} là $-H$.

Cần phải hiểu rằng định nghĩa về nhóm biến đổi bất kỳ trong bản mô tả này có thể được sử dụng kết hợp với định nghĩa về nhóm biến đổi khác bất kỳ trong bản mô tả này, sao cho toàn bộ các dạng kết hợp và hoán vị của các nhóm biến đổi trong bản mô tả này, trong đó cho phép về mặt hóa học, được dự định đưa ra.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm:

(*S*)-methyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-3-hydroxy-*N*-methylpropanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoat;
 (*S*)-methyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*R*)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-3-hydroxy-*N*-methylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoat;

(*S*)-2-(dimethylamin)-N-((*S*)-3-hydroxy-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxo-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-((2-(pyridin-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)(metyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-3-metylbutanamit;

(2*S*,3*R*)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-3-hydroxy-N-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxo-1-

((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-((2-(pyridin-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-N-metylbutanamit;

(2*S*)-2-(dimethylamin)-N-((2*S*)-3-hydroxy-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxo-1-((2*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-((2-(piperidin-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)(metyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-3-metylbutanamit;

(2*S*,3*R*)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-3-hydroxy-N-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxo-1-((2*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-((2-(piperidin-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-N-metylbutanamit;

(*S*)-metyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-

metylbutanamido)-N-metylbutanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat;

(*S*)-metyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-3-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-

metylbutanamido)-N-metylpropanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat;

(*S*)-N-((*S*)-3-amino-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxo-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-

((2-(pyridin-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)(metyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamit;

(*S*)-metyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-

metylbutanamido)-N-metylpropanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-

2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoate;

(*S*)-methyl-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-4-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamino)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoate;

(*S*)-methyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-4-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamino)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoate;

(*S*)-2-((*S*)-2-(aminooxy)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-((2-(pyridin-2-yl)ethyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*,3-dimethylbutanamide;

((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(dimethylamino)-3-hydroxypropanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalanine;

((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((2*S*,3*R*)-2-(dimethylamino)-3-hydroxybutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalanine;

axit (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamino)-3-

methylbutanamido)-*N*-methylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanamido)-3-phenylpropanoate;

(*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((2*S*,3*R*)-2-(dimethylamino)-3-hydroxybutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamide;

(*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamino)-3-hydroxypropanamido)-*N*,3-dimethylbutanamide;

(*S*)-methyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*R*)-2-((*S*)-2-(dimethylamino)-3-

metylbutanamido)-3-mercapto-*N*-metylpropanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat;

axit (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*R*)-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-metylbutanamido)-3-mercapto-*N*-metylpropanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoic;

axit (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-metylbutanamido)-3-hydroxy-*N*-metylpropanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoic;

axit (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*R*)-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-metylbutanamido)-3-hydroxy-*N*-metylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoic;

(S)-metyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-hydroxypropanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat;

(S)-metyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((2*S*,3*R*)-2-(dimetylamin)-3-hydroxybutanamido)-*N*,3-dimetylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat;

(S)-metyl 2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-amino-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-metylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat;

axit (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-amino-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-

metylbutanamido)-*N*-metylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoic;

(2*S*,3*S*)-3-azido-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metyl-3-oxo-3-(phenetylamino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-metylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-azido-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-

2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((4-clophenetyl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((2-clophenetyl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(phenethylamino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-amino-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((4-clophenetyl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-amino-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((2-clophenetyl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamit;

(*S*)-4-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(phenethylamino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

(*S*)-4-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

(*S*)-4-amino-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((4-clophenethyl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamit;

(*S*)-4-amino-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((2-*clophenetyl*)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-metylbutanamit;

metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-*N* metylpent-4-ynamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

(2*S*,3*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-metylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxo-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-2-metyl-3-oxo-3-((2-(pyridin-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-metylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(tert-butylamino)-1-oxo-3-

phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-metylbutanamit; metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-metylbutanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-*L*-valinat;

metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-6-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-*N*-metylhexanamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

metyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,4*S*)-4-azido-1-(dimetyl-*L*-valyl)-*N*-metylpyrolidin-2-carboxamido)-3-metoxo-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxo-2-metylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

axit (*S*)-3-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-metylbutanamido)-4-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxo-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxo-3-(((*S*)-1-metoxo-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-2-metyl-3-oxopropyl)pyrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)(metyl)amino)-4-oxobutanoic;

(2*S*,3*R*)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-3-hydroxy-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

methyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*,3-dimethylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-serinat;

methyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-isoleuxinat;

(2*S*,3*S*)-3-amino-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-amino-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(tert-butylamino)-1-oxo-3-

phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamit; methyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-3-azido-*N*-methyl-2-((*S*)-3-methyl-2-(methylamino)butanamido)propanamid)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

methyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-methyl-2-((*S*)-3-methyl-2-(methylamino)butanamido)butanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

(2*S*,3*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-*N*-methyl-2-((*S*)-3-methyl-2-methylamino)butanamido)butanamit;

((2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(tert-butylamino)-1-oxo-3-

phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-

metoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methyl-2-((*S*)-3-methyl-2-(methylamino)butanamido)butanamit;

tert-butyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-methyl-2-((*S*)-3-methyl-2-(methylamino)butanamido)butanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-methyl-2-((*S*)-3-methyl-2-(methylamino)butanamido)butanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalanin;

tert-butyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

(2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(1*H*-tetrazol-5-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

(2*S*,3*S*)-3-azido-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(1*H*-tetrazol-5-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methyl-2-((*S*)-3-methyl-2-(methylamino)butanamido)butanamit;

(2*S*,3*S*)-3-azido-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

tert-butyl ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((2*S*,3*S*)-3-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-methylbutanamido)-3-methoxy-5-methylheptanoyl)pyrrolidin-2-yl)-3-methoxy-2-methylpropanoyl)-*L*-phenylalaninat;

(2*S*,3*S*)-3-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-methoxy-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-methoxy-2-methyl-3-oxo-3-(((*S*)-2-phenyl-1-(1*H*-tetrazol-5-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*-methylbutanamit;

and (2*S*,3*S*)-3-amino-2-((*S*)-2-(dimethylamin)-3-methylbutanamido)-*N*-

((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metyl-3-oxo-3-(((S)-2-phenyl-1-(thiazol-2-yl)etyl)amino)propyl)pyrrolidin-1-yl)-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-N-metylbutanamit;

và muối được dụng của chúng.

Sáng chế cũng đề cập đến muối được dụng các hợp chất có công thức (I), tốt hơn là các muối nêu trên và hợp chất cụ thể cụ thể trong bản mô tả này, được phẩm chứa các muối này, và các phương pháp sử dụng các muối này.

Thuật ngữ “muối được dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ muối của axit tự do hoặc bazơ của hợp chất được nêu trong bản mô tả này không độc, có khả năng dung nạp sinh học, hoặc đặc tính sinh học khác thích hợp để dùng cho đối tượng. Xem, nói chung, S.M. Berge, et al. “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19. Các muối được dụng được ưu tiên là các muối hữu hiệu về mặt dược lý và thích hợp để tiếp xúc với các mô của đối tượng mà không gây ra độc tính, kích ứng, hoặc đáp ứng dị ứng. Hợp chất được nêu trong bản mô tả có thể có nhóm axit thích hợp, nhóm bazơ thích hợp, hoặc cả hai nhóm chức này, và do đó, phản ứng với nhiều bazơ vô cơ hoặc hữu cơ, và axit vô cơ và hữu cơ, để tạo ra muối được dụng. Ví dụ về các muối được dụng bao gồm muối cộng axit như sulfat, pyrosulfat, bisulfat, sulfit, bisulfit, phosphat, monohydrogen-phosphat, dihydrophosphat, metaphosphat, pyrophosphat, clorua, bromua, iodua, axetat, propionat, decanoat, caprylat, acrylat, format, isobutytrat, caproat, heptanoat, propiolat, oxalat, malonat, suxinat, suberat, sebacat, fumarat, maleat, butyn-1,4-dioat, hexyn-1,6-dioat, benzoat, clobenzoat, metylbenzoat, dinitrobenzoat, hydroxybenzoat, metoxybenzoat, phtalat, sulfonat, metylsulfonat, propylsulfonat, besylat, xylenulfonat, naphtalen-1-sulfonat, naphtalen-2-sulfonat, phenylaxetat, phenylpropionat, phenylbutytrat, xitrat, lactat, γ -hydroxybutytrat, glycolat, tartrat, và mandelat, và các muối với bazơ vô cơ như natri, kali, magie, canxi, nhôm, và tương tự hoặc bazơ hữu cơ như metylamin, etylamin, etanolamin, lysin, ornithin, và tương tự, các muối với các dẫn xuất axit amin hoặc axit amin khác nhau như axetylleuxin và chất tương tự, muối amoni, v. v...

Để mục đích điều trị, được phẩm chứa các hợp chất được nêu trong bản mô tả có thể còn bao gồm một hoặc nhiều tá dược được dụng. Tá dược được dụng là chất không độc và đặc tính sinh học khác thích hợp để dùng cho đối tượng. Các tá dược như vậy tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ra và dùng hợp chất được nêu trong bản mô tả và là

tương hợp với hoạt chất. Ví dụ về tá dược được dụng bao gồm chất ổn định, chất làm trơn, chất hoạt động bề mặt, các chất pha loãng, chất chống oxy hoá, chất kết dính, chất tạo màu, chất nhũ hoá, hoặc chất làm thay đổi mùi vị. Theo các phương án được ưu tiên, dược phẩm là dược phẩm vô trùng.

Dược phẩm được nêu trong bản mô tả có thể được bào chế ở dạng dung dịch, nhũ tương, hỗn dịch, hoặc phân tán trong dung môi hoặc chất mang dược dụng thích hợp, hoặc ở dạng viên tròn, viên nén, viên hình thoi, thuốc đạn, bột dùng để hoàn nguyên, hoặc viên nang cùng với chất mang rắn theo các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực bào chế các dạng liều khác nhau. Để dùng khu trú, tốt hơn nếu các hợp chất được nêu trong bản mô tả được bào chế ở dạng kem bôi hoặc thuốc mỡ hoặc tá dược lỏng tương tự thích hợp để dùng khu trú. Dược phẩm và các hợp chất được nêu trong bản mô tả có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế theo đường phân phối thích hợp, ví dụ, đường miệng, đường mũi, ngoài đường tiêu hóa, trực tràng, khu trú, mắt, hoặc bằng cách ngửi.

Thuật ngữ “điều trị” hoặc “việc điều trị” như được sử dụng trong bản mô tả này được dự định để chỉ việc sử dụng hợp chất được nêu trong bản mô tả cho đối tượng nhằm mục đích tạo ra lợi ích điều trị. Việc điều trị bao gồm làm đảo ngược, cải thiện, làm giảm nhẹ, ức chế sự tiến triển của bệnh, hoặc làm giảm bớt mức độ trầm trọng bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ung thư. Thuật ngữ “đối tượng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ động vật có vú cần được điều trị, như người.

Trong các phương pháp điều trị nêu trong bản mô tả này, “lượng hữu hiệu” có nghĩa là lượng hoặc liều thường đủ để đem lại lợi ích điều trị mong muốn ở đối tượng có nhu cầu cần điều trị. Hơn thế nữa, thuật ngữ “lượng hữu hiệu điều trị bệnh” có nghĩa là lượng bất kỳ, khi được so sánh với đối tượng tương ứng không nhận được lượng này, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm lành, ngăn ngừa, hoặc cải thiện bệnh, rối loạn, hoặc tác dụng phụ, hoặc sự giảm về tốc độ tiến triển của bệnh hoặc rối loạn. Thuật ngữ này cũng bao gồm lượng hữu hiệu nằm trong phạm vi của nó để tăng cường chức năng sinh lý bình thường cũng như lượng hữu hiệu để tạo ra chức năng sinh lý ở đối tượng, ví dụ, người, tăng cường hoặc hỗ trợ tác dụng điều trị của dược chất thứ hai. Lượng hữu hiệu, bao gồm lượng hữu hiệu điều trị bệnh, hoặc liều của các hợp chất được nêu trong bản mô tả có thể được xác định theo các phương pháp thông thường, như thử nghiệm theo mô hình, thử

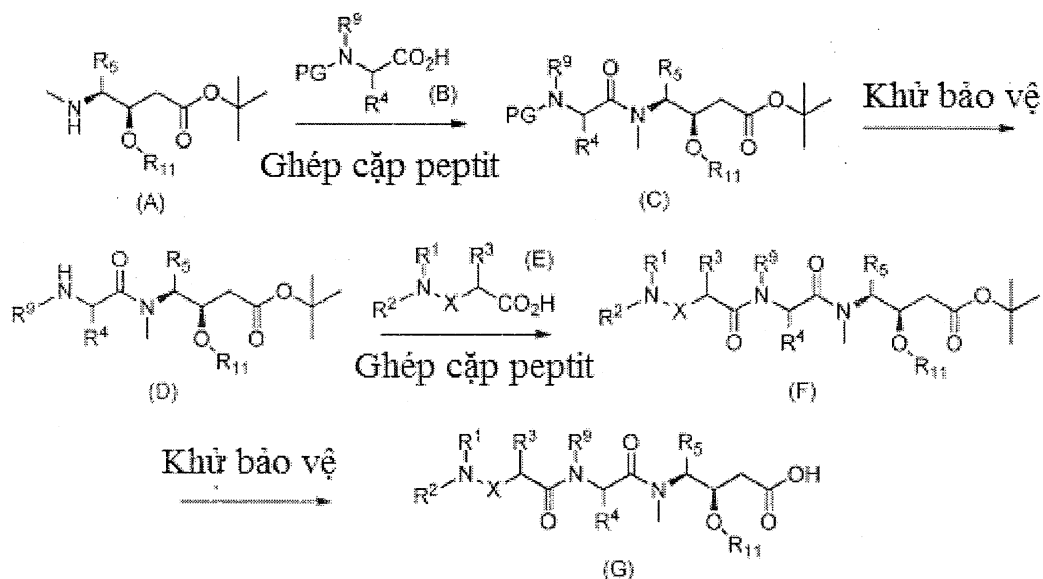
nghiệm tăng dần liều hoặc thử nghiệm lâm sàng, liên quan đến các yếu tố thông thường, ví dụ, cách dùng hoặc đường dùng hoặc phân phối dược chất, dược động học của các chất, mức độ trầm trọng và thời gian lây nhiễm, tình trạng sức khỏe của đối tượng, tình trạng bệnh, và trọng lượng, và sự phán đoán của thầy thuốc điều trị. Liều cụ thể đối với thể tiếp hợp kháng thể dược chất theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 ug đến 2 mg hoạt chất/kilogam thể trọng của khối lượng/ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 100 mg/kg/ngày, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 35 mg/kg/ngày, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 mg/kg/ngày. Tổng liều lượng có thể được đưa ra ở dạng một liều đơn vị hoặc liều lượng đơn vị được chia nhỏ (ví dụ, BID, TID, QID).

Các hợp chất được nêu trong bản mô tả có thể được sử dụng trong dược phẩm hoặc các phương pháp kết hợp với các thành phần hoạt tính bổ sung để điều trị bệnh ung thư. Các thành phần hoạt tính bổ sung có thể được sử dụng riêng rẽ với hợp chất được nêu trong bản mô tả hoặc có thể liên quan đến hợp chất được nêu trong bản mô tả trong dược phẩm nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, các thành phần hoạt tính bổ sung là các thành phần đã biết hoặc được phát hiện ra là có hiệu quả để điều trị bệnh ung thư, bao gồm các thành phần có hoạt tính đối với đích khác liên quan đến bệnh ung thư, như nhưng không chỉ giới hạn ở, Velcade, Rituximab, Methotrexate, Herceptin, Vincristine, Prednisone, Irinotecan, hoặc thành phần tương tự, hoặc dạng kết hợp của nó. Dạng kết hợp như vậy có thể làm tăng hiệu quả, làm giảm một hoặc nhiều tác dụng phụ, hoặc làm giảm liều cần thiết của hợp chất theo sáng chế.

Các hợp chất có công thức (I) được mô tả bằng cách viện dẫn tới các sơ đồ tổng hợp dưới đây để điều chế thông thường và các ví dụ cụ thể sau đây. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực cần phải hiểu rằng, để thu được các hợp chất khác nhau trong bản mô tả này, các nguyên liệu ban đầu có thể được chọn thích hợp sao cho các phân tử thể mong muốn cuối cùng được thực hiện theo sơ đồ phản ứng có hoặc không có sự bảo vệ nếu thích hợp để tạo ra sản phẩm mong muốn. Theo cách khác, có thể cần hoặc mong muốn dùng, ở dạng các phân tử thể mong muốn cuối cùng, nhóm thích hợp có thể được thực hiện theo sơ đồ phản ứng và được thay thế nếu thích hợp cho phân tử thể mong muốn. Ngoài ra, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng các nhóm bảo vệ có thể được sử dụng để bảo vệ các nhóm chức nhất định (amino, carboxy, hoặc nhóm mạch bên) khỏi các điều kiện phản ứng, và các nhóm như vậy được loại bỏ

trong các điều kiện chuẩn nếu thích hợp. Tốt hơn, nếu mỗi phản ứng được mô tả trong Sơ đồ A được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng đến nhiệt độ hồi lưu của dung môi hữu cơ đã được sử dụng. Trừ khi có quy định cụ thể, các biến đổi là như được xác định trên đây để viện dẫn tới Công thức (I).

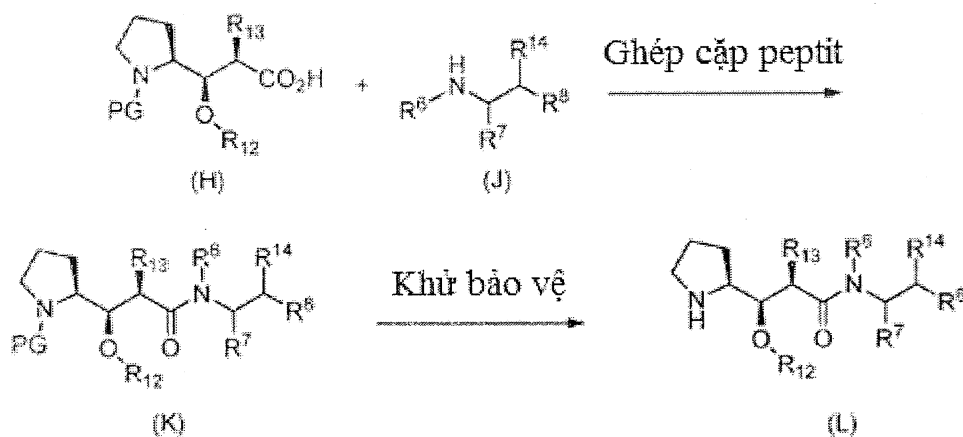
Sơ đồ A



Liên quan đến Sơ đồ A, quy trình bào chế các hợp chất có công thức (I) bắt đầu bằng dạng axit được bảo vệ của dolaisoleuin (Dil) được ký hiệu là (A) (xem Pettit et al. (1994) J. Org. Chem. 59: 1796-1800). Hợp chất (A) được mô tả bằng nhóm bảo vệ *tert*-butyl este, nhưng người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể lựa chọn chất thay thế thích hợp. Việc ghép cặp với valin hoặc dẫn xuất isoleuxin được bảo vệ nitơ (B), trong đó PG là nhóm bảo vệ amin thích hợp như nhóm Boc (*t*-butoxycarbonyl) hoặc florenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), là hữu hiệu trong các điều kiện ghép cặp peptit tiêu chuẩn. Ví dụ, các phản ứng được thực hiện với sự có mặt của diethyl xyanophosphonat (DEPC), PyBrOP, PyBOP, BOP, diisopropylcarbodiimide (DIC), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochlorua (EDCI), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), 1-hydroxy-7-aza-benzotriazol (HOAt), HBTU (*O*-(7-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroni hexaflophosphat), HATU (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroni hexaflophosphat), và chất tương tự, hoặc dạng kết hợp của nó. Các phản ứng thường được thực hiện với sự có mặt của bazơ amin bậc ba, như diisopropyletylamin. Các dung môi thích hợp bao gồm diclometan, *N,N*-

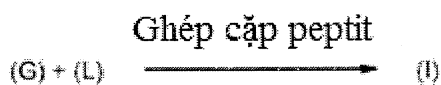
dimethylformamit (DMF), dimetyl sulfoxit (DMSO), etyl axetat và tương tự. Nhóm bảo vệ amin trên dipeptit (C) thu được được loại bỏ bằng cách khử bảo vệ trong các điều kiện thích hợp. Ví dụ, trong đó PG là nhóm Boc, hợp chất (C) được cho phản ứng với axit trifloaxetic để tạo ra amin tự do (D). Trong đó PG là nhóm Fmoc, hợp chất (C) được cho phản ứng với piperidin hoặc diethylamin để tạo ra hợp chất (D). Sau đó, hợp chất (D) được liên hợp với dẫn xuất axit amin (E), ở dạng bảo vệ nếu cần, trong các điều kiện ghép cặp peptit như được mô tả trên đây, để tạo ra tripeptit (F). Cho phản ứng với axit loại nhóm bảo vệ carboxy để tạo ra axit tự do (G).

Sơ đồ B



Liên quan đến sơ đồ B, dolaproin được bảo vệ amino (Dap) được ký hiệu là (H) (xem Pettit *et al.* (1994) J. Org. Chem. 59:6287-6295) được liên hợp với amin (J) (được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này) trong các điều kiện ghép cặp peptit như được mô tả trên đây. Dipeptit (K) thu được được khử bảo vệ như được nêu đối với Sơ đồ A để tạo ra hợp chất (L).

Sơ đồ C



Liên quan đến sơ đồ C, axit (G) và amin (L) được liên hợp trong các điều kiện ghép cặp peptit như được nêu trên để tạo ra các hợp chất có công thức (I). Trong đó sản

phẩm phản ứng là dạng bảo vệ có công thức (I), các điều kiện khử bảo vệ thích hợp được sử dụng để tạo ra hợp chất đích.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa lượng hữu hiệu của ít nhất một hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, và tá được được dụng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng mắc hoặc được chẩn đoán bị bệnh ung thư, bao gồm việc sử dụng cho đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh lượng hữu hiệu của ít nhất một hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng ít nhất một hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng ít nhất một hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong việc sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh.

Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa ít nhất một hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh, và hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến vật phẩm sản xuất chứa ít nhất một hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh.

Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể được chất (ADC) trong đó hợp chất có công thức (I) được tiếp hợp với kháng thể.

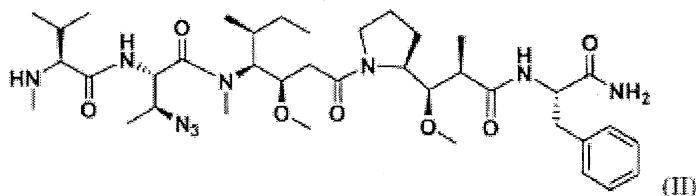
Các ADC cụ thể sử dụng Công thức (I) có cấu trúc sau trong đó “L” hoặc “niAb-s-” là kháng thể đơn dòng FLT3 được ký hiệu CHv62.21 như được nêu trong bản mô tả này.

Ngoài ra, các ADC cụ thể khác sử dụng công thức (I) có cấu trúc sau trong đó “L” hoặc “mAb-s-” là kháng thể đơn dòng FLT3 được ký hiệu CHv62.21pAF như được nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án được ưu tiên, các hợp chất có công thức (I) bao gồm đơn vị được chất chứa hợp chất (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-

metoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-N-methyl-2-((S)-3-methyl-2-(methylamino)butanamido)butanamit.

Theo một phương án được ưu tiên, các hợp chất có công thức (I) bao gồm đơn vị được chất chứa hợp chất được nêu dưới đây có công thức (II):



IX.) Khả năng mang dược chất

Khả năng mang dược chất được thể hiện bằng p và là số lượng trung bình của các gốc dược chất/kháng thể trong phân tử. Khả năng mang dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20 gốc dược chất (D)/kháng thể. ADC theo sáng chế bao gồm tập hợp các kháng thể được tiếp hợp với các gốc dược chất nằm trong khoảng từ 1 đến 20. Số lượng trung bình của các gốc dược chất/kháng thể trong các chế phẩm chứa ADC thu được từ các phản ứng tiếp hợp có thể được đặc trưng bởi các phương pháp thông thường như khối phổ và, thử nghiệm ELISA. Phân phối định lượng ADC liên quan đến p cũng có thể được xác định. Trong một số trường hợp, việc tách, tinh chế, và mô tả đặc điểm của ADC đồng nhất trong đó p là trị số nhất định thu được từ ADC có khả năng mang dược chất khác có thể thu được bằng các phương pháp như điện di.

Đối với một số thể tiếp hợp kháng thể dược chất, p có thể được giới hạn bởi số vị trí liên kết trên kháng thể. Ví dụ, trong đó việc liên kết là xystein thiol, kháng thể có thể chỉ có một hoặc một số nhóm xystein thiol, hoặc có thể chỉ có một hoặc một số nhóm thiol có hoạt tính thích hợp qua liên kết có thể được gắn vào. Theo các phương án nhất định, khả năng mang dược chất cao hơn, ví dụ $p > 5$, có thể gây ra hiện tượng kết tụ, khả năng không hòa tan, độc tính, hoặc giảm tính thẩm tế bào của các thể tiếp hợp kháng thể dược chất nhất định. Theo các phương án nhất định, khả năng mang dược chất đối với ADC theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 đến 8; nằm trong khoảng từ 2 đến 6; nằm trong khoảng từ 3 đến 5; nằm trong khoảng từ 3 đến 4; nằm trong khoảng từ 3,1 đến 3,9; nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,8; nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,7; nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,6; nằm trong khoảng từ 3,3 đến 3,8; hoặc nằm trong khoảng từ 3,3 đến 3,7.

Thực vậy, nhận thấy rằng đối với các ADC nhất định, tỷ lệ tối ưu của các gốc được chất/kháng thể có thể nhỏ hơn 8, và có thể nằm trong khoảng từ 2 đến 5.

Theo các phương án nhất định, số gốc nhỏ hơn số gốc được chất tối đa theo lý thuyết được tiếp hợp với kháng thể trong quá trình phản ứng tiếp hợp. Kháng thể có thể chứa, ví dụ, gốc lysin không phản ứng với chất trung gian liên kết với được chất hoặc chất phản ứng liên kết, như được nêu dưới đây. Nói chung, các kháng thể không chứa nhiều nhóm xystein thiol tự do và có hoạt tính có thể được liên kết với gốc được chất; Thực vậy hầu hết gốc xystein thiol trong các kháng thể có mặt ở dạng cầu nối disulfua. Theo các phương án nhất định, kháng thể có thể được khử bằng chất khử như dithiotreitol (DTT) hoặc tricarboyletylphosphin (TCEP), trong điều kiện khử một phần hoặc toàn bộ, để tạo ra nhóm xystein thiol hoạt tính. Theo các phương án nhất định, kháng thể được đưa vào các điều kiện biến tính để phát hiện các nhóm ái nhân hoạt tính như lysin hoặc xystein.

Khả năng mang (tỷ lệ được chất/kháng thể) của ADC có thể được kiểm soát theo các cách khác nhau, ví dụ, bằng cách: (i) giới hạn số mol dư của chất trung gian qua liên kết được chất hoặc chất phản ứng liên kết đối với kháng thể, (ii) giới hạn thời gian hoặc nhiệt độ của phản ứng tiếp hợp, (iii) điều kiện khử một phần hoặc giới hạn để cải biến xystein thiol, (iv) kỹ thuật tái tổ hợp của trình tự axit amin của kháng thể sao cho số lượng và vị trí của gốc xystein được cải biến để kiểm soát số lượng và/hoặc vị trí của gắn kết giữa liên kết-được chất (như thioMab hoặc thioFab được tạo ra theo sáng chế và trong WO2006/034488 (được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn)).

Cần phải hiểu rằng nếu nhiều hơn một nhóm phản ứng ái nhân với chất trung gian qua liên kết được chất hoặc chất phản ứng liên kết, tiếp đó là chất phản ứng gốc được chất, thì sản phẩm thu được là hỗn hợp chứa các hợp chất ADC với khả năng phân phối một hoặc nhiều gốc được chất được gắn vào kháng thể. Số lượng trung bình của được chất/kháng thể có thể được tính toán từ hỗn hợp bởi thử nghiệm kháng thể ELISA kép, là đặc hiệu với kháng thể và đặc hiệu với được chất này. Các phân tử ADC riêng rẽ có thể được xác định trong hỗn hợp bởi khối phổ và được tách bằng HPLC, ví dụ, sắc ký tương tác kỵ nước (xem, ví dụ, Hamblett, K.J., et al. “ Hamblett, K.J., et al. “Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, và toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate”, Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004

Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). Theo các phương án nhất định, ADC đồng nhất có một trị số mang có thể được tách ra từ hỗn hợp tiếp hợp bằng cách điện di hoặc sắc ký.

X.) Các phương pháp xác định tác dụng gây độc tế bào của ADC

Các phương pháp xác định xem dược chất hoặc thể tiếp hợp kháng thể dược chất có tác dụng kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào hay không là đã biết. Nói chung, hoạt tính gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào của thể tiếp hợp kháng thể dược chất có thể được xác định bằng cách: cho tế bào của động vật có vú biểu hiện protein đích của thể tiếp hợp kháng thể dược chất tiếp xúc với môi trường nuôi cấy tế bào; thực hiện nuôi cấy các tế bào khoảng thời gian từ 6 giờ đến 5 ngày; và xác định khả năng sống sót của tế bào. Các thử nghiệm in vitro trên cơ sở tế bào có thể được sử dụng để xác định khả năng sống sót (tăng sinh), khả năng gây độc tế bào, và cảm ứng gây chết theo chương trình (hoạt hóa caspaza) của thể tiếp hợp kháng thể dược chất.

Để xác định xem thể tiếp hợp kháng thể dược chất có tác dụng kìm hãm tế bào hay không, thử nghiệm kết hợp thymidin có thể được sử dụng. Ví dụ, các tế bào bệnh ung thư biểu hiện kháng nguyên đích ở mật độ 5.000 tế bào/giếng của đĩa 96 giếng có thể được nuôi cấy trong thời gian 72 giờ và được tiếp xúc với 0,5 μCi ^3H -thymidin trong 8 giờ cuối của khoảng thời gian 72 giờ. Việc kết hợp ^3H -thymidin vào các tế bào của môi trường nuôi cấy được xác định với sự có mặt và không có mặt của thể tiếp hợp kháng thể dược chất.

Để xác định hoạt tính gây độc tế bào, khả năng gây hoại tử hoặc chết theo chương trình (gây chết tế bào theo chương trình) có thể được xác định. Khả năng gây hoại tử thường liên quan đến khả năng thấm qua màng huyết tương; khả năng trương nở tế bào, và vỡ màng huyết tương. Hiện tượng gây chết theo chương trình thường được đặc trưng bởi sự phồng màng, ngưng tụ bào chất, và hoạt hóa endonucleaza nội sinh. Việc xác định tác dụng bất kỳ trong số các tác dụng này trên tế bào bệnh ung thư chỉ ra rằng thể tiếp hợp kháng thể dược chất là hữu ích để điều trị bệnh ung thư.

Khả năng sống sót tế bào có thể được xác định bằng cách xác định mức độ hấp thụ thuốc nhuộm trong tế bào như đỏ trung tính, trypan xanh da trời, hoặc xanh da trời ALAMAR™ (xem, ví dụ, Page et al, 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476). Trong thử nghiệm này, các tế bào được ủ trong môi trường chứa thuốc nhuộm, các tế bào được rửa, và phần thuốc nhuộm còn lại, phản ánh mức độ hấp thụ tế bào của thuốc nhuộm, được đo bằng phổ quang kế. Thuốc nhuộm gắn kết với protein sulforhodamin B (SRB) cũng có thể được sử dụng để xác định hoạt tính gây độc tế bào (Skehan et al, 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107-12).

Theo cách khác, muối tetrazolium, như MTT, được sử dụng trong thử nghiệm định lượng so màu đối với khả năng sống và tăng sinh của tế bào động vật có vú bằng cách phát hiện tế bào sống, chứ không phải tế bào đã chết (xem, ví dụ, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

Khả năng gây chết theo chương trình có thể được định lượng bằng cách xác định, ví dụ, quá trình tạo mảnh ADN. Phương pháp đo sáng thương mại để định lượng quá trình tạo mảnh ADN in vitro là có sẵn trên thị trường. Ví dụ về các thử nghiệm này, bao gồm TUNEL (phát hiện sự kết hợp nucleotit được đánh dấu trong ADN đã được tạo mảnh) và thử nghiệm trên cơ sở ELISA, được mô tả trong Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Khả năng gây chết theo chương trình cũng có thể được xác định bằng cách xác định sự thay đổi về hình thái trong tế bào. Ví dụ, đối với việc gây hoại tử, việc giảm tính nguyên vẹn của màng huyết tương có thể được xác định bằng cách đo mức độ hấp thụ của các thuốc nhuộm nhất định (ví dụ, thuốc nhuộm phát huỳnh quang như, ví dụ, acridine màu da cam hoặc ethidi bromua). Phương pháp xác định khả năng gây chết theo chương trình của nhiều tế bào được mô tả bởi Duke và Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Các tế bào cũng có thể được đánh dấu bằng thuốc nhuộm ADN (ví dụ, acridine màu da cam, ethidi bromua, hoặc propidium iodua) và các tế bào quan sát được về sự ngưng tụ chất nhiễm sắc và sự bám dọc theo màng nhân bên trong. Sự thay đổi về hình thái khác có thể được đo để xác định khả năng gây chết theo chương trình bao gồm, ví dụ, sự ngưng tụ bào chất, gia tăng sự phồng màng, và sự co tế bào.

Sự có mặt của các tế bào chết theo chương trình có thể được xác định ở cả thành phần được gắn vào lẫn thành phần “nổi lên” của môi trường nuôi cấy. Ví dụ, cả hai thành phần này có thể được thu gom bằng cách loại bỏ dịch nổi trên bề mặt, trypsin hóa các tế bào đã được gắn vào, kết hợp các chế phẩm sau bước rửa ly tâm (ví dụ, 10 phút ở 2000 vòng/phút), và phát hiện hiện tượng gây chết theo chương trình (ví dụ, bằng cách xác định sự tạo mảnh ADN). (Xem, ví dụ, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

Mức độ ảnh hưởng *in vivo* của chế phẩm điều trị bệnh FLT3 có thể được đánh giá ở mô hình động vật thích hợp. Ví dụ, mô hình bệnh ung thư dị ghép có thể được sử dụng, trong đó mô cấy bên ngoài hoặc mô cấy bên ngoài đã cấy truyền của bệnh ung thư được đưa vào vào động vật bị tổn thương hệ miễn dịch, như chuột vô hiệu hoặc chuột nhất SCID (Klein et al, 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408). Ví dụ, Đơn yêu cầu cấp patent WO98/16628 và Patent Mỹ 6,107,540 mô tả các mô hình dị ghép khác nhau của bệnh ung thư tiền liệt tuyến của người có thể tóm tắt sự phát triển của khối u sơ cấp, di căn kích thước nhỏ, và sự tạo ra di căn nguyên bào xương ở giai đoạn cuối của bệnh. Hiệu quả này có thể được dự đoán bằng cách sử dụng các thử nghiệm xác định khả năng ức chế sự tạo ra khối u, mức thoái biến hoặc di căn khối u, và yếu tố tương tự.

Các thử nghiệm *in vivo* đánh giá sự tiến triển của hiện tượng gây chết theo chương trình là hữu ích trong việc đánh giá các chế phẩm điều trị bệnh. Theo một phương án, các mảnh dị ghép thu được từ chuột nhất mang khối u đã được điều trị bằng chế phẩm điều trị bệnh có thể được xét nghiệm về sự có mặt của quá trình gây chết theo chương trình tập trung và được so sánh với chuột nhất mang dị ghép đối chứng không được điều trị. Mức độ gây chết theo chương trình tập trung được tìm thấy trong các khối u của chuột nhất đã được điều trị cung cấp hiệu quả điều trị của chế phẩm.

Chế phẩm điều trị bệnh đã sử dụng trên thực tế về các phương pháp nêu trên có thể được bào chế thành được phẩm chứa chất mang thích hợp đối với phương pháp phân phối mong muốn. Các chất mang thích hợp bao gồm nguyên liệu bất kỳ mà khi kết hợp với chế phẩm điều trị bệnh vẫn giữ được tác dụng kháng khối u của chế phẩm điều trị bệnh này và thường không phản ứng với hệ miễn dịch của đối tượng bị bệnh. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất mang bất kỳ trong số nhiều chất mang được dùng tiêu chuẩn như dung dịch muối đệm phosphat vô trùng, nước kìm hãm vi khuẩn, và chất

mang tương tự (xem, nói chung, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Chế phẩm điều trị bệnh có thể được hòa tan và được sử dụng qua đường bất kỳ có khả năng phân phối chế phẩm điều trị bệnh vào vị trí khối u. Đường dùng hữu hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tĩnh mạch, ngoài đường tiêu hóa, trong màng bụng, trong cơ, trong khối u, trong da, trong cơ quan, tại vị trí, và đường dùng tương tự. Chế phẩm dùng để tiêm tĩnh mạch được ưu tiên chứa chế phẩm điều trị bệnh trong dung dịch chứa nước kim hãm vi khuẩn được bảo quản, nước vô trùng không được bảo quản, và/hoặc được pha loãng trong các túi polyvinylclorua hoặc polyetylen chứa 0,9% natri clorua vô trùng dùng để tiêm, Dược điển Mỹ. Chế phẩm protein điều trị bệnh có thể được đông khô nhanh và cất giữ ở dạng bột vô trùng, tốt hơn là trong chân không, và sau đó được hoàn nguyên trong nước kim hãm vi khuẩn (chứa, ví dụ, chất bảo quản rượu benzylic) hoặc trong nước vô trùng trước khi tiêm.

Liều lượng và cách dùng để điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng các phương pháp nêu trên sẽ thay đổi theo phương pháp và bệnh ung thư đích, và nói chung sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa nhiều hơn một loại ADC theo sáng chế do sự cải biến Mab CHv62.21 hoặc kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF. Ví dụ, sáng chế bao gồm dược phẩm chứa ADC theo sáng chế, trong đó kháng thể đơn dòng CHv62.21 là kháng thể không có chuỗi nặng lysin có đầu tận cùng C, kháng thể có đoạn cải biến sau dịch mã có đầu tận cùng N, kháng thể không có chuỗi nặng lysin có đầu tận cùng C và có cải biến sau dịch mã có đầu tận cùng N, và/hoặc kháng thể có chuỗi nặng lysin có đầu tận cùng C và không có đoạn cải biến sau dịch mã có đầu tận cùng N.

Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế bao gồm dược phẩm chứa hai hoặc nhiều loại ADC theo sáng chế, trong đó kháng thể đơn dòng CHv62.21 của ADC được chọn từ nhóm bao gồm 1) đến 4) sau:

1) Kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

2) Kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

3) Kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (Q) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10; và

4) Kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và Mab CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (Q) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm cả dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (Q) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và Mab CHv62.21 chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 trong đó

gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc 453 có đầu tận cùng C (K) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm theo sáng chế bao gồm dược phẩm chứa hai hoặc nhiều loại ADC theo sáng chế, trong đó kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF của ADC được chọn từ nhóm bao gồm 1) đến 4) sau:

1) Kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

2) Kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10;

3) Kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (Q) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng C 443 (T) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10; và

4) Kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc 1 có đầu tận cùng C 443 (T) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm cả dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C)

của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và MAb CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (Q) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc có đầu tận cùng C 443 (T) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm cả dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (Q) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc có đầu tận cùng C 443 (T) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và MAb CHv62.21pAF chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (E) đến gốc 453 (K) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 trong đó gốc 1 có đầu tận cùng N (E) được chuyển hóa thành axit pyroglutamic và gốc có đầu tận cùng C 443 (T) được loại bỏ và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ gốc 1 (D) đến gốc 214 (C) của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

XI.) Điều trị bệnh ung thư biểu hiện FLT3

Việc nhận diện FLT3 là protein thường được biểu hiện trong tập hợp các mô hoặc tế bào giới hạn, nhưng cũng được biểu hiện trong bệnh ung thư như chúng được nêu trong bảng I, mở ra nhiều phương pháp điều trị bệnh để điều trị các bệnh ung thư này.

Đáng lưu ý là, phương pháp điều trị bệnh kháng khối u đích là hữu ích ngay cả khi protein đích được biểu hiện trên các mô hoặc tế bào bình thường, bao gồm mô của cơ quan quan trọng bình thường. Cơ quan quan trọng là cơ quan cần thiết để duy trì sự sống, như tim hoặc ruột kết. Cơ quan không quan trọng là cơ quan có thể được loại bỏ mà cá thể vẫn có thể sống được. Ví dụ về cơ quan không quan trọng là buồng trứng, ngực, và tuyến tiền liệt.

Sự biểu hiện protein đích ở mô bình thường, bao gồm mô quan trọng bình thường, không ảnh hưởng tới lợi ích của dược chất đích đối với protein làm chất điều trị các khối u nhất định trong đó protein cũng được biểu hiện quá mức. Ví dụ, sự biểu hiện ở các cơ quan quan trọng không nằm trong và không gây hại. Ngoài ra, các cơ quan được coi như có thể không cần thiết, như tuyến tiền liệt và buồng trứng, có thể được loại bỏ mà không ảnh hưởng tới việc tử vong. Cuối cùng, một số cơ quan quan trọng không bị ảnh hưởng

bởi sự biểu hiện của cơ quan bình thường do sự ưu tiên về mặt miễn dịch. Các cơ quan được ưu tiên về mặt miễn dịch là các cơ quan được bảo vệ khỏi máu bởi hàng rào máu-cơ quan và do đó không dễ bị ảnh hưởng tới liệu pháp miễn dịch. Ví dụ về các cơ quan được ưu tiên về mặt miễn dịch là não và tinh hoàn.

Do đó, phương pháp điều trị bệnh ức chế hoạt tính của protein FLT3 là hữu ích đối với các đối tượng bị bệnh ung thư biểu hiện FLT3 (như, ví dụ, các bệnh ung thư nêu trong Bảng I). Các phương pháp điều trị bệnh thường thuộc ba nhóm. Nhóm thứ nhất điều hòa chức năng FLT3 như nó liên quan đến sự phát triển tế bào khối u dẫn đến sự ức chế hoặc kìm hãm sự phát triển tế bào khối u hoặc tiêu diệt nó. Nhóm thứ hai bao gồm các phương pháp khác nhau để ức chế khả năng gắn kết hoặc liên hợp protein FLT3 với thành phần gắn kết của nó hoặc với các protein khác. Nhóm thứ ba bao gồm nhiều phương pháp để ức chế sự phiên mã gen FLT3 hoặc dịch mã ARN thông tin của FLT3.

Do đó, các đối tượng bị bệnh ung thư có thể được đánh giá về sự có mặt và nồng độ biểu hiện FLT3, tốt hơn là sử dụng phương pháp đánh giá mô hóa miễn dịch của mô khối u, chụp FLT3 định lượng, hoặc kỹ thuật khác chỉ ra một cách chắc chắn sự có mặt và mức độ biểu hiện FLT3. Phân tích mô hóa miễn dịch của việc sinh thiết khối u hoặc các mẫu phẫu thuật được ưu tiên nhằm mục đích này, nếu dùng. Các phương pháp phân tích mô hóa miễn dịch mô khối u đã biết trong lĩnh vực này.

XIII.) FLT3 làm đích để điều trị bệnh trên cơ sở kháng thể

FLT3 là đích hấp dẫn đối với các chiến lược trên cơ sở kháng thể. Nhiều chiến lược về kháng thể đã biết trong lĩnh vực này để kháng các phân tử ngoại bào lẫn nội bào (xem, ví dụ, bổ thể và quá trình tiêu diệt qua trung gian ADCC cũng như việc sử dụng các thể). Do FLT3 được thể hiện bởi các tế bào bệnh ung thư của dòng khác nhau đối với các tế bào bình thường tương ứng, nên việc sử dụng toàn thân chế phẩm có hoạt tính miễn dịch với FLT3 được tạo ra có độ nhạy mỹ mãn mà không gây độc, không đặc hiệu và/hoặc không hướng đích do quá trình gắn kết của chế phẩm có hoạt tính miễn dịch với các cơ quan và các mô không hướng đích. Các kháng thể cụ thể có hoạt tính với miền của FLT3 là hữu ích để điều trị bệnh ung thư biểu hiện FLT3 toàn thân, tốt hơn là ở dạng thể tiếp hợp kháng thể được chất (tức là ADC) trong đó thể tiếp hợp này có hoạt tính với độc tố hoặc được chất điều trị bệnh.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng các kháng thể có thể được sử dụng để hướng đích và gắn kết đặc hiệu với phân tử gây miễn dịch như vùng gây miễn dịch của trình tự FLT3 được thể hiện trên Fig.1. Ngoài ra, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng có thể dễ dàng tiếp hợp các kháng thể với dược chất gây độc tế bào (xem, ví dụ, Slevers et al. *Blood* 93: 11 3678-3684 (June 1, 1999)). Khi dược chất gây độc tế bào và/hoặc dược chất điều trị bệnh được phân phối trực tiếp tới các tế bào, như bằng cách tiếp hợp chúng với các kháng thể đặc hiệu với phân tử đã được biểu hiện bởi tế bào đó (ví dụ, FLT3), thì dược chất gây độc tế bào sẽ có tác dụng sinh học đã biết (tức là gây độc tế bào) trên các tế bào đó.

Nhiều chế phẩm và phương pháp sử dụng thể tiếp hợp kháng thể dược chất gây độc tế bào để tiêu diệt tế bào T đã biết trong lĩnh vực này. Đối với bệnh ung thư, các phương pháp thông thường chỉ ra việc cho động vật có vú có khối u dùng lượng hữu hiệu sinh học của thể tiếp hợp chứa dược chất gây độc tế bào và/hoặc dược chất điều trị bệnh đã chọn liên kết với dược chất đích (ví dụ, kháng thể đơn dòng FLT3, tốt hơn là CHv62.21 hoặc CHv62.21pAF) gắn kết với kháng nguyên (ví dụ, FLT3) đã được biểu hiện, dễ bị ảnh hưởng tới khả năng gắn kết hoặc được nằm trên bề mặt tế bào. Theo phương án thông thường, phương pháp phân phối dược chất gây độc tế bào và/hoặc dược chất điều trị bệnh để biểu hiện FLT3 ở tế bào, bao gồm việc tiếp hợp giữa dược chất gây độc tế bào với kháng thể mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop FLT3, và cho tế bào tiếp xúc với thể tiếp hợp kháng thể dược chất (ADC). Phương án minh họa khác là phương pháp điều trị cho cá thể nghi mắc bệnh ung thư đã di căn, bao gồm bước dùng ngoài đường tiêu hóa cho cá thể này dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị bệnh của kháng thể được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào và/hoặc dược chất điều trị bệnh.

Phương pháp điều trị miễn dịch bệnh ung thư bằng cách sử dụng Kháng thể FLT3 có thể được thực hiện theo các phương pháp khác nhau được sử dụng thành công để điều trị các loại bệnh ung thư khác, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư ruột kết (Arlen et al, 1998, *Crit. Rev. Immunol.* 18: 133-138), u đa tủy (Ozaki et al, 1997, *Blood* 90:3179-3186, Tsunenari et al, 1997, *Blood* 90:2437-2444), bệnh ung thư dạ dày (Kasprzyk et al, 1992, *Cancer Res.* 52:2771-2776), u bạch huyết tế bào B (Funakoshi et al, 1996, *J. Immunother. Emphasis Tumors Immunol.* 19:93-101), bệnh bạch cầu (Zhong et al, 1996, *Leuk. Res.* 20:581-589), bệnh ung thư trực tràng (Moun et al, 1994, *Cancer*

Res. 54:6160-6166; Velders et al, 1995, Cancer Res. 55:4398-4403), và bệnh ung thư vú (Shepard et al, 1991, J. Clin. Immunol. 11: 117-127). Một số phương pháp điều trị bệnh liên quan đến việc tiếp hợp kháng thể trần với độc tố hoặc đồng vị phóng xạ, như lần lượt tiếp hợp Y^{91} hoặc I^{131} với kháng thể kháng CD20 (ví dụ, ZevalinTM, IDEC Pharmaceutical Corp. hoặc BexxarTM, Coulter Pharmaceuticals), đồng thời phương pháp khác liên quan đến việc sử dụng đồng thời các kháng thể và các dược chất điều trị bệnh khác, như HerceptinTM (trastuzumab) với paclitaxel (Genentech, Inc.). Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể được tiếp hợp với dược chất gây độc tế bào nêu trên, tốt hơn là dẫn xuất aurastatin được ký hiệu là MMAE (Seattle Genetics).

Mặc dù việc điều trị bệnh bằng kháng thể FLT3 là hữu ích đối với toàn bộ giai đoạn của bệnh ung thư, nhưng việc điều trị bệnh bằng kháng thể có thể đặc biệt là thích hợp ở bệnh ung thư nặng hoặc di căn. Việc điều trị bằng phép điều trị bệnh kháng thể theo sáng chế được chỉ định đối với các đối tượng bị bệnh được nhận một hoặc nhiều chu kỳ hóa điều trị bệnh. Theo cách khác, việc điều trị bệnh bằng kháng thể theo sáng chế được kết hợp với phác đồ hóa điều trị bệnh hoặc xạ trị đối với các đối tượng bị bệnh không được nhận việc điều trị bằng hóa điều trị bệnh. Ngoài ra, việc điều trị bệnh bằng kháng thể có thể cho phép sử dụng lượng hóa điều trị bệnh giảm, đặc biệt là đối với các đối tượng bị bệnh không dung nạp tốt độc tính của dược chất hóa trị liệu. Fan et al. (Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), Prewett et al. (International J. of Onco. 9:217-224, 1996), và Hancock et al. (Cancer Res. 51:4575-4580, 1991) mô tả việc sử dụng các kháng thể khác nhau cùng với dược chất hóa trị liệu.

Kháng thể FLT3 đơn dòng điều trị bệnh ung thư nêu trong Bảng I bao gồm kháng thể bắt đầu tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với khối u hoặc chúng trực tiếp gây độc tế bào. Về mặt này, kháng thể FLT3 đơn dòng (MAb) có thể phân giải tế bào khối u theo cơ chế gây độc tế bào qua trung gian bổ sung hoặc phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), cả hai cơ chế này đòi hỏi phần Fc nguyên vẹn của phân tử globulin miễn dịch để tương tác với vị trí thụ thể Fc của tế bào tác động trên các protein bổ sung. Ngoài ra, kháng thể đơn dòng FLT3 có tác dụng sinh học trực tiếp đối với sự phát triển khối u là hữu ích để điều trị bệnh ung thư mà biểu hiện FLT3. Cơ chế mà kháng thể đơn dòng tác động trực tiếp gây độc tế bào bao gồm: ức chế sự phát triển của phát triển, điều hòa quá trình biệt hóa tế bào, điều hòa profin của yếu tố tạo khối u, và cảm ứng gây chết theo chương trình. Cơ

chế mà kháng thể đơn dòng FLT3 cụ thể có tác dụng kháng khối u được đánh giá bằng cách sử dụng nhiều thử nghiệm in vitro bất kỳ nhằm đánh giá khả năng chết của tế bào như ADCC, phân giải tế bào qua trung gian bổ sung, và v.v., như thường đã biết trong lĩnh vực này.

Do đó, các kháng thể đơn dòng được ưu tiên được sử dụng trong các phương pháp điều trị theo sáng chế là kháng thể có chiều dài đầy đủ của người và gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên FLT3 đích với ái lực cao.

XIV.) Dung dịch hỗn hợp ADC chứa FLT3

Các phương pháp điều trị theo sáng chế dự định dùng ADC chứa FLT3 riêng lẻ cũng như dạng kết hợp, hoặc dung dịch hỗn hợp, của các kháng thể đơn dòng khác nhau (tức là kháng thể đơn dòng FLT3 hoặc kháng thể đơn dòng gắn kết với protein khác). Dung dịch hỗn hợp kháng thể đơn dòng như vậy có thể có các ưu điểm nhất định do chúng chứa kháng thể đơn dòng kháng các epitop khác nhau, có cơ chế tác động khác nhau hoặc kết hợp kháng thể đơn dòng gây độc tế bào trực tiếp với kháng thể đơn dòng dựa vào chức năng tác động miễn dịch. Các kháng thể đơn dòng ở dạng kết hợp như vậy có thể có tác dụng điều trị hiệp đồng. Ngoài ra, kháng thể đơn dòng FLT3 có thể được sử dụng đồng thời với các phương thức điều trị khác, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở được chất hóa trị liệu và sinh học khác nhau, chất phong bế androgen, chất điều hòa miễn dịch (ví dụ, IL-2, GM-CSF), phẫu thuật hoặc xạ trị. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đơn dòng FLT3 được sử dụng ở dạng tiếp hợp.

Chế phẩm ADC chứa FLT3 được sử dụng qua đường bất kỳ có khả năng phân phối các kháng thể tới tế bào khối u. Các đường dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, trong khối u, trong da, và được tương tự. Việc điều trị thường bao gồm việc sử dụng nhắc lại chế phẩm ADC chứa FLT3, thông qua đường dùng có thể chấp nhận được như tiêm tĩnh mạch (IV), thông thường với liều nằm trong khoảng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, hoặc 25 mg/kg thể trọng. Nói chung, liều dùng nằm trong khoảng từ 10 đến 1000 mg MAb/tuần là hữu hiệu và dung nạp tốt.

Dựa trên kinh nghiệm lâm sàng của Herceptin® (Trastuzumab) để điều trị bệnh ung thư vú di căn, liều mang ban đầu xấp xỉ 4 mg/kg thể trọng của đối tượng bị bệnh theo đường IV, tiếp đó là liều hằng tuần khoảng 2 mg/kg theo đường IV của chế phẩm MAb

đưa ra phác đồ dùng liều có thể chấp nhận được. Tốt hơn, nếu liều ban đầu được sử dụng ở 90 phút hoặc tiêm truyền trong thời gian dài hơn. Liều duy trì theo chu kỳ được sử dụng ở 30 phút hoặc tiêm truyền trong thời gian dài hơn, với điều kiện liều ban đầu được dung nạp tốt. Như đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, các yếu tố khác nhau có thể ảnh hưởng tới phác đồ dùng liều lý tưởng trong trường hợp cụ thể. Các yếu tố như vậy bao gồm, ví dụ, ái lực gắn kết và thời gian bán thải của kháng thể đơn dòng đã được sử dụng, mức độ biểu hiện FLT3 ở đối tượng bị bệnh, mức độ chứa tuần hoàn kháng nguyên FLT3, nồng độ kháng thể ở trạng thái ổn định mong muốn, số lần điều trị, và sự ảnh hưởng của các dược chất hóa trị liệu hoặc dược chất khác đã sử dụng kết hợp với phương pháp điều trị theo sáng chế, cũng như tình trạng sức khỏe của đối tượng bị bệnh cụ thể.

Tuỳ ý, các đối tượng bị bệnh cần được đánh giá về mức độ FLT3 trong mẫu nhất định (ví dụ, nồng độ tuần hoàn của kháng nguyên FLT3 và/hoặc tế bào biểu hiện FLT3) để hỗ trợ trong việc xác định phác đồ liều hữu hiệu nhất, v. v... Các đánh giá như vậy cũng được sử dụng nhằm mục đích kiểm soát trong quá trình điều trị bệnh, và là hữu ích để đánh giá sự thành công của việc điều trị kết hợp với sự đánh giá của các thông số khác (ví dụ, nồng độ tế bào niệu và/hoặc nồng độ tế bào miễn dịch trong việc điều trị bệnh ung thư bàng quang, hoặc bằng chất tương tự, nồng độ PSA trong huyết thanh trong việc điều trị bệnh ung thư tiền liệt tuyến).

Mục đích của sáng chế là tạo ra Các ADC chứa FLT3, ức chế hoặc làm chậm sự phát triển các tế bào khối u biểu hiện FLT3. Mục đích khác của sáng chế này là tạo ra các phương pháp ức chế sự tạo mạch và chức năng sinh học khác và nhờ đó làm giảm sự phát triển khối u ở động vật có vú, tốt hơn là người, bằng cách sử dụng ADC chứa FLT3 này, và cụ thể sử dụng ADC chứa FLT3 này kết hợp với dược chất khác hoặc dược chất điều trị bệnh có hoạt tính miễn dịch.

XV.) Điều trị bệnh kết hợp

Theo một phương án, thu được tác dụng hiệp đồng khi khối u, bao gồm khối u của người, được điều trị bằng các ADC chứa FLT3 kết hợp với dược chất hóa trị liệu hoặc xạ trị hoặc dạng kết hợp của nó. Mặt khác, việc ức chế sự phát triển của khối u bởi ADC chứa FLT3 được tăng cường nhiều hơn mong muốn khi kết hợp với dược chất hóa trị liệu hoặc xạ trị hoặc dạng kết hợp của nó. Tác dụng hiệp đồng có thể được chỉ ra, ví dụ, bằng

cách ức chế mạnh sự phát triển khối u bằng được chất điều trị kết hợp hơn so với tác dụng mong muốn thu được từ việc điều trị chỉ của ADC chứa FLT3 hoặc tác dụng bổ sung của việc điều trị bằng ADC chứa FLT3 và được chất hóa trị liệu hoặc xạ trị. Tốt hơn, nếu tác dụng hiệp đồng được chứng minh bằng cách thuyên giảm bệnh ung thư trong đó sự thuyên giảm không mong muốn thu được từ việc điều trị từ ADC chứa FLT3 hoặc kết hợp với việc điều trị sử dụng dạng kết hợp bổ sung của ADC chứa FLT3 và được chất hóa trị liệu hoặc xạ trị.

Phương pháp ức chế phát triển các tế bào khối u bằng cách sử dụng ADC chứa FLT3 và dạng kết hợp của hóa điều trị bệnh hoặc xạ trị hoặc cả hai loại này bao gồm việc sử dụng ADC chứa FLT3 trước, trong, hoặc sau khi bắt đầu dùng được chất hóa trị liệu hoặc xạ trị điều trị bệnh, cũng như dạng kết hợp bất kỳ của nó (tức là trước và trong, trước và sau, trong và sau, hoặc trước, trong, và sau khi bắt đầu dùng được chất hóa trị liệu và/hoặc xạ trị điều trị bệnh). Ví dụ, ADC chứa FLT3 thường được sử dụng trong thời gian từ 1 đến 60 ngày, tốt hơn từ 3 đến 40 ngày, tốt hơn nữa từ 5 đến 12 ngày trước khi bắt đầu xạ trị và/hoặc hóa điều trị bệnh. Tuy nhiên, tùy thuộc vào quy trình điều trị và nhu cầu cụ thể của đối tượng bị bệnh, phương pháp được thực hiện theo cách mà tạo ra tác dụng điều trị hữu hiệu nhất và cuối cùng là kéo dài thời gian sống của đối tượng bị bệnh.

Việc sử dụng được chất hóa trị liệu có thể được thực hiện theo nhiều cách bao gồm đường dùng toàn thân như ngoài đường ruột và trong đường ruột. Theo một phương án, ADC chứa FLT3 và được chất hóa trị liệu được sử dụng ở dạng phân tử riêng rẽ. Ví dụ cụ thể về được chất hóa trị liệu hoặc hóa điều trị bệnh bao gồm xisplatin, dacarbazine (DTIC), dactinomycin, mecloetamin (mù tạc nito), streptozocin, xyclophosphamit, carmustine (BCNU), lomustine (CCNU), doxorubixin (adriamycin), daunorubicin, procarbazine, mitomycin, xytarabin, etoposide, methotrexate, 5-flouraxil, vinblastine, vincristine, bleomycin, paclitaxel (taxol), doxetaxel (taxotere), aldesleukin, asparaginase, busulfan, carboplatin, cladribine, dacarbazine, floxuridine, fludarabine, hydroxyure, ifosfamid, interferon alpha, leuprolide, megestrol, melphalan, mercaptopurin, plicamycin, mitotane, pegaspargase, pentostatin, pipobroman, plicamycin, streptozocin, tamoxifen, teniposide, testolacton, thioguanin, thiotepa, mù tạc uraxil, vinorelbine, gemcitabine, clorambuxil, taxol và dạng kết hợp của nó.

Nguồn xạ trị, được sử dụng kết hợp với ADC chứa FLT3, có thể là trong hoặc ngoài đối tượng bị bệnh cần điều trị. Khi nguồn này nằm ngoài đối tượng bị bệnh, thì việc điều trị bệnh được biết là điều trị bệnh xạ trị bằng chùm tia bên ngoài (external beam radiation therapy - EBRT). Khi nguồn xạ trị là nguồn bên trong đối tượng bị bệnh, nên việc điều trị được gọi là cận xạ trị (brachytherapy - BT).

Phác đồ điều trị được mô tả nêu trên có thể được kết hợp tiếp với dược chất điều trị bệnh ung thư bổ sung và/hoặc phác đồ điều trị, ví dụ, hóa điều trị bệnh bổ sung, vaccin trị bệnh ung thư, chất ức chế sự dẫn truyền tín hiệu, dược chất hữu ích để điều trị sự phát triển bất thường của tế bào hoặc bệnh ung thư, các kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng CTLA-4 như được mô tả trong WO/2005/092380 (Pfizer)) hoặc các phối tử khác ức chế sự phát triển khối u bằng cách gắn kết với IGF-1R, và xytokin.

Khi động vật có vú được cho dùng dược chất hóa trị liệu bổ sung, thì dược chất hóa trị liệu nêu trên có thể được sử dụng. Ngoài ra, chất ức chế yếu tố phát triển, chất cải biến đáp ứng sinh học, dược chất điều trị bệnh kháng hormon, chất điều hòa thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor modulator - SERM), chất ức chế sự tạo mạch, và chất kháng androgen có thể được sử dụng. Ví dụ, chất kháng hormon, ví dụ, chất kháng estrogen như Nolvadex (tamoxifen) hoặc, chất kháng androgen như Casodex (4'-xyano-3-(4-flophenylsulphonyl)-2-hydroxy-2-metyl-3- '-(triflometyl)propionanilit) có thể được sử dụng.

Phương pháp điều trị bệnh nêu trên có thể được kết hợp với phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp phẫu thuật, phác đồ hóa điều trị bệnh hoặc xạ trị. Phương pháp điều trị bệnh theo sáng chế có thể sử dụng liều giảm của dược chất hóa trị liệu (hoặc các phương pháp điều trị khác) và/hoặc số lần dùng ít hơn, có lợi cho toàn bộ các đối tượng bị bệnh và đặc biệt là đối với đối tượng bị bệnh không dung nạp độc tính của dược chất hóa trị liệu.

XVI.) Kit/vật phẩm sản xuất

Để thử nghiệm, tiên lượng, phòng ngừa, chẩn đoán và điều trị được nêu trong bản mô tả, kit là nằm trong phạm vi của sáng chế. Kit này có thể bao gồm chất mang, đồ bao gói, hoặc đồ chứa được chứa trong khoang để nhận một hoặc nhiều đồ chứa như lọ nhỏ, ống, và đồ chứa tương tự, mỗi đồ chứa chứa một trong số các đồ riêng rẽ cần dùng trong phương pháp, cùng với nhãn hoặc tờ rơi chứa hướng dẫn sử dụng, như cách sử dụng được

nêu trong bản mô tả. Ví dụ, đồ chứa có thể bao gồm kháng thể được hoặc có thể được đánh dấu để phát hiện. Kit này có thể bao gồm đồ chứa chứa đơn vị được chất. Kit này có thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần trình tự axit amin được thể hiện trên Fig.2A, 2B và/hoặc 2C, hoặc Fig.3A, 3B và/hoặc 3C hoặc các chất tương tự của nó, hoặc phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin này.

Kit theo sáng chế thường bao gồm đồ chứa nêu trên và một hoặc nhiều đồ chứa khác cùng với nó mà bao gồm các nguyên liệu mong muốn từ quan điểm thương mại và người dùng, bao gồm chất đệm, chất pha loãng, chất lọc, kim tiêm, xi-lanh; chất mang, đồ bao gói, đồ chứa, lọ nhỏ và/hoặc nhãn của ống đưa ra thành phần và/hoặc hướng dẫn sử dụng, và tờ rơi của đồ bao gói kèm theo hướng dẫn sử dụng.

Nhãn có thể có mặt trên hoặc trong đồ chứa để chỉ ra thành phần đã được sử dụng để điều trị bệnh cụ thể hoặc không phải để điều trị, như tiên lượng, phòng ngừa, chẩn đoán hoặc dùng để thí nghiệm, và cũng có thể chỉ ra hướng sử dụng in vivo hoặc in vitro, như các loại được nêu trong bản mô tả. Hướng dẫn và hoặc thông tin khác cũng có thể bao gồm trên tờ rơi hoặc nhãn mà kèm theo hoặc nằm trên kit. Nhãn này có thể nằm trên hoặc kèm theo đồ chứa. Nhãn có thể nằm trên đồ chứa khi các chữ cái, số lượng hoặc đặc điểm khác tạo nên nhãn này được đúc hoặc khắc lên chính đồ chứa; nhãn có thể được kèm theo đồ chứa khi nó có mặt trong chỗ chứa hoặc chất mang cũng giữ đồ chứa này, ví dụ, ở dạng tờ rơi của đồ bao gói. Nhãn này có thể chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để chẩn đoán, điều trị, phòng ngừa hoặc tiên lượng tình trạng bệnh lý, như bệnh ung thư của mô được nêu trong Bảng I.

Thuật ngữ “kit” và “vật phẩm sản xuất” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Theo một phương án khác của sáng chế, vật phẩm sản xuất chứa chế phẩm, như kháng thể, hoặc thể tiếp hợp kháng thể được chất (ADC) ví dụ, các nguyên liệu hữu ích để chẩn đoán, tiên lượng, điều trị dự phòng và/hoặc điều trị bệnh ung thư các mô như các mô được nêu trong Bảng I. Vật phẩm sản xuất thường bao gồm ít nhất một đồ chứa và ít nhất một nhãn. Đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, các chai, lọ nhỏ, xi-lanh, và ống thử nghiệm. Đồ chứa có thể được tạo ra từ nhiều nguyên liệu như thủy tinh, kim loại hoặc chất dẻo. Đồ chứa có thể mang trình tự axit amin, phân tử nhỏ, trình tự axit nucleic, quần thể tế bào và/hoặc kháng thể. Theo một phương án khác, đồ chứa chứa kháng thể, mảnh gắn kết của nó hoặc protein gắn kết đặc hiệu để dùng trong việc đánh giá sự biểu hiện

protein của FLT3 trong các tế bào và mô, hoặc để thí nghiệm, tiên lượng, chẩn đoán, phòng ngừa và mục đích điều trị thích hợp; hướng dẫn sử dụng và/hoặc cách sử dụng như vậy có thể được nằm trên hoặc trong đồ chứa này, vì các chất phản ứng và thành phần khác hoặc công cụ sử dụng nhằm các mục đích này.

Đồ chứa có thể giữ các thành phần theo cách khác là hữu hiệu để điều trị, chẩn đoán, tiên lượng hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh lý và có thể có đường đi vào vô trùng (ví dụ đồ chứa có thể là túi dung dịch dùng theo đường tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút có thể xuyên qua bằng kim tiêm dưới da). Các hoạt chất trong chế phẩm có thể là kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với FLT3 hoặc thể tiếp hợp kháng thể được chất Gắn kết đặc hiệu với FLT3.

Vật phẩm sản xuất có thể còn bao gồm đồ chứa thứ hai chứa chất đệm được dùng, như dung dịch muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và/hoặc dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác mong muốn từ quan điểm thương mại và người dùng, bao gồm chất đệm, chất pha loãng, chất lọc, thìa khuấy, kim tiêm, xi-lanh khác, và/hoặc tờ rơi của đồ bao gói kèm theo chỉ định dùng và/hoặc hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế bao gồm các phương án sau:

Phương án 1 là phương án về kháng thể, trong đó kháng thể chứa vùng CDRH1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.23, vùng CDRH2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng CDRH3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32, vùng CDRL1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, vùng CDRL2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, và CDRL3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.20. Theo một phương án khác, kháng thể chứa các CDR như được xác định bởi Phương pháp Chothia như được thể hiện trong Bảng V. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa các CDR như được xác định bởi phương pháp Contact như được thể hiện trong Bảng V.

Phương án 2 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án 1, và trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Phương án 3 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121831 và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được sản sinh bởi buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121831; hoặc trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121836 và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được sản sinh bởi buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121836.

Phương án 4 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó kháng thể này chứa vùng Fc là phân nhóm IgG.

Phương án 5 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án nêu trên, và trong đó vùng Fc chứa đoạn thể của axit amin không có trong tự nhiên ở vị trí axit amin 124 của chuỗi nặng, và trong đó axit amin không có trong tự nhiên là para-axetylphenylalanin (pAF).

Phương án 6 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của các axit amin 1 đến 452 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến gốc thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10. Theo một phương án khác của phương án 6, kháng thể là kháng thể theo phương án 1 hoặc phương án 2, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của các axit amin 1 đến 452 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến gốc 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Phương án 7 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10. Theo một phương án khác của phương án 7, kháng thể là kháng thể theo phương án 1 hoặc phương án 2, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Phương án 8 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121831, và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121831. Phương án khác của phương án 8 là kháng thể theo phương án 5, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được nộp lưu với số hiệu lưu giữ ATCC số PTA-121831, và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121831.

Phương án 9 là phương án khác, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121836, và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được sản sinh bởi buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là

PTA-121836. Phương án khác của phương án 9 là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121836, và chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được sản sinh bởi buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121836.

Phương án 10 là phương án khác trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó E thứ nhất của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng được thể bằng pyroglutamat.

Phương án 11 là phương án khác trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-5, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến G thứ 452 SEQ ID NO.11, và trong đó E thứ nhất của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng được cải biến thành pyroglutamat, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10. Phương án khác của phương án 11 là kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến G thứ 452 SEQ ID NO.11, và trong đó E thứ nhất của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng được cải biến thành pyroglutamat, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

Phương án 12 là phương án khác về mảnh gắn kết kháng nguyên chứa các CDR của các kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với FLT-3.

Phương án 13 là phương án khác về mảnh gắn kết kháng nguyên theo phương án nêu trên, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, VH phân lập, và VL phân lập.

[0371] Phương án 14 là kháng thể chứa mảnh gắn kết kháng nguyên theo phương án 12 hoặc phương án 13.

Phương án 15 là phương án khác về kháng thể có độ tương đồng trình tự là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 10 hoặc 14 nêu trên, và trong đó kháng thể chứa các CDR của kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Phương án 16 là phương án khác về kháng thể theo phương án 15 gắn kết với FLT3 có ái lực tương tự như kháng thể tương ứng theo phương án 15, và về cơ bản là không ức chế quá trình gắn kết của FL với FLT3.

Phương án 17 là phương án khác về một hoặc nhiều axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ phương án từ 1 đến 10 hoặc 14.

Phương án 18 là phương án khác về một hoặc nhiều axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể hoặc các mảnh theo phương án 12 hoặc 13.

Phương án 19 là phương án khác về axit nucleic theo phương án 17 hoặc 18 có 80%, độ tương đồng trình tự là 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với axit nucleic theo phương án tương ứng.

Phương án 20 là phương án khác về một hoặc nhiều vector biểu hiện chứa một hoặc nhiều axit nucleic phân lập theo phương án 17 hoặc phương án 18 hoặc phương án 19. Theo một phương án theo phương án 20, một vector biểu hiện biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một phương án khác, vector biểu hiện theo phương án 20 chứa hai gen khởi đầu. Theo một phương án khác, vector biểu hiện theo phương án 20 chứa một gen khởi đầu. Theo một phương án khác của phương án 20, có hai vector biểu hiện, một vector biểu hiện chuỗi nặng, và vector còn lại biểu hiện chuỗi nhẹ. Theo một phương án khác, mỗi vector biểu hiện theo phương án 20 chứa cùng một gen khởi đầu. Theo một phương án khác, mỗi vector biểu hiện theo phương án 20 chứa gen khởi đầu khác nhau.

Phương án 21 là phương án khác về tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa một hoặc nhiều vector biểu hiện theo phương án nêu trên, phương án 20.

Phương án 22 là phương án khác về kháng thể được sản xuất bởi việc nuôi cấy tế bào vật chủ tái tổ hợp theo phương án nêu trên, phương án 21.

Phương án 23 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất chứa kháng thể theo phương án nêu trên, phương án 22, và được chất điều trị bệnh.

Phương án 24 là phương án về thể tiếp hợp kháng thể được chất chứa kháng thể gắn kết với FLT3 và được chất điều trị bệnh, trong đó thể tiếp hợp kháng thể được chất về cơ bản là không ức chế quá trình gắn kết của FLT3 với phối tử FLT3 (FL).

Phương án 25 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án 23 hoặc phương án 24, còn bao gồm liên kết ghép nối kháng thể và được chất điều trị bệnh.

Phương án 26 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án 25, trong đó gốc liên kết này là gốc liên kết không thể phân cắt.

Phương án 27 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án 26, trong đó liên kết là axit 2-(aminooxy)axetic.

Phương án 28 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 23 đến 27, trong đó được chất điều trị bệnh là được chất gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào.

Phương án 29 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 23 đến 28, trong đó được chất điều trị bệnh là (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-N-metyl-2-((S)-3-metyl-2-(metyl-amino)butanamido)butanamit.

Phương án 30 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất, trong đó thể tiếp hợp kháng thể được chất là thể tiếp hợp bất kỳ một trong số các phương án từ 23 đến 29, và trong đó thể tiếp hợp kháng thể được chất có công thức sau:

Kháng thể - (Gốc liên kết - Được chất điều trị bệnh)_p,

trong đó liên kết là axit 2-(aminooxy)axetic, và trong đó được chất điều trị bệnh là (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-N-metyl-2-((S)-3-metyl-2-metyl-amino)butanamido)butanamit và trong đó p được chọn từ nhóm bao gồm 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, và 3.

Phương án 31 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án 30, trong đó p được chọn từ nhóm bao gồm 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, và 3.

Phương án 32 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án 31, trong đó p được chọn từ nhóm bao gồm 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5.

Phương án 33 là phương án khác về thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án 32, trong đó p được chọn từ nhóm bao gồm 1,8, 1,9, và 2.

Phương án 34 là phương án khác về dược phẩm, trong đó dược phẩm này chứa lượng hữu hiệu điều trị bệnh của thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án bất kỳ trong số phương án từ 23 đến 33.

Phương án 35 là phương án khác về dược phẩm theo phương án 34, để dùng trong điều trị bệnh.

Phương án 36 là phương án khác về dược phẩm, trong đó dược phẩm này là dược phẩm theo phương án nêu trên, phương án 35, trong đó sử dụng trong điều trị bệnh là điều trị bệnh ung thư.

Phương án 37 là phương án khác về dược phẩm, trong đó dược phẩm này là dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 34 đến 36, kết hợp với một hoặc nhiều dược chất kháng bệnh ung thư.

Phương án 38 là phương án khác về phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, trong đó phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu điều trị bệnh của thể tiếp hợp kháng thể được chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 23 đến 33, hoặc dược phẩm của nó. Phương án khác theo phương án 37 là phương án về phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, trong đó phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu điều trị bệnh của dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 33 đến 37.

Phương án 39 là phương án khác về dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 33 đến 37, hoặc phương pháp theo phương án 38, trong đó bệnh ung

thư chứa một hoặc nhiều tế bào biểu hiện FLT3 tăng hơn so với tế bào không bị bệnh ung thư.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các khía cạnh khác nhau theo sáng chế còn được mô tả và minh họa bởi một số ví dụ sau đây, không có ví dụ nào được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Kháng nguyên FLT3

FLT3, Fms tương tự thụ thể tyrosin kinaza 3, còn gọi là Flk2 (kinaza 2 của gan trong bào thai), STK1 (tyrosin kinaza 1 của tế bào gốc) và CD135, là thành viên của tyrosin kinaza của thụ thể loại III (RTK). FLT3 của người mã hóa RTK của 993 axit amin, bao gồm thụ thể gắn kết với màng có năm miền ngoại bào tương tự globulin miễn dịch và hai miền tyrosin kinaza nội bào (TKD) được liên kết bởi miền xen kinaza (Stirewalt D L et al; Nat Rev Cancer; 650-665(2003). Gen *FLT3* của người (Gene ID No.: 2322 (Trung tâm quốc gia về thông tin sinh học - National Center for Biotechnology Information)) được nằm trên nhiễm sắc thể 13ql2 và có độ tương đồng trình tự axit amin là 85% so với FLT3 của chuột nhắt (Rosnet O et al; Oncogene 8: 173-179 (1993). FLT3 được biểu hiện trong tủy bào khỏe mạnh và tế bào lympho tổ tiên và bởi các tế bào bạch cầu của 70-90% đối tượng bị bệnh bị AML (Carow, C.E et al; Blood 87: 1089-1096 (1996); Rosnet O et al; Leukemia 10:238-248 (1996) và cũng trong bệnh ALL. Đã biết rằng FLT3 có liên quan đến quá trình tăng sinh, quá trình biệt hóa và chết theo chương trình của các tế bào tạo máu. Nhiều tế bào tạo máu sản sinh phối tử FLT3 (FLT3L), thúc đẩy quá trình đime hóa và hoạt hóa thụ thể, do tạo ra đột dẫn truyền thông qua con đường PDkinaza và MAPK (Stirewalt D L et al; Nat Rev Cancer; 650-665(2003). Khoảng 30% đối tượng bị bệnh bị AML mang thể đột biến kép bên trong FLT3 (ITD) mà hoạt hóa các thụ thể và đột truyền tín hiệu ngược, kèm theo hậu quả bệnh nặng (Gunawardane R N et al; Mom Cancer Ther 12:438-447 (2013). Đối với các phương án cụ thể về kháng nguyên FLT3, xem Fig.1.

Ví dụ 2

Sản xuất kháng thể FLT3 đơn dòng (MAb)

Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng (“MAb”) điều trị bệnh với FLT3 bao gồm các kháng thể phản ứng với epitop đặc hiệu với FLT3 có thể gắn kết với FLT3 đã được biểu hiện trên các tế bào. Chất gây miễn dịch để tạo ra các kháng thể đơn dòng như vậy bao gồm các chất được thiết kế để mã hóa hoặc chứa miền ngoại bào hoặc protein nguyên vẹn trình tự FLT3, vùng được dự đoán chứa các môtyp chức năng, và vùng chứa FLT3 được dự đoán là kháng nguyên bằng cách phân tích trình tự axit amin bằng máy tính. Chất gây miễn dịch bao gồm peptit, protein tái tổ hợp và tế bào (mà biểu hiện FLT3 nội sinh hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để biểu hiện FLT3).

MAb với FLT3 được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật VelocImmune® (Regeneron, Tarrytown, NY) trong đó chuột được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền sản sinh kháng thể mà có vùng biến đổi đầy đủ của người và vùng hằng định của chuột nhất. MAb được ký hiệu là v62- lb21 (còn gọi là AGS62.21) được tạo ra sau khi tạo miễn dịch chuột nhất VelocImmune® với protein FLT3 tái tổ hợp của người. MAb FLT3, v62- lb21 gắn kết đặc hiệu với protein FLT3 và tế bào biểu hiện FLT3 (tái tổ hợp và nội sinh).

Sau khi lựa chọn, v62-lb21 (được sản xuất tự nhiên bởi dòng tế bào lai) được chuyển hóa thành CHO được biểu hiện kháng thể tự nhiên đầy đủ của người bằng cách kết hợp trình tự biến đổi của người từ kháng thể VelocImmune® (Xem, ví dụ 3 - Sự biểu hiện CHv62.21 bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp) mà còn với vùng hằng định của người kết hợp axit amin không có trong tự nhiên ở vị trí 124 trên chuỗi nặng, theo kỹ thuật ReCODE được phát triển bởi Ambrx (La Jolla, CA) (Xem, ví dụ 4 - Sự biểu hiện CHv62.21pAF của người bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp).

ADN mã hoá trình tự đối với v62-lb21 được xác định sau khi phân lập ARN thông tin từ v62- lb21 sản sinh các tế bào lai. Trình tự axit nucleic biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng Flt3, v62- lb21 có nguồn gốc từ các tế bào lai bằng cách sử dụng quy trình sau. v62- lb21 tiết ra các tế bào lai được phân giải với chất phản ứng Trizol (Life Technologies, Gibco BRL). ARN toàn phần được tinh chế và ADN bổ sung sợi thứ nhất được tạo ra từ ARN toàn phần với oligo (dT) 12-18 cặp đôi bằng cách sử dụng hệ thống Gibco-BRL Superscript Pre-amplification. Sau đó, ADN bổ sung sợi thứ nhất được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn môi của chuỗi nặng biến đổi của globulin miễn dịch của người, và đoạn môi của chuỗi nhẹ biến đổi của globulin miễn dịch của người. Các

sản phẩm PCR được giải trình tự và các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định.

Trình tự axit nucleic và axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện trên Fig.2A và/hoặc Fig.2B và Fig.3A và/hoặc Fig.3B. Việc sắp hàng Mab CHv62.21 với dòng phôi Ig của người được thể hiện trên Fig. 4A-4B.

Ví dụ 3

Sự biểu hiện CHv62.21 bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp

Để biểu hiện Mab CHv62.21 tái tổ hợp trong các tế bào chuyển nhiễm, trình tự của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi v62.21 lai MAb được tách dòng ngược lần lượt với vùng hằng định của IgG1 của chuỗi nặng của người và Igκ của chuỗi nhẹ của người. Cát-sét của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng CHv62.21 đầy đủ của người được tách dòng ngược gen khởi đầu/gen tăng cường CMV ở vector dùng để tách dòng. Mab CHv62.21 tái tổ hợp biểu hiện cấu trúc được chuyển nhiễm thành các tế bào CHO để biểu hiện ổn định ở hệ thống Lonza GS (Lonza, Basel, Switzerland). Mab CHv62.21 được tiết ra từ các tế bào CHO tái tổ hợp được tinh chế và được đánh giá để gắn kết với FLT3 ở bề mặt tế bào bằng cách đo dòng chảy tế bào. Kết quả chỉ ra rằng kháng thể CHv62.21 tái tổ hợp được biểu hiện trong các tế bào CHO gắn kết với FLT3 ở bề mặt tế bào.

Các kết quả còn chỉ ra rằng CHv62.21 được biểu hiện tái tổ hợp được biểu hiện trong các tế bào CHO gắn kết với FLT3 tương tự như v62.21 được tinh chế từ dạng lai. Mab CHv62.21 được tiết từ các tế bào tái tổ hợp cũng được đánh giá để gắn kết với protein FLT3 tái tổ hợp bởi thử nghiệm ELISA. Khả năng gắn kết của CHv62.21 với protein FLT3 là giống nhau giữa nguyên liệu MAb có nguồn gốc từ CHO và từ các tế bào lai.

Tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) sản sinh kháng thể được ký hiệu là CHv62.21 được gửi (thông qua Federal Express) tới ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 vào ngày 09 tháng 12 năm 2014 và được ký gửi với tên truy cập PTA-121831.

Trình tự axit nucleic và axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện trên Fig.2A và/hoặc Fig.2B và Fig.3A và/hoặc Fig.3B.

Bằng cách phân tích thử nghiệm, sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, tiêu proteaza, phân tích LCMS, v. v...), đoạn cải biến axit amin của kháng thể đơn dòng CHv62.21 có nguồn gốc từ các tế bào CHO, đã chỉ ra rằng đoạn loại bỏ lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng xuất hiện ở hầu hết Mab CHv62.21 đã được tinh chế và quá trình pyroglutamyl hóa ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng và đoạn loại bỏ lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng xuất hiện ở một phần Mab CHv62.21 đã được tinh chế.

Ví dụ 4

Sự biểu hiện CHv62.21pAF của người bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp

Để biểu hiện CHv62.21pAF tái tổ hợp trong các tế bào chuyển nhiễm, trình tự của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi Mab lai v62-lb21 được tách dòng ngược lần lượt vùng hằng định của IgG1 của chuỗi nặng của người và Igk của chuỗi nhẹ của người. Cát-sét của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng CHv62.21 đầy đủ của người được tách dòng ngược gen khởi đầu/gen tăng cường CMV ở vectơ dùng để tách dòng. Sau đó, cấu trúc biểu hiện Mab CHv62.21 tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào các tế bào CHO pAFsupl-4E2 (Ambrx, La Jolla, CA), biểu hiện ổn định chất ức chế amber tARN và aminoaxyl tARN synthetaza đặc hiệu với pAF, để tạo ra các dòng ổn định. Các dòng ổn định này sản sinh CHv62.21pAF bằng cách kết hợp pAF vào Mab. Các dòng ổn định này được khuếch đại gen, tiếp đó là tách dòng phụ. CHv62.21pAF được tiết từ dòng phụ ổn định đã được tinh chế và được đánh giá để gắn kết với FLT3 ở bề mặt tế bào bằng cách đo dòng chảy tế bào. Kết quả chỉ ra rằng kháng thể CHv62.21pAF tái tổ hợp được biểu hiện từ các tế bào CHO gắn kết với FLT3 ở bề mặt tế bào.

Tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) sản sinh kháng thể được ký hiệu là CHv62.21pAF được gửi (thông qua Federal Express) tới ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 vào ngày 09 tháng 12 năm 2014 và được ký gửi với tên truy cập PTA-121836.

Trình tự axit nucleic và axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện trên Fig.2C và/hoặc 2B và Fig.3C và/hoặc 3B.

Bằng cách phân tích thử nghiệm, sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, tiêu proteaza, phân tích LCMS, v.v.), đoạn cải biến axit amin của kháng thể

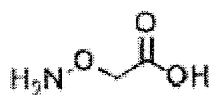
đơn dòng CHv62.21pAF có nguồn gốc từ các tế bào CHO, đã chỉ ra rằng đoạn loại bỏ lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng xuất hiện ở hầu hết các CHv62.21 pAF MAb đã được tinh chế và quá trình pyroglutamyl hóa ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng và đoạn loại bỏ lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng xảy ra ở một phần CHv62.21 pAF MAb đã được tinh chế.

Ví dụ 5

Tạo ra đơn vị liên kết AGL

Theo một phương án được ưu tiên, đơn vị liên kết theo sáng chế, được ký hiệu là AGL, được sử dụng để liên kết MAb FLT3 theo sáng chế, tốt hơn là CHv62.21pAF, với đơn vị được chất theo sáng chế, tốt hơn là AGD-0182 thường được gọi là axit 2-(aminooxy)axetic (Chem-Impex International, Inc., Wood Dale, IL).

Theo một phương án khác, đơn vị liên kết AGL theo sáng chế có công thức sau:



Axit 2-(aminooxy)axetic

Công thức hóa học: $C_2H_5NO_3$

Khối lượng chính xác: 91,0269

Khối lượng phân tử: 91,0660

m/z: 91,0269 (110,0%), 92,0303 (2,2%)

Ví dụ 6

Tạo ra và tổng hợp đơn vị được chất AGD-0182

Đơn vị được chất nêu trong công thức (II) được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình sau đây. Trước tiên, bổ sung DIEA (11,0g, 14,9mL, 85,3mmol), sau đó bổ sung DEPC (5,19g, 4,80mL, 0,032mol) vào dịch hỗn dịch đã được khuấy 23°C chứa Boc-Dap-OH dixyclohexylamin (10,0g, 21,3mmol) và muối H-Phe-NH₂ HCl (6,42g, 32,0mmol) trong CH₂Cl₂ (20,0mL). Sau 10 giờ, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng thô được rửa bằng H₂O (25mL x 2), tiếp đó là nước muối (25mL x 2). Phân đoạn hữu cơ được làm khô qua đệm magie sulfat, được lọc và được cô trong chân không. Dầu thô màu cam được tinh chế bằng sắc ký nhanh (silicagel 40 µm, 60 Å, kích cỡ) bằng cách sử dụng 2% đến 10% metanol trong CH₂Cl₂ làm dung môi rửa giải. Tổng

số 7,25 g Boc-Dap-Phe-NH₂ (16,7mmol, 78%) thu được ở dạng dầu màu vàng. LCMS RT = 1,28 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 434,19 [M+H]⁺.

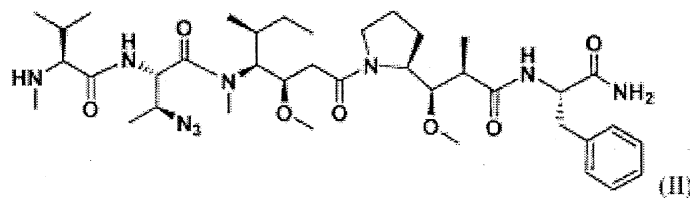
Thứ hai, bổ sung TFA (10mL) vào dịch hỗn dịch đã được khuấy 23°C chứa Boc-Dap-Phe-NH₂ (7,25g, 16,7mmol) trong CH₂Cl₂ (10mL). Sau 5 giờ, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Các chất hữu cơ dễ bay hơi được làm bay hơi trong chân không để tạo ra sản phẩm thô, được sử dụng tiếp mà không cần tinh chế thêm. Tổng số 6,00g H-Dap-Phe-NH₂ thu được ở dạng chất rắn màu da cam (13,4mmol, 80%). LCMS RT = 0,691 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 334,17 [M+H]⁺.

Sau đó, bổ sung DIEA (0,350g, 0,500mL, 2,74mmol) , sau đó bổ sung HATU (0,520g, 1,37mmol) vào dịch hỗn dịch đã được khuấy 23°C chứa muối Fmoc-MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-OH TFA (456 mg, 0,586mmol) và muối H-Dap-Phe-NH₂ TFA (457 mg, 1,02mmol) trong DMF (10mL). Sau 10 giờ, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế bằng RP-HPLC điều chế có cột Phenomenex Gemini NX-C18 10μ 110 Å (150 x 30 mm) bằng cách sử dụng 10% đến 90% MeCN trong dung dịch nước axit formic 0,1% làm dung môi rửa giải. Tổng số 526mg Fmoc-MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-Dap-Phe-NH₂ thu được là muối của axit formic (0,513mmol, 75%).

LCMS RT = 1,81 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 980,39 [M+H]⁺.

Cuối cùng, bổ sung piperidin (5mL) vào dung dịch đã được khuấy 23°C chứa Fmoc-MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-Dap-Phe-NH₂ (525mg, 0,513mmol) trong axetonitril (10mL). Sau 2 giờ, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Bổ sung hexan (15mL x 3) vào hỗn hợp phản ứng thô dung dịch. Lớp axetonitril được cô trong chân không. Dầu thô được tinh chế bằng RP-HPLC điều chế với cột Phenomenex Gemini NX-C18 10μ 110 Å (150 x 30 mm) bằng cách sử dụng 5% đến 95% MeCN trong 0,1% dung dịch nước TFA làm dung môi rửa giải. Tổng số 354mg hợp chất đề mục thu được ở dạng muối TFA (0,406mmol, 79%). LCMS RT = 1,15 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 758,24 [M+H]⁺; HRMS m/z 758,4915 [C₃₈H₆₃N₉O₇+H]⁺.

Quy trình tổng hợp nêu trên tạo ra đơn vị được chất sau đây được gọi là (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-N-metyl-2-((-3-meth -2-(metyl-amino)butanamido)butanamit, có Công thức (II):



Ví dụ 7

Việc tổng hợp liên kết được chất AGL và đơn vị dược chất AGD-0182

Việc tổng hợp đơn vị liên kết AGL và đơn vị dược chất AGD-0182 được thực hiện theo cách sau.

Phương pháp A được mô tả bằng cách sử dụng các phương pháp và các quy trình sau:

0-0,50 phút: đồng thời 80 nước/10 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước; 0,50-3,50 phút: gradient tuyến tính 80 nước/10 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước đến 0 nước/90 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước; 3,50-3,99 phút đồng thời 0 nước/90 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước; 3,99-4,00 phút gradient tuyến tính 0 nước/90 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước đến 80 nước/10 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước.

Phương pháp B được mô tả bằng cách sử dụng các phương pháp và quy trình sau:

0-0,50 phút: đồng thời 85 nước/5 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước; 0,50-1,60 phút: gradient tuyến tính 85 nước/5 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước đến 0 nước/98 axetonitril/2 axit formic 1% trong nước; 1,60-1,80 phút đồng thời 0 nước/98 axetonitril/2 axit formic 1% trong nước; 1,80-1,90 phút gradient tuyến tính 0 nước/98 axetonitril/2 axit formic 1% trong nước đến 85 nước/5 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước; 1,90-2,00 phút đồng thời 85 nước/5 axetonitril/10 axit formic 1% trong nước.

Sử dụng các phương pháp nêu trên, quy trình tổng hợp là như sau:

Bổ sung DIEA (11,0g, 14,9mL, 85,3mmol), sau đó bổ sung DEPC (5,19g, 4,80mL, 0,032mol) vào dịch hỗn dịch đã được khuấy 23°C chứa Boc-Dap-OH dicyclohexylamin (10,0g, 21,3mmol) và muối H-Phe-NH₂ HCl (6,42g, 32,0mmol) trong CH₂Cl₂ (20,0mL). Sau 10 giờ, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng thô được rửa bằng H₂O (25mL x 2), tiếp đó là nước muối (25mL x 2).

Phân đoạn hữu cơ được làm khô qua đệm magie sulfat, được lọc và được cô trong chân không. Dầu thô màu cam được tinh chế bằng sắc ký nhanh (silicagel 40 μ m, 60 Å, kích cỡ) bằng cách sử dụng 2% đến 10% metanol trong CH₂Cl₂ làm dung môi rửa giải. Tổng số 7,25g Boc-Dap-Phe-NH₂ (16,7mmol, 78%) thu được ở dạng dầu màu vàng. LCMS RT = 1,28 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 434,19 [M+H]⁺.

Bổ sung TFA (10mL) vào dịch hỗn dịch đã được khuấy 23°C chứa Boc-Dap-Phe-NH₂ (7,25g, 16,7mmol) trong CH₂Cl₂ (10mL). Sau 5 giờ, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Các chất hữu cơ dễ bay hơi được làm bay hơi trong chân không để tạo ra sản phẩm thô, được sử dụng tiếp mà không cần tinh chế thêm. Tổng số 6,00g H-Dap-Phe-NH₂ thu được ở dạng chất rắn màu da cam (13,4mmol, 80%). LCMS RT = 0,691 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 334,17 [M+H]⁺.

Bổ sung DIEA (0,350g, 0,500mL, 2,74mmol), sau đó bổ sung HATU (0,520g, 1,37mmol) vào dịch hỗn dịch đã được khuấy 23°C chứa Fmoc-MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-OH TFA muối (456 mg, 0,586mmol) và muối H-Dap-Phe-NH₂ TFA (457 mg, 1,02mmol) trong DMF (10mL). Sau 10 giờ, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế bằng RP-HPLC điều chế với cột Phenomenex Gemini NX-C18 10 μ 110 Å (150 x 30 mm) bằng cách sử dụng 10% đến 90% MeCN trong dung dịch nước axit formic 0,1% làm dung môi rửa giải. Tổng số 526mg Fmoc-MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-Dap-Phe-NH₂ thu được ở dạng muối của axit formic (0,513mmol, 75%). LCMS RT = 1,81 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 980,39 [M+H]⁺.

Bổ sung piperidin (5mL) vào dung dịch đã được khuấy 23°C chứa Fmoc-MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-Dap-Phe-NH₂ (525 mg, 0,513mmol) trong axetonitril (10mL). Sau 2 h, phân tích LCMS chỉ ra rằng phản ứng xảy ra hoàn toàn. Bổ sung hexan (15mL x 3) vào dung dịch phản ứng thô. Lớp axetonitril được cô trong chân không. Dầu thô được tinh chế bằng RP-HPLC điều chế với cột Phenomenex Gemini NX-C18 10 μ 110Å (150 x 30 mm) bằng cách sử dụng 5% đến 95% MeCN trong 0,1% nước TFA làm dung môi rửa giải. Tổng số 354mg hợp chất thu được (MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-Dap-Phe-NH₂) thu được ở dạng muối TFA (0,406mmol, 79%). LCMS RT = 1,15 phút (Phương pháp B); ESI-MS m/z 758,24 [M+H]⁺; HRMS m/z 758,4915 [C₃₈H₆₃N₉O₇+H]⁺.

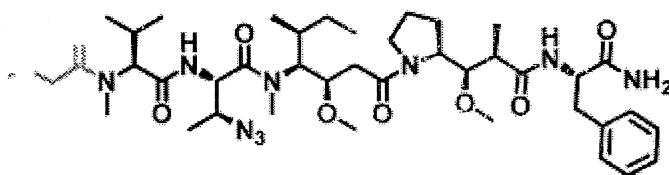
Bổ sung HATU (1,05g, 2,77mmol), sau đó bổ sung DIPEA (0,51mL, 2,92mmol) vào dung dịch đã được khuấy 23°C chứa MeVal-Abu(3-N₃)-Dil-Dap-Phe-NH₂ (2,0g,

2,64mmol) và Boc-Aoa (0,53g, 2,77mmol) trong DMF (7,0mL) và DCM (15,0mL). Sau 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không để tạo ra dung dịch DMF thô được pha loãng tiếp bằng 150mL EtOAc. Hỗn hợp phản ứng thô được rửa bằng 100mL dung dịch NaHCO_3 bão hòa, tiếp đó là 100mL nước muối. Phân đoạn hữu cơ được làm khô qua đệm magie sulfat, được lọc và được cô trong chân không. Boc-Aoa-MeVal-Abu(3- N_3)-Dil-Dap-Phe- NH_2 thô được tinh chế bằng sắc ký nhanh (silicagel 40 μm , 60 Å, kích cỡ) bằng cách sử dụng 0% đến 5% metanol trong CH_2Cl_2 làm dung môi rửa giải. Tổng số 2,13g Boc-Aoa-MeVal-Abu(3- N_3)-Dil-Dap-Phe- NH_2 (2,29mmol, 87%) thu được ở dạng chất rắn màu be. LCMS RT = 1,46 phút (Phương pháp A); ESI-MS m/z 931,46 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bổ sung 4 M HCl trong dioxan (10,0mL, 40,0mmol) vào dung dịch 23°C đã được khuấy chứa Boc-Aoa-MeVal-Abu(3- N_3)-Dil-Dap-Phe- NH_2 (2,1g, 2,26mmol) trong dioxan (15,0mL). Sau 0,5 giờ, hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không để tạo ra dầu thô màu vàng nhạt. Dầu màu vàng nhạt thô thu được được hoà tan trong 6mL metanol và được bổ sung từ từ (từng giọt) vào 150mL dung dịch được khuấy mạnh chứa EtOAc. Chất kết tủa màu trắng thu được từ dung dịch này. Chất kết tủa màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc, và dịch nổi trên bề mặt được cô tới khi đạt trạng thái rắn. Cả hai chất kết tủa màu trắng và dịch nổi trên bề mặt đã cô được tinh chế thành các phân bằng RP-HPLC điều chế với Phenomenex Gemini 10 μ , C18 110 Å (150 x 30 mm) bằng cách sử dụng 5% đến 95% MeCN trong 0,001 M axit clohydric làm dung môi rửa giải.

Phân đoạn của sản phẩm thu được được kết hợp, được cô, và được làm khô trong chân không trong 18 giờ để tạo ra chất rắn màu trắng. Tổng số 1,31g AGL-0182-30 HCl (1,51mmol, 67%) thu được. LCMS RT = 1,16 phút (Phương pháp A); ESI-MS m/z 831,27 $[\text{M}+\text{H}]^+$. (Xem, nói chung Bảng IV).

Theo một phương án được ưu tiên, AGL-0182-30 có công thức sau:



Ví dụ 8

Thế tiếp hợp kháng thể được chất của kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF

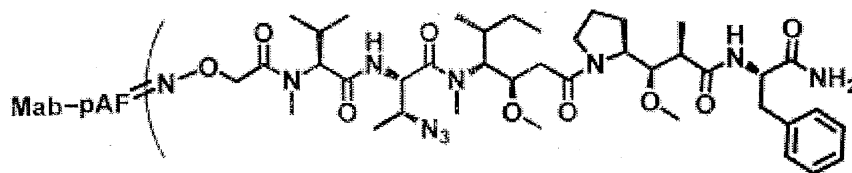
MAb CHv62.21pAF được tiếp hợp với dolaisoluine-Dolaproin chứa peptit được ký hiệu là AGL-0182-30 bằng cách sử dụng liên kết alkoxyamin được nêu trong bản mô tả để tạo ra thể tiếp hợp kháng thể dược chất (ADC) theo sáng chế được ký hiệu là CHv62.21pAF-AGL-0182-30 bằng cách sử dụng quy trình sau.

Việc tổng hợp liên kết dược chất AGL-0182-30 được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã mô tả trong Ví dụ 7 với tựa đề “Việc tổng hợp liên kết dược chất AGL và đơn vị dược chất AGD-0182”.

Tiếp theo, thể tiếp hợp kháng thể dược chất (ADC) theo sáng chế được ký hiệu là CHv62.21pAF-AGL-0182-30 được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình sau.

Tóm lại, 215,5mL MAb CHv62.21pAF ở nồng độ 17,17 mg/mL được điều chế trong dung dịch đệm xitrat 50mM chứa NaCl 500mM ở độ pH cuối cùng là 4,0 được bổ sung đến 9,7mL dung dịch đệm xitrat 50mM chứa NaCl 500mM ở độ pH cuối cùng là 4,0, 9,1mL axetic hydrazit 1,35M (được hoà tan trong nước), 7,26mL DMSO, và 5,08mL dung dịch 50mM chứa AGL-0182-30 (được hòa tan trong DMSO). Thể tiếp hợp được xử lý ở 28°C trong 16 - 24 giờ. Lượng dư AGL-0182-30 và các thành phần phản ứng phân tử nhỏ khác được loại bỏ bằng cách siêu lọc/lọc áp lực với 12 thể tích gồm histidin 20mM ở độ pH = 6,0 chứa 5% trehaloza.

Thể tiếp hợp kháng thể dược chất (ADC) thu được được ký hiệu là CHv62.21pAF-AGL-0182-30 và có công thức sau:



Trong đó kháng thể đơn dòng là CHv62.21pAF và p nằm trong khoảng từ 1,8 đến 2,0. Trị số p trung bình của thể tiếp hợp kháng thể dược chất nêu trong ví dụ này bằng khoảng 1,9 bằng cách phân tích khối phổ. Theo một phương án theo sáng chế, trị số p nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2,5.

ADC thu được theo sáng chế kết hợp nnAA vào thành phần kháng thể của ADC, nhờ đó liên kết dược chất được tiếp hợp qua liên kết oxim và được sử dụng để điều trị điều trị bệnh ung thư nêu trong Bảng I.

Ví dụ 9

Mô tả đặc điểm kháng thể đơn dòng CHv62.21

Kháng thể đơn dòng gắn kết với FLT3 được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp nêu trong ví dụ với tựa đề “Sản xuất kháng thể FLT3 đơn dòng (MAb)” và được sàng lọc, xác định, và được mô tả đặc điểm bằng cách sử dụng dạng kết hợp của các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này.

A. Gắn kết FACS

CHv62.21 được thử nghiệm để gắn kết với các dòng tế bào AML và B-ALL phát triển in vitro. (Xem, Fig.15). Tóm lại, CHv62.21 và kháng thể đối chứng được làm phù hợp với isotyp được biotiny hóa bằng cách sử dụng NHS LC biotin. In vitro, dòng tế bào bệnh ung thư phát triển theo hàm số mũ được sử dụng cho toàn bộ các thử nghiệm. Các tế bào được thu gom bằng cách và rửa bằng cách ly tâm. Các tế bào là Fc được phong bế để khử quá trình gắn kết không đặc hiệu. Các kháng thể được pha loãng đến nồng độ cuối cùng 10 ug/ml và được ủ đồng thời với các tế bào ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ. ở giai đoạn cuối của quá trình ủ, các tế bào này được rửa và được ủ với kháng thể Strep tavidin-PE phát triển thứ cấp với tỷ lệ pha loãng cuối 1:200 (2,5 ug/ml) trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau rửa kháng thể thứ cấp không gắn kết, các tế bào này được phân tích bằng FACS và sự phát huỳnh quang trung bình hình học được xác định và được thông báo. Tỷ lệ phát huỳnh quang được tính toán là như sau: Trung bình hình học của CHv62.21/Trung bình hình học của đối chứng isotyp=MFR, là thước đo biểu hiện gấp nếp trên đối chứng isotyp.

Tỷ lệ của trị số trung bình hình học và trị số huỳnh quang trung bình (MFR) thu được (Bảng VI) và biểu đồ được chỉ ra (Fig.15). Các kết quả chỉ ra rằng CHv62.21 gắn kết với một số dòng tế bào bệnh ung thư của người biểu hiện AML và B-ALL.

B. Hoạt tính ADCC

CHv62.21 và CHv62.21pAF được thử nghiệm về hoạt tính ADCC in vitro. Tóm lại, kháng thể đơn dòng kháng FLT3 trần và của ADC, CHv62.21 và CHv62.21pAF được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể trung gian (ADCC) của chúng bằng cách sử dụng các dòng tế bào đích EOL-1 và SEM với sự có mặt tế bào

tác động, PBMC của người bình thường có sử dụng thử nghiệm gây độc tế bào không phát xạ CytoTox 96® (Promega, G1780).

Một (1) ngày trước khi thực hiện thử nghiệm, ba (3) lọ nhỏ chứa tế bào tác động, PBMC của người bình thường (Hemacare, Donor ID: 1888), được làm tan, rửa và dàn vào bình cầu nuôi cấy tế bào T-175 trong RPMI-1640 có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bào đã được bất hoạt bởi nhiệt. Các bình cầu này được cất giữ trong tủ áp ở nhiệt độ 37°C 5% CO₂ qua đêm. Vào ngày tiếp theo, PBMC thu được từ bình cầu nuôi cấy bằng cách sử dụng 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco) và rửa và gieo cấy ở nồng độ 1,0e6 tế bào/giếng trong dung dịch đệm thử nghiệm (RPMI1640+0,1%FBS). Các tế bào đích SEM và EOL-1 cùng với dòng tế bào đối chứng dương, Raji được thu gom, rửa và gieo cấy ở nồng độ 2,0e5 tế bào/giếng bằng cách sử dụng dung dịch đệm thử nghiệm.

Mỗi mẫu thử nghiệm được pha loãng tới nồng độ cuối là 2,5ug/mL trong dung dịch đệm thử nghiệm. Các thể tích như nhau của các tế bào đích, mẫu thử nghiệm, và tế bào tác động được bổ sung vào các giếng của đĩa đáy tròn 96 giếng, các thao tác được lặp lại ba lần. Đĩa này được ly tâm nhẹ nhàng và được ủ trong 4 giờ trong tủ áp 37°C được làm ẩm. Sau bốn (4) giờ ủ, các đĩa thử nghiệm được ly tâm và thể tích 50µl dịch nổi trên bề mặt được thu gom và được chuyển đến đĩa mới 96 giếng. Hoạt tính của lactat dehydrogenaza trong dịch nổi trên bề mặt được xác định bằng cách sử dụng kit phát hiện LDH so màu; Thử nghiệm gây độc tế bào không phát xạ CytoTox 96® (Promega) với độ hấp phụ ở 490 nm.

Dữ liệu được phân tích trước tiên bằng trừ trị số hấp thụ trung bình của giếng của đường nền của cho toàn bộ trị số hấp phụ của giếng thử nghiệm, tự tác động, tự hướng đích và giếng hướng đích tối đa. Tiếp theo, trị số hấp thụ trung bình đọc được được chuẩn hóa và hoạt tính ADCC được tính toán bằng cách sử dụng công thức sau:

$$ADCC (\%) = \frac{\text{Thử nghiệm} - \text{Tự tác động} - \text{Tự hướng đích}}{\text{Hướng đích tối đa} - \text{Tự hướng đích}} \times 100$$

Các kết quả ở Fig.7 chỉ ra rằng CHv62.21 và MAb CHv62.21pAF không có hoạt tính ADCC. Tuy nhiên, đối chứng dương, Rituximab khẳng định hoạt tính ADCC trong dòng tế bào Raji.

Ví dụ 10

CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ức chế sự phát triển của khối u In Vivo

Sự biểu hiện đáng kể FLT3 trong các tế bào khối u, cùng với sự biểu hiện giới hạn của nó trong các tế bào bình thường khiến cho FLT3 là đích tốt để điều trị bệnh bằng kháng thể và tương tự, điều trị bệnh thông qua ADC. Do đó, hiệu quả điều trị của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở mô hình chuột nhất dị ghép bệnh ung thư ALL, AML, và B-LL của người được đánh giá.

Hiệu quả của thể tiếp hợp kháng thể được chất đối với sự phát triển khối u và sự tạo ra di căn được nghiên cứu ở mô hình bệnh ung thư dị ghép của chuột nhất (ví dụ, dưới da và tại vị trí).

Khối u dưới da (s.c.) được tạo ra bằng cách tiêm 5×10^4 - 10^6 tế bào bệnh ung thư được trộn với tỷ lệ pha loãng 1:1 với Matrigel (Collaborative Research) ở sườn phải của chuột nhất đực SCID. Để thử nghiệm hiệu quả của ADC đối với sự tạo ra khối u, tức là việc tiêm ADC được bắt đầu vào cùng ngày tiêm tế bào khối u. Đối với mẫu đối chứng, chuột nhất được tiêm bằng IgG hoặc PBS đã được tinh chế của người; hoặc kháng thể đơn dòng đã được tinh chế nhận biết kháng nguyên không thích hợp không được biểu hiện trong các tế bào của người. Trong các nghiên cứu sơ bộ, nhận thấy không có sự khác biệt giữa IgG hoặc PBS đối chứng đối với sự phát triển khối u. Kích thước khối u được xác định bằng cách đo bởi thước kẹp, và thể tích khối u được tính toán bằng chiều rộng x chiều dài/2, trong đó chiều rộng là đường kính nhỏ nhất và chiều dài là đường kính lớn nhất. Chuột nhất có đường kính khối u dưới da lớn hơn 1,5 cm được đem giết.

Ưu điểm của mô hình bệnh ung thư dị ghép là có thể nghiên cứu được sự tạo mạch mới và sự tạo mạch. Sự phát triển khối u được phụ thuộc một phần vào sự phát triển mạch máu mới. Mặc dù hệ mao quản và mạng lưới mạch máu có nguồn gốc từ vật chủ, sự bắt đầu và cấu trúc của hệ mạch mới được điều hòa bởi khối u dị ghép (Davidoff et al, Clin Cancer Res. (2001) 7:2870; Solesvik et al, Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20: 1295). Mức độ ảnh hưởng của kháng thể và phân tử nhỏ đối với sự tạo mạch mới được nghiên cứu theo các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như bằng cách phân tích IHC của mô khối u và vi trường xung quanh chúng.

CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ADC ức chế sự tạo ra dòng tế bào bệnh ung thư được ký hiệu là MV4-11, các mảnh bệnh ung thư dị ghép được thiết lập dưới da. Các kết quả này chỉ ra lợi ích của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 để điều trị tại chỗ và giai đoạn nặng của bệnh ung thư và tốt hơn là các bệnh ung thư được nêu trong Bảng I.

Các ADC chứa FLT3:

Các kháng thể đơn dòng được tạo ra kháng FLT3 như được mô tả trong ví dụ với tựa đề “Sản xuất kháng thể FLT3 đơn dòng (MAb)”. Hơn nữa, kháng thể đơn dòng được tiếp hợp với độc tố như được mô tả trong ví dụ với tựa đề “Thế tiếp hợp kháng thể được chất của kháng thể đơn dòng CHv62.21pAF” để tạo ra CHv62.21pAF-AGL-0182-30. CHv62.21pAF và CHv62.21pAF-AGL-0182-30 được đặc trưng bởi FACS, và các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này để xác định khả năng gắn kết của nó với FLT3.

Các dòng tế bào và mảnh dị ghép:

Các tế bào được duy trì trong DMEM, có bổ sung L-glutamin và 10% FBS, như đã biết trong lĩnh vực này. Các mảnh dị ghép MV4-11 được duy trì bằng cách cấy truyền theo dây ở chuột nhắt SCID.

Hiệu quả và chuẩn độ liều của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở mô hình dị ghép được thiết lập dưới da của dòng tế bào bạch cầu đơn nhân dạng tủy B của người MV4-11 được cấy ở chuột nhắt CB 17/SCID.

Trong thử nghiệm này, các tế bào MV4-11 gây bệnh bạch cầu đơn nhân tủy B của người ($3,0 \times 10^6$ tế bào/chuột nhắt) được tiêm vào sườn của các con chuột nhắt SCID riêng rẽ và các khối u được phát triển. Khi thể tích khối trung bình đạt tới kích thước xác định trước (200 mm^3), các động vật đạt tới kích thước khối u thích hợp và được chọn ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị và nhóm đối chứng với kích thước khối u trung bình tương đương và biến đổi trong mỗi nhóm bằng cách sử dụng phần mềm nghiên cứu điều khiển (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Toàn bộ chuột nhắt nghiên cứu được mang trước đó chất phong bế Fc (mLys-lc3.1-hIgG1) với nồng độ 20 mg/kg bằng cách tiêm trong màng bụng vào buổi trưa vào trước ngày dùng thuốc.

CHv62.21pAF-AGL-0182-30 được sử dụng liều với 3 mức liều khác nhau (0,5, 1,0, và 2,0 mg/kg) ở dạng liều đơn to bằng cách tiêm tĩnh mạch. 20mM histidin/5%

Trehaloza, độ pH = 6,0 và 91.1-AGL-0182-30 được sử dụng lần lượt làm tá dược lỏng và chất đối chứng ADC. Toàn bộ các dược chất được sử dụng dựa trên thể trọng riêng của mỗi động vật thu được ngay trước mỗi khi dùng liều. Sự phát triển khối u trong mỗi nhóm được kiểm tra hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước kẹp cho tới khi kết thúc nghiên cứu. Phân tích thống kê về dữ liệu thể tích khối u vào ngày cuối cùng trước khi giết động vật được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm Kruskal-Wallis. So sánh từng cặp được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Tukey (2 bên) để bảo vệ tỷ lệ sai số theo cặp thử nghiệm.

Nghiên cứu này đã đánh giá được hiệu quả của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 và so sánh nó với mẫu đối chứng ADC của nó (91.1-AGL-0182-30) ở mô hình dị ghép bệnh bạch cầu đơn nhân tủy B của người MV4-11 dưới da được thiết lập ở chuột nhắt CB 17/SCID. CHv62.21pAF-AGL-0182-30 được sử dụng ở 3 mức liều dùng khác nhau (0,5, 1,0, và 2,0 mg/kg) ở dạng liều đơn bằng cách tiêm tĩnh mạch (i.v.) liều cao. 91.1-AGL-0182-30 được sử dụng liều ở 2 mg/kg bằng cách tiêm i.v. ở dạng mẫu đối chứng ADC. Và 20mM Histidin/5% Trehaloza, độ pH = 6,0 được sử dụng làm tá dược lỏng đối chứng.

Các kết quả chỉ ra rằng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa việc điều trị bằng tá dược lỏng và mẫu đối chứng ADC ($p > 0,9999$). CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở nồng độ 2,0 mg/kg có ý nghĩa thống kê đáng kể có tác dụng làm thoái hóa khối u 100% ($p < 0,0001$), khi được so sánh với kích thước khối u ban đầu ở giai đoạn bắt đầu dùng liều. Khi so sánh với tá dược lỏng đối chứng, CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở nồng độ 1,0 mg/kg có ý nghĩa thống kê đáng kể có tác dụng ức chế sự phát triển khối u 78,1% ($p < 0,0001$). CHv62.21pAF-AGL-0182-30 không có hiệu quả bất kỳ ở mô hình này với liều 0,5 mg/kg ($p = 0,5344$). (Fig. 5).

Hiệu quả của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) và CHv62.21pAF (kháng thể trần) ở mô hình dị ghép được thiết lập dưới da của dòng tế bào bạch cầu đơn nhân dạng tủy B của người MV4-11 được cấy vào chuột nhắt CB 17 SCID.

Trong thử nghiệm khác, các tế bào MV4-11 của bệnh bạch cầu đơn nhân tủy B của người ($3,0 \times 10^6$ tế bào/chuột nhắt) được tiêm vào sườn của các con chuột nhắt SCID riêng rẽ và các khối u được phát triển. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới kích thước xác định trước (200 mm^3), các động vật đạt tới kích thước khối u thích hợp và được chọn ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị và nhóm đối chứng có kích thước khối u trung bình

tương đương và biến đổi trong mỗi nhóm bằng cách sử dụng phần mềm nghiên cứu điều khiển (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Toàn bộ chuột nhất nghiên cứu được mang trước đó chất phong bế Fc (mLys-Ic3.1-hIgG1) với nồng độ 20 mg/kg bằng cách tiêm trong màng bụng vào buổi trưa trước ngày dùng thuốc. CHv62.21pAF-AGL-0182-30 và mẫu đối chứng ADC (91.1-AGL-0182-30) được sử dụng liều với nồng độ 1 mg/kg với liều đơn to bằng cách tiêm tĩnh mạch. AGS62P (a.k.a. CHv62.21pAF) và kháng thể trần đối chứng (91.1-pAF) được sử dụng liều ở nồng độ 2 mg/kg với liều đơn to bằng cách tiêm tĩnh mạch. Toàn bộ các được chất được sử dụng dựa trên thể trọng riêng của mỗi động vật thu được ngay trước mỗi khi dùng liều. Sự phát triển khối u trong mỗi nhóm được kiểm tra hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước kẹp cho tới khi kết thúc nghiên cứu. Phân tích thống kê về thể tích khối u dữ liệu vào ngày cuối cùng trước khi đem giết động vật được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm Kruskal-Wallis. So sánh từng đôi được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Tukey (2 bên) để bảo vệ tỷ lệ sai số theo cặp thử nghiệm.

Nghiên cứu này được đánh giá hiệu quả của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) và CHv62.21pAF (kháng thể trần).

Các kết quả chỉ ra rằng được so sánh với mẫu đối chứng ADC (91.1-AGL-0182.30), CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở nồng độ 1,0 mg/kg ở dạng liều đơn bằng cách tiêm tĩnh mạch có ý nghĩa thống kê đáng kể có tác dụng ức chế sự phát triển khối u 51,4% ($p=0,0010$). Khi so sánh với kháng thể trần đối chứng (91.1-pAF), CHv62.21pAF với nồng độ 2,0 mg/kg ở dạng liều đơn bằng cách tiêm tĩnh mạch không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,6570$). Hơn thế nữa, các kết quả chỉ ra rằng CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở nồng độ 1,0 mg/kg có ý nghĩa thống kê đáng kể có tác dụng ức chế sự phát triển khối u 54,3%, khi so sánh với CHv62.21pAF với nồng độ 2,0 mg/kg ($p=0,0134$). (Fig. 6).

Hiệu quả của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) và CHv62.21pAF (kháng thể trần) ở mô hình dị ghép được thiết lập dưới da của dòng tế bào bạch cầu đơn nhân dạng tủy B của người MV4-11 được cấy ở chuột nhất CB 17 SCID.

Trong thử nghiệm khác, các tế bào MV4-11 của bệnh bạch cầu đơn nhân tủy B của người ($3,0 \times 10^6$ tế bào/chuột nhất) được tiêm vào sườn của các con chuột nhất SCID riêng rẽ và các khối u được phát triển. Khi thể tích khối trung bình đạt tới kích thước xác

định trước (200 mm^3), các động vật đạt tới kích thước khối u thích hợp và được chọn ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị và nhóm đối chứng có kích thước khối u trung bình tương đương và biến thiên trong mỗi nhóm bằng cách sử dụng phần mềm nghiên cứu điều khiển (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA). Toàn bộ chuột nhắt nghiên cứu được mang trước đó chất phong bế Fc (mLys-Ic3.1-hIgG1) với nồng độ 20 mg/kg bằng cách tiêm trong màng bụng vào buổi trưa trước ngày dùng thuốc. CHv62.21pAF-AGL-0182-30 và mẫu đối chứng ADC (9 l.1-AGL-0182-30) được sử dụng liều với nồng độ 2 mg/kg QW trong 2 tuần bằng cách tiêm tĩnh mạch. AGS62P (a.k.a. CHv62.21pAF) và kháng thể trần đối chứng (91.1-pAF) được sử dụng liều với nồng độ 2 mg/kg QW trong tuần bằng cách tiêm tĩnh mạch. Toàn bộ các dược chất được sử dụng dựa trên thể trọng riêng của mỗi động vật thu được ngay trước mỗi khi dùng liều. Sự phát triển khối u trong mỗi nhóm được kiểm tra hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước kẹp cho tới khi kết thúc nghiên cứu. Phân tích thống kê về thể tích khối u dữ liệu vào ngày cuối cùng trước khi đem giết động vật được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm Kruskal-Wallis. So sánh từng đôi được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Tukey (2 bên) để bảo vệ tỷ lệ sai số theo cặp thử nghiệm.

Nghiên cứu này được đánh giá hiệu quả của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 (ADC) và CHv62.21pAF (kháng thể trần) bằng cách sử dụng phác đồ đa liều trong 2 tuần.

Các kết quả chỉ ra rằng khi so sánh với mẫu đối chứng ADC (9 l.1-AGL-0182.30), CHv62.21pAF-AGL-0182-30 với nồng độ 2,0 mg/kg ở dạng đa liều bằng cách tiêm tĩnh mạch có ý nghĩa thống kê đáng kể có tác dụng ức chế sự phát triển khối u mức thoái biến khối u 100% vào ngày thứ 17 ($p=0,0001$). Khi so sánh với kháng thể trần đối chứng (91.1-pAF), CHv62.21pAF ở nồng độ 2,0 mg/kg ở dạng đa liều bằng cách tiêm tĩnh mạch không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. (Fig.13).

Hiệu quả của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở mô hình dị ghép SEM-xcl được thiết lập dưới da ở chuột nhắt CB 17 SCID.

Trong thử nghiệm khác, các tế bào SEM-xcl của bạch cầu của người nguyên bào lympho cấp tính ($1,0 \times 10^6$ tế bào/chuột nhắt) được tiêm vào sườn của các con chuột nhắt SCID riêng rẽ và các khối u được phát triển. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới kích thước xác định trước (200 mm^3), các động vật đạt tới kích thước khối u thích hợp và được chọn ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị và nhóm đối chứng có kích thước khối u

trung bình tương đương và biến đổi trong mỗi nhóm bằng cách sử dụng phần mềm nghiên cứu điều khiển (v.2.1; Studylog Systems, Inc., South San Francisco, CA).

CHv62.21pAF-AGL-0182-30 được sử dụng liều ở nồng độ 5,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, hoặc 1,0 mg/kg ở dạng liều đơn to vào ngày 0 bằng cách tiêm tĩnh mạch. ADC đối chứng, AGS91.1-pAF-AGL-0182-30, được sử dụng liều ở nồng độ 5,0 mg/kg bằng cách sử dụng cùng một đường dùng và phác đồ dùng liều tương tự. 20 mM histidin/5% trehaloza, độ pH = 5,2 được sử dụng làm tá dược lỏng. Toàn bộ các dược chất được sử dụng dựa trên thể trọng riêng của mỗi động vật thu được ngay trước mỗi khi dùng liều. Sự phát triển khối u trong mỗi nhóm được kiểm tra hai lần một tuần bằng cách sử dụng thước kẹp cho tới khi kết thúc nghiên cứu. Phân tích thống kê của thể tích khối u dữ liệu vào ngày cuối cùng trước khi đem giết động vật được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm Kruskal-Wallis. So sánh từng đôi được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm Tukey (2 bên) để bảo vệ tỷ lệ sai số theo cặp thử nghiệm.

Các kết quả chỉ ra rằng CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở toàn bộ ba mức liều (5,0, 2,0 và 1,0 mg/kg) đã chứng minh được hoạt tính kháng khối u tiềm năng khi so sánh với ADC đối chứng, AGS91.1-pAF-AGL-0182-30, hoặc với tá dược lỏng đối chứng ($p < 0,0001$), từ đó thường có tác dụng ức chế sự phát triển khối u lớn hơn 75%. Hơn nữa, khi được sử dụng với liều 5,0 mg/kg, CHv62.21pAF-AGL-0182-30 làm thoái hóa đáng kể khối u ở mức 57,3% khi so sánh với thể tích khối u ban đầu của nó. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hiệu quả nằm trong khoảng từ 5,0 mg/kg đến 2,0 mg/kg hoặc 1,0 mg/kg quan sát được. (Fig.14).

Kết luận

Tóm lại, Fig.5, Fig.6, Fig.13 và Fig.14 chỉ ra rằng ADC chứa FLT3 được gọi là CHv62.21pAF-AGL-0182-30 có tác dụng ức chế đáng kể sự phát triển của các tế bào khối u biểu hiện FLT3 khi so sánh với ADC đối chứng và kháng thể trần gắn kết với FLT3. Do đó, CHv62.21pAF-AGL-0182-30 có thể được sử dụng nhằm mục đích điều trị để điều trị và quản lý bệnh ung thư nêu trong Bảng I.

Ví dụ 11

Thử nghiệm lâm sàng trên người để điều trị và chẩn đoán caxinom của người thông qua việc sử dụng các ADC chứa FLT3

Các ADC chứa FLT3 được sử dụng theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với FLT3, và được sử dụng để điều trị các khối u nhất định, tốt hơn là khối u được nêu trong bảng I. Liên quan đến mỗi chỉ định, hai phương pháp trên lâm sàng được thực hiện thành công.

I.) Điều trị bệnh bổ sung: Trong việc điều trị bệnh bổ sung, các đối tượng bị bệnh được điều trị bằng các ADC chứa FLT3 kết hợp với dược chất hóa trị liệu hoặc dược chất kháng bệnh ung thư và/hoặc xạ trị hoặc dạng kết hợp của nó. Đích bệnh ung thư sơ cấp, như bệnh ung thư được nêu trong bảng I, được điều trị theo quy trình tiêu chuẩn bằng cách bổ sung các ADC chứa FLT3 để điều trị bệnh tiêu chuẩn thứ nhất và thứ hai. Các dấu hiệu của quy trình chỉ ra hiệu lực như được đánh giá bởi các ví dụ sau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm khối lượng khối u của tổn thương sơ cấp hoặc di căn, tiến triển gia tăng về khả năng không sống sót, sống sót toàn phần, cải thiện sức khỏe của đối tượng bị bệnh, tính ổn định của bệnh, cũng như khả năng làm giảm liều thông thường của dược chất hóa trị liệu tiêu chuẩn và dược chất sinh học khác. Việc giảm liều này cho phép điều trị bệnh bổ sung và/hoặc điều trị bệnh kéo dài bằng cách làm giảm độc tính liên quan đến liều của dược chất hóa trị liệu hoặc dược chất sinh học. Các ADC chứa FLT3 được sử dụng trong một số thử nghiệm lâm sàng bổ sung kết hợp với dược chất hóa trị liệu hoặc dược chất kháng bệnh ung thư.

II.) Điều trị bệnh đơn lẻ: Liên quan đến việc sử dụng ADC chứa FLT3 trong việc điều trị bệnh đơn lẻ khối u, ADC chứa FLT3 được sử dụng cho các đối tượng bị bệnh không dùng dược chất hóa trị liệu hoặc dược chất kháng bệnh ung thư. Theo một phương án, việc điều trị bệnh đơn lẻ được thực hiện trên lâm sàng ở các đối tượng bị bệnh bị bệnh ung thư giai đoạn cuối đã di căn sâu rộng. Các dấu hiệu của quy trình này chỉ ra hiệu lực khi được đánh giá bởi các ví dụ sau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm khối lượng khối u của các tổn thương sơ cấp hoặc di căn, tiến triển gia tăng về khả năng không sống sót, sống sót toàn phần, cải thiện sức khỏe của đối tượng bị bệnh, tính ổn định của bệnh, cũng như khả năng giảm liều thông thường của dược chất hóa trị liệu tiêu chuẩn và dược chất sinh học khác.

Liều lượng

Phác đồ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu. Ví dụ, dạng liều đơn to có thể được sử dụng, một số liều dùng được chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều dùng có thể được giảm hoặc được tăng lên theo tỷ lệ như

được chỉ định bởi các yêu cầu của từng trường hợp điều trị. Đặc biệt có lợi là tạo ra chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để dễ dùng và đồng đều liều lượng. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ đơn vị vật lý riêng rẽ thích hợp với liều đơn vị cho đối tượng là động động vật có vú cần được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng xác định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng cần thiết. Việc mô tả dạng liều đơn vị theo sáng chế được chỉ ra bằng cách và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc tính duy nhất của kháng thể và/hoặc ADC và tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa cụ thể cần thu được, và (b) các hạn chế thuộc lĩnh vực kỹ thuật về bào chế hoạt chất như vậy để điều trị tính nhạy trong các cá thể.

Khoảng cụ thể, không bị giới hạn về lượng hữu hiệu điều trị bệnh của ADC chứa FLT3 được sử dụng ở dạng kết hợp theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10 mg/kg, nằm trong khoảng từ 1 đến 5 mg/kg, ít nhất 1 mg/kg, ít nhất 2 mg/kg, ít nhất 3 mg/kg, hoặc ít nhất 4 mg/kg. Khoảng không giới hạn cụ thể khác, ví dụ, là v 0,5 đến 5 mg/kg, hoặc ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,8 đến 5 mg/kg, hoặc ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 7,5mg/kg. Phương án về liều cao theo sáng chế đề cập đến liều lượng lớn hơn 10 mg/kg. Cần lưu ý rằng các trị số về liều lượng có thể thay đổi theo loại bệnh và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý cần làm thuyên giảm, và có thể bao gồm liều đơn hoặc đa liều. Hơn nữa, cần hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, phác đồ liều đặc hiệu cần được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu cụ thể và đánh giá chuyên môn của người dùng hoặc giám sát việc sử dụng chế phẩm, và khoảng liều được nêu trong bản mô tả này chỉ cụ thể và không được dự định để giới hạn phạm vi hoặc thực tiễn của chế phẩm theo sáng chế.

Kế hoạch phát triển lâm sàng (Clinical Development Plan - CDP)

CDP cho phép và phát triển việc điều trị các ADC chứa FLT3 liên quan đến việc điều trị bệnh bổ sung hoặc điều trị bệnh đơn lẻ. Các thử nghiệm ban đầu chỉ ra tính an toàn và sau đó khẳng định hiệu quả ở các liều lặp lại. Các thử nghiệm là nhãn mở so sánh việc hóa điều trị bệnh tiêu chuẩn với việc điều trị bệnh tiêu chuẩn cùng với các ADC chứa FLT3. Như đã biết, một tiêu chuẩn không giới hạn có thể được sử dụng liên quan đến đăng ký các đối tượng bị bệnh có mức biểu hiện FLT3 trong khối u như được xác định bằng cách sinh thiết.

Như việc điều trị bệnh trên cơ sở tiêm truyền protein hoặc kháng thể bất kỳ, tính an toàn chủ yếu liên quan đến (i) hội chứng giải phóng xytokin, nghĩa là, giảm huyết áp, sốt, rung mình, ớn lạnh; (ii) phát triển đáp ứng gây miễn dịch với nguyên liệu (tức là, phát triển các kháng thể của người bởi đối tượng bị bệnh với kháng thể điều trị, hoặc đáp ứng HAMA); và, (iii) độc tính với các tế bào bình thường biểu hiện FLT3. Các thử nghiệm tiêu chuẩn và thử nghiệm sau này được sử dụng để kiểm soát từng mối quan tâm về tính an toàn này. Nhận thấy các ADC chứa FLT3 là an toàn khi dùng cho người.

Ví dụ 12

Phát hiện protein FLT3 ở mẫu bình thường và mẫu từ đối tượng bị bệnh ung thư

Việc phát hiện protein FLT3 trong bệnh ung thư bằng cách sử dụng kháng thể kháng FLT3 được đánh giá trong các mẫu PBMC thu được từ máu ngoại vi của các đối tượng bị bệnh bạch cầu cấp tính trong quần thể tế bào tủy bào (AML).

A. Các nguyên liệu gắn kết FACS và phương pháp

Trong thử nghiệm này, mẫu được ủ với dung dịch hỗn hợp chứa CD45, CD33, CD34, CD3, CD20, CD38 và emAb kháng Flt3-Biotin hoặc kháng thể đơn dòng Isotyp-Biotin. Chất phát hiện thứ cấp đối với kháng thể đơn dòng được biotiny hóa là Streptavidin-PE. Sự phát huỳnh quang không có một (FMO) dung dịch hỗn hợp đối chứng được tạo ra với chất phản ứng phát hiện Streptavidin-PE (SAv-PE) và được sử dụng để chọn quần thể tế bào. Máy đo dòng chảy tế bào LSRII (BD Biosciences) được sử dụng để thu được dữ liệu.

Tế bào lympho được chọn trong quần thể CD45+ từ bốn quần thể riêng biệt được xác định, CD33+/3-/20- (Nguyên tủy bào), CD33+/3-/34+/38- (Tế bào gốc), CD33-/3+ (tế bào T) và CD33-/20+ (Tế bào B). Phân tích được thực hiện bằng phần mềm Flowjo phiên bản 9.5.4 (Tri-Star, Ashland, OR). Trị số phát huỳnh quang được thông báo ở dạng trị số hình học (MFI).

B. Kết quả

Các kết quả nêu trong Fig.16 đối với mẫu của đối tượng bị bệnh AML chỉ ra rằng MAb kháng FLT3 gắn kết với quần thể tế bào tủy bào, tế bào gốc, T và B của toàn bộ các mẫu được thử nghiệm.

Hơn thế nữa, như được thể hiện trong Fig.16, đồ thị phân bố MFIR đối với toàn bộ các mẫu được thử nghiệm chứng tỏ rằng có sự thay đổi ở mức trung bình về quần thể tế bào tủy bào, tế bào gốc và B, trong khi đó tế bào T ít thay đổi trong MFIR. MFIR trung bình đối với nguyên tủy bào là khoảng 963,1, trong khi đó MFIR trung bình đối với tế bào gốc là 318,2, trong khi đó MFIR trung bình đối với tế bào T là 9,842, trong khi đó MFIR đối với tế bào B là 72,60 trong AML. MFIR trung bình đối với các mẫu bình thường là 642,4 trong tủy bào, 68,29 đối với tế bào gốc, 11,66 đối với các tế bào T, và 13,73 đối với tế bào B.

Các kết quả nêu trong Fig.16 chỉ ra rằng MAb kháng FLT3, như MAb CHv62.21 và MAb CHv62.21pAF theo sáng chế có thể phát hiện được protein FLT3 biểu hiện quá mức trong AML.

Ví dụ 13

Hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* qua trung gian CHv62.21pAF và CHv62.21pAF-AGL-0182-30

Khả năng của kháng thể FLT3 (CHv62.21pAF) và ADC chứa FLT3 (CHv62.21pAF-AGL-0182-30) qua trung gian hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc FLT3 được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào bạch cầu MV-4-11 và MOLM-13 của đối tượng bị bệnh, mà biểu hiện FLT3 nội sinh và dòng tế bào bạch cầu của đối tượng bị bệnh, Karpas299, mà không biểu hiện FLT3.

Tóm lại, các tế bào MV-4-11, MOLM-13, và Karpas299 được gieo cấy trong 50µL môi trường đầy đủ, lần lượt ở mật độ 1500, 2000, và 3000 tế bào/giếng, lên đĩa 96 giếng và đặt trong tủ nuôi cấy ở 37°C; 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, các tế bào là Fc được phong bế ở thể tích 25µL/giếng để làm giảm quá trình gắn kết không đặc hiệu và dung dịch gốc 4x chứa CHv62.21pAF-AGL-0182-30, đối chứng isotyp kháng thể được tiếp hợp với AGD-0182 (91.1pAF-AGL-0182-30), CHv62.21pAF, và đối chứng isotyp kháng thể (91.1pAF) được tạo ra trong môi trường đầy đủ và 25µL dịch pha loãng theo dãy chứa ADC và các kháng thể được bổ sung vào các giếng thích hợp. Các tế bào được điều trị bằng CHv62.21pAF-AGL-0182-30, 91.1pAF-AGL-0182-30, CHv62.21pAF, và 91.1pAF trong 5 ngày trong tủ nuôi cấy mô ở 37°C; 5% CO₂. Ở giai đoạn cuối của quá trình ủ, 20µL Presto xanh da trời được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 2 giờ. Các

đĩa này được đọc bằng cách sử dụng máy đọc đĩa BioTek Synergy H4 sử dụng bước sóng kích thích 540 và bước sóng phát ra 590.

Các kết quả trong Fig.17 chỉ ra rằng ADC kháng FLT3 (CHv62.21pAF-AGL-0182-30) có thể cảm ứng một cách chọn lọc độc tính tế bào của các dòng tế bào MOLM-13 và MV-4-11 biểu hiện FLT3 trong khi đó nó không thể cảm ứng độc tính tế bào của dòng tế bào Karpas299 không biểu hiện FLT3. Kháng thể kháng FLT3 (CHv62.21pAF) không gây độc tế bào ở các dòng tế bào MOLM-13 và MV-4-11. Do đó, các dữ liệu này chứng tỏ rằng MAb FLT3 CHv62.21pAF riêng lẻ không gây độc tế bào. Tốt hơn, chỉ có ADC chứa FLT3 CHv62.21pAF-AGL-0182-30 có thể tiêu diệt một cách chọn lọc các tế bào MOLM-13 và MV-4-11 biểu hiện FLT3 trong khi đó nó không ảnh hưởng tới các tế bào Karpas299 không biểu hiện FLT3.

Ví dụ 14

Ưu điểm của CHv62.21pAF so với kháng thể đơn dòng FLT3 trong tình trạng kỹ thuật

MAb CHv62.21pAF theo sáng chế có một số ưu điểm so với kháng thể đơn dòng khác gắn kết với FLT3. Đặc biệt khi xem xét lợi ích điều trị của ADC theo sáng chế. Ví dụ, tình trạng kỹ thuật đề cập tới việc sau khi đối tượng bị bệnh bị AML được điều trị bằng được chất hóa trị liệu, thì sẽ làm tăng sự biểu hiện của phối tử FLT3 ("FL") trong huyết tương. Xem, Takashi, et. al., Blood vol. 117(12) (March 2011). Ngoài ra, nhận thấy rằng FL tăng lên làm giảm đáng kể hoạt tính của các chất ức chế FLT. Id. EB 10 được tiếp hợp với Monomethyl auristatin F (EB 10-MMAF) được thông báo là ADC chứa FLT3 kháng người. (Xem, Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 46, 2005). Nhận thấy rằng EB 10 phong bế FL. Xem, Patent Mỹ số 8,071,099 (Imclone). Do đó, đối tượng của sáng chế nhằm tạo ra Kháng thể đơn dòng gắn kết với kháng nguyên FLT3, nhưng không gắn kết với FL.

Trong một thử nghiệm, kháng thể đơn dòng CHv62.21 theo sáng chế được xác nhận là không phong bế FL. Tóm lại, FLT3-Fc tái tổ hợp của người được mua từ hệ thống R và D. Protein này được bất động trên bề mặt của vi cầu Luminex đã được hoạt hóa bằng cách sử dụng phương pháp hóa học sulfo-NHS/EDC tiêu chuẩn theo quy trình được cung cấp bởi Luminex. Dạng protein được gắn His, cùng với một số protein khác

được tiếp hợp với vi cầu Luminex, và đóng vai trò làm mẫu đối chứng trong quy trình này.

Ngoài ra, phối tử FLT3 cũng được mua từ hệ thống R và D. Phối tử được biotinyl hóa bằng cách sử dụng Thermo Scientific EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh Formula theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau hai (2) giờ cho protein phản ứng với Sulfo-NHS-LC-Biotin, biotin không được kết hợp được lấy ra bằng cách thẩm tách kháng DPBS.

Khả năng của FLT3 được bất động trên bề mặt của các vi cầu để gắn kết với phối tử được biotinyl hóa của nó được đánh giá bằng cách các vi cầu phản ứng với các nồng độ khác nhau của phối tử được biotinyl hóa, được tạo ra trong dung dịch đệm chứa PBS, 2% BSA, 0,05% Tween 20, và 0,1% natri azit, trong 120 phút ở nhiệt độ trong phòng đồng thời lắc nhẹ. Ở giai đoạn cuối của quá trình ủ, các vi cầu được hút ra và rửa. Phối tử được biotinyl hóa FLT3 gắn kết với thụ thể đã được bất động của nó được phát hiện bằng Strep tavidin-R-Phycoerythrin (Moss, Inc.). Sự phát huỳnh quang liên quan đến các vi cầu được đo bằng thiết bị Luminex. Việc đánh giá này đã chỉ ra rằng nồng độ 5 ng/mL của phối tử được biotinyl hóa FLT3 là đủ để tạo ra tín hiệu mạnh, mà không làm bão hòa FLT3 liên quan đến các vi cầu.

Cuối cùng, để đánh giá khả năng của kháng thể FLT3 để phong bế phối tử, hỗn hợp được tạo ra chứa phối tử được biotinyl hóa FLT3 ở nồng độ 5 ng/mL, cùng với các kháng thể khác nhau trong quá trình nghiên cứu là 10 μ g/mL. Các hỗn hợp này được sử dụng cho FLT3 đã được bất động trên các vi cầu và được ủ trong 60 phút. Ở giai đoạn cuối của quá trình ủ, các vi cầu được hút ra và rửa. Phối tử được biotinyl hóa FLT3 gắn kết với thụ thể đã được bất động của nó được phát hiện bằng Streptavidin-R-Phycoerythrin (Moss, Inc.). Sự phát huỳnh quang liên quan đến các vi cầu được đo bằng thiết bị Luminex. Các kháng thể có khả năng phong bế phối tử được quan sát bằng cách khử MFI (cường độ phát huỳnh quang trung bình).

Các kết quả ở Fig.8 khẳng định rằng MAb FLT3 CHv62.21 không phải là chất phong bế FL và MAb FLT3 khác được ký hiệu là v62-lb37.1 (Bảng VII) là chất phong bế FL, tương tự với kháng thể đơn dòng FLT3 trong tình trạng kỹ thuật được ký hiệu EB 10 (Xem, Patent Mỹ số 8,071,099).

Khả năng của kháng thể FLT3 (CHv62.21 và v62-lb37.1) qua trung gian tác động của phối tử FLT3 của người được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào EOL-1 bạch cầu của người, mà biểu hiện FLT3 nội sinh. Đối chứng isotyp kháng thể (mLys-lc3.1) cũng được sử dụng. Các tế bào EOL-1 được gieo cấy trong 50 μ L môi trường đầy đủ, ở mật độ 2000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng và đặt trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C; 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, các tế bào này được điều trị bằng 50, 10 hoặc 5 ng/mL phối tử FLT3 của người (trong 25 μ L môi trường đầy đủ) và 10, 1, 0,1 và 0 μ g/mL kháng thể thử nghiệm (trong 25 μ L môi trường đầy đủ). Môi trường riêng rẽ được sử dụng là đối chứng không được điều trị. Các tế bào này được điều trị trong 5 ngày trong tủ nuôi cấy mô ở nhiệt độ 37°C; 5% CO₂. Ở giai đoạn cuối của quá trình ủ, 100 μ L tế bào chuẩn độ Glo được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 30 phút, lắc, ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa này được đọc có sử dụng máy đọc đĩa BioTek Synergy H4 sử dụng Luminescence và được vẽ đồ thị bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism.

Các kết quả ở Fig.9, chỉ ra rằng v62-lb37.1 ức chế sự phát triển ở nồng độ cao với sự có mặt của phối tử FLT3, nhưng CHv62.21 lại không ảnh hưởng tới sự phát triển. Phối tử FLT3 của người riêng lẻ cũng không ảnh hưởng tới sự phát triển của dòng tế bào EOL-1.

Dựa vào nồng độ FL trong huyết tương được tăng lên sau hóa điều trị bệnh ung thư (Xem, Takashi et. al., nêu trên), nhận thấy lợi ích khi MAb FLT3 theo sáng chế không phong bế FL. Để khẳng định điều này, nhận thấy rằng trong khi hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể đơn dòng phong bế phối tử giảm xuống khi có mặt FL thì hoạt tính gây độc tế bào của kháng thể đơn dòng không phong bế phối tử lại không giảm khi có mặt FL.

Khả năng của các ADC chứa FLT3 (CHv62.21pAF-AGL-0182-30 và v62-lb21.1-AGL-0129-08) qua trung gian gây độc tế bào phụ thuộc FLT3 không có mặt và có mặt phối tử FLT3 của người (hFL) được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào RS-4-11 của bạch cầu của người, mà biểu hiện FLT3 nội sinh.

Tóm lại, các tế bào RS-4-11 được gieo cấy trong 50 μ L môi trường đầy đủ ở mật độ 3000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng và đặt trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C; 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, ADC được tạo ra trong môi trường đầy đủ ở nồng độ 10 μ g/mL và được pha loãng theo dãy với tỷ lệ 1:5 đối với tổng số 9 điểm. 25 μ L dịch pha loãng theo

dây chứa ADC được bổ sung vào các giếng thích hợp có và không có phối tử FLT3 của người (100 ng/mL được bổ sung 25 μ L/giếng). Các tế bào này được điều trị bằng v62-lb21.1-AGL-0129-08 (Bảng VIII, Xem, WO2015/183978, Agensys, Inc.) và v62-lb37.1-AGL-0129-08 có và không có phối tử FLT3 của người trong 5 ngày trong tủ nuôi cấy mô ở nhiệt độ 37°C; 5% CO₂. Ở giai đoạn cuối của quá trình ủ, 20 μ L Presto xanh da trời được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 2 giờ. Các đĩa này được đọc có sử dụng máy đọc đĩa BioTek Synergy H4 sử dụng ở bước sóng kích thích 540 và bước sóng phát ra 590 và được vẽ đồ thị bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.10(A) và 10(B) chỉ ra rằng ADC kháng FLT3 (v62-lb21.1-AGL-0129-08 và v62-lb37.1-AGL-0129-08) có thể gây độc tế bào của dòng tế bào RS-4-11 biểu hiện FLT3. ADC kháng FLT3, v62-lb21.1-AGL-0129-08, có mức gây độc tế bào tương tự khi có mặt và không có mặt phối tử FLT3 của người. Tuy nhiên, hoạt tính gây độc tế bào của ADC kháng FLT3, v62-lb37.1-AGL-0129-08, giảm xuống khi có mặt phối tử FLT3 của người so sánh với việc điều trị bằng ADC không có phối tử.

Trong thử nghiệm khác, khả năng gắn kết của kháng thể kháng FLT3, CHv62.21 và v62-lb37.1, với FLT3 được biểu hiện trên bề mặt của dòng tế bào MOLM-13 bạch cầu của người được đánh giá với sự có mặt của phối tử FLT3 của người (hFL). Đối chứng isotyp kháng thể, AGS91.1-pAF, được sử dụng làm mẫu đối chứng âm.

Tóm lại, các tế bào MOLM-13 được gieo cấy ở mật độ 50.000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng đáy tròn. Các đĩa này được rửa một lần bằng 150 μ L/giếng PBS. Các tế bào là Fc được phong bế (20 μ g/mL) với thể tích 50 μ L/giếng trong dung dịch đệm FACS (PBS + 2% FBS + 0,1% natri azit) để làm giảm quá trình gắn kết không đặc hiệu. Các tế bào này được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 15 phút. Phối tử FLT3 của người được bổ sung vào các giếng thích hợp ở 100 ng/mL và được pha loãng theo dãy với tỷ lệ 1:2 trong có tổng số 11 điểm. Các tế bào được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C trước khi bổ sung kháng thể FLT3 đã được biotinyl hóa. Sau khi ủ, kháng thể kháng FLT3 đã được biotinyl hóa và đối chứng isotyp kháng thể được tạo ra trong dung dịch đệm FACS ở 10 μ g/mL và 1 μ g/mL và 25 μ L được bổ sung vào các giếng và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và Strep tavidin-PE (miễn dịch Jackson) được bổ sung 100 μ L/giếng và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai

lần bằng dung dịch đệm FACS và đọc trên Attune Cytometer (Life technologies) và được phân tích trong phần mềm Flow Jo (Tree Star).

Các kết quả ở Fig.11(A) chỉ ra rằng phối tử FLT3 của người không gây ảnh hưởng tới kháng thể kháng FLT3, AGS62P, gắn kết với các tế bào MOLM-13. Tuy nhiên, phối tử FLT3 của người gây ảnh hưởng tới khả năng gắn kết của kháng thể kháng FLT3, cHv62-lb37.1, với các tế bào MOLM-13 theo cách phụ thuộc liều.

Cuối cùng, khả năng của ADC chứa FLT3, AGS62P1, qua trung gian gây độc tế bào phụ thuộc FLT3 khi không có mặt và có mặt phối tử FLT3 của người (hFL) được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào MOLM-13 bạch cầu của người, mà biểu hiện FLT3 nội sinh. Đối chứng isotyp ADC, AGS91.1.88-pAF-AGL-0182-30 được sử dụng làm mẫu đối chứng âm.

Tóm lại, các tế bào MOLM-13 được gieo cấy trong 50µL môi trường đầy đủ ở mật độ 2000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng và đặt trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C; 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo, các tế bào là Fc được phong bế với thể tích 25µL/giếng để làm giảm quá trình gắn kết không đặc hiệu. ADC được tạo ra trong môi trường đầy đủ đối với nồng độ cuối 10 µg/mL và được pha loãng theo dãy với tỷ lệ 1:5 trong tổng số 9 điểm. 12,5µL dịch pha loãng theo dãy chứa ADC được bổ sung vào các giếng thích hợp có và không có phối tử FLT3 của người (100 ng/mL được bổ sung 12,5µL/giếng). Các tế bào này được điều trị bằng AGS62P1 và AGS91.1.88-pAF-AGL-0182-30 có và không có phối tử FLT3 của người trong 5 ngày trong tủ nuôi cấy mô ở nhiệt độ 37°C; 5% CO₂. Ở giai đoạn cuối của quá trình ủ, 20µL Presto xanh da trời được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 2 giờ. Các đĩa được đọc sử dụng máy đọc đĩa BioTek Synergy H4 có sử dụng ở bước sóng kích thích 540 và bước sóng phát ra 590 và được vẽ đồ thị bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism.

Kết quả ở Fig.11(B) chỉ ra rằng phối tử FLT3 của người không gây ảnh hưởng tới ADC kháng FLT3 (CHv62.21pAF-AGL-0182-30) gây độc tế bào ở các tế bào MOLM-13.

Do đó, trong khi đó kháng thể đơn dòng FLT3 có thể được sử dụng trong điều trị, chứ không phải toàn bộ MAb FLT3 là tương tự nhau. Các kết quả trong các Fig.8-11 chỉ ra rằng MAb FLT3 không gắn kết với FL có ưu điểm nổi bật so với kháng thể đơn dòng FLT3 gắn kết với FL. Ngoài ra, liên quan đến lợi ích điều trị của ADC theo sáng chế, các

kết quả chỉ ra rằng ADC chứa kháng thể đơn dòng FLT3 không phong bế phổi tử, như CHv62.21pAF-AGL-0182-30 vẫn có tác dụng kháng khối u khi so sánh với ADC chứa chất phong bế phổi tử MAb FLT3 với sự có mặt của FL. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này hiểu được rằng sự có mặt của FL gia tăng sau khi điều trị bằng hóa điều trị bệnh. Ngoài ra, đã biết rằng sự có mặt của FL gia tăng cũng làm giảm hoạt tính các chất ức chế FLT3. Do đó, các kết quả trong các Fig.8-11 gợi ý rằng ADC chứa kháng thể đơn dòng FLT3 không phong bế phổi tử có chỉ số điều trị và tác dụng kháng khối u tốt hơn so với ADC chứa chất phong bế phổi tử MAb FLT3 ở các đối tượng bị bệnh bị bệnh ung thư.

Ví dụ 15

Thử nghiệm độ ổn định của CHv62.21pAF-AGL-0182-30

Độ ổn định của ADC chứa FLT3 CHv62.21pAF-AGL-0182-30 và ADC khác chứa FLT3 sử dụng hợp chất gây độc tế bào khác được ký hiệu là AGL-0301-20 (Xem, WO2014/043403, Agensys, Inc.) được đánh giá *in vitro*. Trong thử nghiệm này, huyết thanh người (Millipore) được làm mất tác dụng bằng 0,4 mg/mL mỗi ADC và phosphat độ pH = 7,3 với nồng độ cuối là 50 mM và được ủ trong tủ áp được làm ẩm ở nhiệt độ 37°C. 100µl các phần được thu gom và được làm đông lạnh ở nhiệt độ -80°C ở 5 phút, 3 giờ, 25,25 giờ, 51,25 giờ, và 171,2 giờ. Sau khi toàn bộ các mẫu được thu gom, ELISA được thực hiện để định lượng kháng thể và thành phần được chất của mỗi ADC. Các kết quả chỉ ra rằng liên kết được chất-kháng thể CHv62.21pAF-AGL-0182-30 là ổn định theo thời gian thử nghiệm ở Fig.12(A). Tuy nhiên, Fig.12(B) chỉ ra rằng liên kết được chất-kháng thể đối với v62-lb21-AGL-0301-20 là không ổn định, dẫn đến sự tiếp hợp đồng thời theo thời gian thử nghiệm.

Trong bản mô tả này, dữ liệu khác nhau trên trang web, công bố đơn, đơn yêu cầu cấp patent và patent được viện dẫn. (Các trang web được đưa ra bởi Uniform Resource Locator của chúng, hoặc URL, trên trang web toàn cầu). Nội dung của các tài liệu được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án theo sáng chế, mà chỉ dự định minh họa riêng rẽ các khía cạnh riêng rẽ của sáng chế, và các phương án bất kỳ tương đương về mặt chức năng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các cải biến khác nhau so với mô hình và phương pháp theo sáng chế, ngoài các cải biến được nêu trong bản mô tả, là hiển nhiên đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh

vực này từ phần mô tả và cách tiếp cận nêu trên, và được dự định theo cách tương tự để nằm trong phạm vi của sáng chế. Các cải biến hoặc phương án khác như vậy có thể được đưa ra mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Bảng

Bảng I: Các mô/tế bào biểu hiện FLT3 khi mắc bệnh ung thư ác tính.

Bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (“AML”);

Bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (“ALL”)

Bệnh bạch cầu nguyên bào lympho tế bào B;

Bệnh bạch cầu lympho tiền tế bào B.

Bảng II: Các chữ viết tắt của axit amin

Một chữ cái	Ba chữ cái	Tên đầy đủ
F	Phe	phenylalanin
L	Leu	leuxin
S	Ser	serin
Y	Tyr	tyrosin
C	Cys	xystein
W	Trp	tryptophan
P	Pro	prolin
H	His	histidin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
I	Ile	isoleuxin
M	Met	methionin
T	Thr	threonin
N	Asn	asparagin
K	Lys	lysin
V	Val	valin
A	Ala	alanin
D	Asp	axit aspartic
E	Glu	axit glutamic
G	Gly	glyxin

Bảng III: Ma trận thể axit amin

Được tích hợp từ Phần mềm GCG 9.0 BLOSUM62 về ma trận thể axit amin (phong bế ma trận thể). Trị số càng cao, việc thể càng tìm thấy nhiều hơn ở các protein tự nhiên, liên quan. I

[illegible]

Bảng IV. Phương pháp tổng hợp chung AGL-0182-30

Phương pháp tổng hợp chung AGL-0182-30

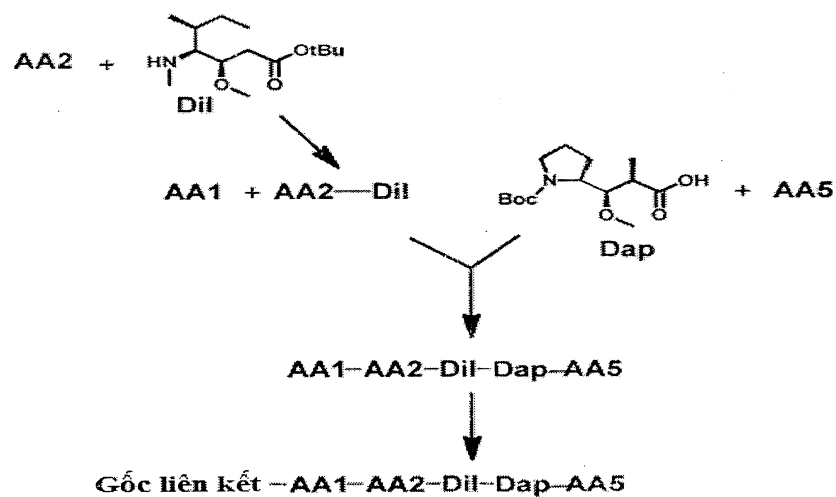
Trong đó AA1 = Axit amin 1

$$AA2 = A_{\text{xit amin}} 2$$
$$AA5 = A_{\text{xit amin}} 5$$

Dil = Dolaisoleuin

Dap = Dolaproin

Gốc liên kết = Aminooxyaxetyl



Bảng V. Các vị trí CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 và CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 như được xác định lần lượt bởi các hệ thống đánh số thứ tự Kabat, Chothia, và Contact. Đối với CDR-H1, việc đánh số gốc được đưa ra bằng cách sử dụng cả hệ thống đánh số thứ tự Kabat lẫn Chothia.

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-L1	L24-L34 RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 14)	L24-L34 RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 15)	L30-L36 RNDLGWY (SEQ ID NO: 16)
CDR-L2	L50-L56 AASSLQS (SEQ ID NO: 17)	L50-L56 AASSLQS (SEQ ID NO: 18)	L46-L55 RLIYAASSLQ (SEQ ID NO: 19)
CDR-L3	L89-L97 LQHNGFPYT (SEQ ID NO: 20)	L89-L97 LQHNGFPYT (SEQ ID NO: 21)	L89-L96 LQHNGFPYT (SEQ ID NO: 22)
CDR-H1*	H31-H35 GYSIN (SEQ ID NO: 23)	H26-H32 GFTFSGY (SEQ ID NO: 24)	H30-H35 SGYSIN (SEQ ID NO: 25)
CDR-H1**	H31-H35 GYSIN (SEQ ID NO: 26)	H26-H32 GFTFSGY (SEQ ID NO: 27)	H30-H35 SGYSIN (SEQ ID NO: 28)
CDR-H2	H50-H65 SISSSSNYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 29)	H52-H56 SSSSN (SEQ ID NO: 30)	H47-H58 WVSSISSSSNYI (SEQ ID NO: 31)
CDR-H3	H95-H102 EGFIAGTTFDAFDI (SEQ ID NO: 32)	H95-H102 EGFIAGTTFDAFDI (SEQ ID NO: 33)	H93-H101 AREGFIAGTTFDAFD (SEQ ID NO: 34)

*Hệ thống đánh số thứ tự Kabat

** Hệ thống đánh số thứ tự Chothia

Bảng VI. Bảng tỷ lệ giữa trị số trung bình hình học và phát huỳnh quang trung bình (MFR) trong thử nghiệm FACS.

Dòng tế bào	Bệnh ung thư	Nguồn	Không được nhuộm	Phát hiện thứ cấp	Isotyp	cHv62-1b21.1	MFR
Karpas-299	ALCL	DSMZ	623	596	569	634	1
REH	ALL	ATCC	220	236	235	16200	69
EOL-1	AML	Sigma/HPA	282	292	281	14000	50
MOLM-13	AML	DSMZ	303	313	320	14000	44
MONOMAC-1	AML	Creative Bioarray	315	348	338	11400	34
MV-4-11	AML	ATCC	344	355	366	2875	8
OCI-AML2	AML	DSMZ	343	337	329	5646	17
PL-21	AML	DSMZ	598	584	570	3715	7
SKM-1	AML	DSMZ	465	449	445	3208	7
THP-1	AML	ATCC	486	475	474	19700	42
RS4;11	B-ALL	ATCC	184	213	213	18400	86
SEM	B-ALL	DSMZ	181	207	212	13200	623
NALM-1	CML	ATCC	197	254	262	12900	49

Bảng VII. Trình tự kháng thể của v62-1b37.1.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng v62-1b37.1. (SEQ ID NO.12).

```

1  EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSG
51  INWNGGSTGYADSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARDG
101 YTYGPFDDNWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
201 ICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
351 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
401 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ v62-1b37.1. (SEQ ID NO.13).

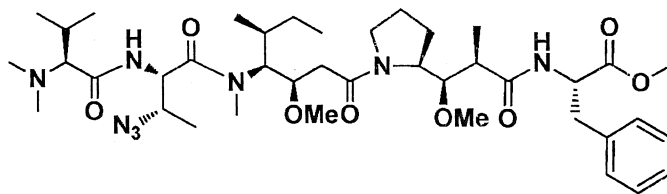
```

1  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPKAPKRLIYA
51  ASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPYTFGQ
101 GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
151 DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
201 LSSPVTKSFNRGEC

```

Bảng VIII. Công thức hóa học của AGL-0129-08.

0129-08 có nghĩa là (S)-metyl 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((2S,3S)-3-azido-2-((S)-2-(dimetylamin)-3-metylbutanamido)-N-metylbutanamido)-3-metoxi-5-metylheptanoyl)pyrolidin-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamido)-3-phenylpropanoat



YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với FLT-3 chứa vùng CDRH1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.23, vùng CDRH2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng CDRH3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32, vùng CDRL1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, vùng CDRL2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, và CDRL3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.20.
2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến S thứ 123 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến R thứ 108 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.
3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121831 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được sản sinh bởi buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121831.
4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng Fc là phân nhóm IgG.
5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng Fc này chứa gốc thay thế axit amin không có trong tự nhiên ở vị trí axit amin 124 của chuỗi nặng, và trong đó axit amin không có trong tự nhiên này là para-axetylphenylalanin (pAF).
6. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến G thứ 452 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.

7. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ E thứ nhất đến K thứ 453 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.
8. Kháng thể theo điểm 5, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121836, và chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin of the light chain của kháng thể được sản sinh bởi tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được lưu trữ tại Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ với mã số đăng ký là PTA-121836.
9. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó axit amin thứ nhất của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng là pyroglutamat.
10. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ V thứ 2 đến G thứ 452 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.11, và trong đó axit amin thứ nhất của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng là pyroglutamat, và trong đó kháng thể này chứa chuỗi nhẹ cấu thành từ trình tự axit amin nằm trong khoảng từ D thứ nhất đến C thứ 214 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10.
11. Mảnh gắn kết kháng nguyên chứa các vùng CDR của kháng thể theo điểm 1, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này gắn kết với FLT-3.
12. Mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 11, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, và scFv.
13. Axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
14. Vector biểu hiện chứa axit nucleic phân lập theo điểm 13.
15. Tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện theo điểm 14.
16. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ tái tổ hợp theo điểm 15.

17. Thễ tiếp hợp kháng thể dược chất chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1 được tiếp hợp với dược chất điều trị bệnh thông qua gốc liên kết.

18. Thễ tiếp hợp kháng thể dược chất theo điểm 17, trong đó gốc liên kết này là gốc liên kết không thể phân cắt.

19. Thễ tiếp hợp kháng thể dược chất theo điểm 18, trong đó gốc liên kết này là axit 2-(aminooxy)axetic.

20. Thễ tiếp hợp kháng thể dược chất theo điểm 17, trong đó dược chất điều trị bệnh là (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-N-metyl-2-((S)-3-metyl-2-(metylamino)butanamido)butanamit.

21. Thễ tiếp hợp kháng thể dược chất theo điểm 17, trong đó thễ tiếp hợp kháng thể dược chất này có công thức sau:

Kháng thể - (Gốc liên kết - Dược chất điều trị bệnh)_p,

trong đó gốc liên kết này là axit 2-(aminooxy)axetic, trong đó dược chất điều trị bệnh là (2S,3S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxo-2-metyl-3-oxopropyl)pyrrolidin-1-yl)-3-metoxo-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-3-azido-N-metyl-2-((S)-3-metyl-2-(metylamino)butanamido)-butanamit, và trong đó p được chọn từ nhóm bao gồm 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, và 3.

22. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị bệnh của thễ tiếp hợp kháng thể dược chất theo điểm 17, và tá dược dược dụng.

23. Dược phẩm theo điểm 22, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều dược chất kháng bệnh ung thư.

Fig.1 (tiếp)

H A E N D D A Q F T K M F T L N I R R K
 1321 CATGCAGAAAATGATGATGCCCCAATTTACCAAAATGTTACAGCTGAATATAAGAAGGAAA
 P Q V L A E A S A S Q A S C F S D G Y P
 1381 CCTCAAGTGCTCGCAGAAGCATCGGCAAGTCAGGCGTCTCTGTTTCTCGGATGGATACCCA
 L P S W T W K K C S D K S P N C T E E I
 1441 TTACCATCTTGGACCTGGAAGAAGTGTTTCAGACAAGTCTCCCAACTGCACAGAAGAGATC
 T E G V W N R K A N R K V F G Q W V S S
 1501 ACAGAAGGAGTCTGGAATAGAAAAGGCTAACAGAAAAGTGTGGACAGTGGGTGTCGAGC
 S T L N M S E A I K G F L V K C C A Y N
 1561 AGTACTCTAAACATGAGTGAAGCCATAAAAGGGTCTCTGGTCAAGTGTGTGCATACAAAT
 S L G T S C E T I L L N S P G P F P F I
 1621 TCCCTTGGCACATCTTGTGAGACGATCCTTTTAAACTCTCCAGGCCCTTCCCTTTTCATC
 Q D N I S F Y A T I G V C L L F I V V L
 1681 CAAGACAACATCTCATTCTATGCAACAATTGGTGTGTCTCTCTCTCATTGTCTGTTTAA
 T L L I C H K Y K K Q F R Y E S Q L Q M
 1741 ACCCTGCTAATTTGTCAAGTACAAAAAGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATG
 V Q V T G S S D N E Y F Y V D F R E Y E
 1801 GTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTTCAGAGAATATGAA
 Y D L K W E F P R E N L E F G K V L G S
 1861 TATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGAAAATTTAGAGTTTGGGAAGGTACTAGGATCA
 G A F G K V M N A T A Y G I S K T G V S
 1921 GGTGCTTTTGGAAAAGTGATGAACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAACAGGAGTCTCA
 I Q V A V K M L K E K A D S S E R E A L
 1981 ATCCAGGTTGCCGTCAAATGCTGAAAGAAAAAGCAGACAGCTCTGAAAGAGAGGCCACTC
 M S E L K M M T Q L G S H E N I V N L L
 2041 ATGTCAGAACTCAAGATGATGACCCAGCTGGGAAGCCACGAGAATATTGTGAACCTGCTG
 G A C T L S G P I Y L I F E Y C C Y G D
 2101 GGGGCGTGCACACTGTCAGGACCAATTTACTTGTATTTTTGAATACTGTTGCTATGGTGAT
 L L N Y L R S K R E K F H R T W T E I F
 2161 CTTCTCAACTATCTAAGAAGTAAAGAGAAAAATTTACAGGACTTGGACAGAGATTTTTC
 K E H N F S F Y P T F Q S H P N S S M P
 2221 AAGGAACACAATTTTCAAGTCTTTTACCCCACTTTTCAATCACATCCAAATTCAGCATGCCT
 G S R E V Q I H P D S D Q I S G L H G N
 2281 GGTTCAAGAGAAGTTTCAGATACACCCGGAAGTCTGGATCAAATCTCAGGGCTTCATGGGAAT
 S F H S E D E I E Y E N Q K R L E E E E
 2341 TCATTTCACTCTGAAGATGAAATTGAATATGAAAACCAAAAAAGGCTGGAAGAAGAGGAG
 D L N V L T F E D L L C F A Y Q V A K G
 2401 GACTTGAATGTGCTTACATTTGAAGATCTTCTTTGCTTTGCATATCAAGTTGCCAAAGGA
 M E F L E F K S C V H R D L A A R N V L
 2461 ATGGAATTTCTGGAATTTAAGTCTGTGTTTCACAGAGACCTGGCCGCCAGGAACGTGCTT
 V T H G K V V K I C D F G L A R D I M S
 2521 GTCACCCACGGGAAAGTGGTGAAGATATGTGACTTTGGATTGGCTCCAGATATCATGAGT
 D S N Y V V R G N A R L P V K W M A P E
 2581 GATTCCAACTATGTTGTGAGGGGCAATGCCCGTGTGCCTGTAAATGGATGGCCCCCGAA
 S L F E G I Y T I K S D V W S Y G I L L
 2641 AGCCTGTTTGAAGGCATCTACACCATTAAAGAGTGATGTCTGGTCAATATGCAATATTACTG

Fig.1 (tiếp)

W E I F S L G V N P Y P G I P V D A N F
 2701 TGGGAAATCTTCTCACTTGGTGTGAATCOTTACCCCTGGCATTCCGGTTGATGCTAACTTC
 Y K L I Q N G F K M D Q P F Y A T E E I
 2761 TACAAACTGATTCAAAATGGATTTAAAATGGATCAGCCATTTTATGCTACAGAAGAAATA
 Y I I M Q S C W A F D S R K R P S F P N
 2821 TACATTATAATGCAATCCTGCTGGGCTTTTGA CTCAAGGAAACGGCCATCCTTCCCTAAT
 L T S F L G C Q L A D A E E A M Y Q N V
 2881 TTGA CTTCGTTTTTAGGATGTCAGCTGGCAGATGCAGAAGAAGCGATGTATCAGAATGTG
 D G R V S E C P H T Y Q N R R P F S R E
 2941 GATGGCCGTGTTTCGGAATGTCCTCACACCTACCCAAACAGGCGACCTTTCAGCAGAGAG
 M D L G L L S P Q A Q V E D S *
 3001 ATGGATTTGGGGCTACTCTCTCCG CAGGCTCAGGTGGAAGATTTCGTAGAGGAACAATTTA
 3061 GTTTTAAGGACTTCATCCCTCCACCTATCCCTAACAGGCTGTAGATTACCCAAACAAGAT
 3121 TAATTTTCATCACTAAAAGAAAATCTATTATCAACTGCTGCTTCACCAGACTTTTCTCTAG
 3181 AAGCTGTCTGCGTTTACTCTTGTTTTCAAAGGGACTTTTGTAAAATCAAATCATCCTGTC
 3241 ACAAGGCAGGAGGAGCTGATAATGAAC TTTATTGGAGCATTGATCTGCATCCAAGGCCTT
 3301 CTCAGGC

Fig.2A. Trình tự ADN bổ sung (SEQ ID NO:3) và trình tự axit amin (SEQ ID NO.4) của chuỗi nặng của CHv62.21. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng một gạch chân là vùng ổn định của IgG1 của chuỗi nặng của người

```

      E V Q L V E S G G G L V R P G G S L R L
1  GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCOCTGGTCAGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
      S C A A S G F T F S G Y S I N W V R Q A
61 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGGCTATAGCATAACTGGGTCCGCCAGGCT
      P G K G L E W V S S I S S S S N Y I Y Y
121 CCAGGGAAGGGGCTGGAATGGCTCTCATCCATTAGTAGTAGTAATTACATATACTAC
      A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
181 GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
      L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G
241 CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGG
      F I A G T T T F D A F D I W G Q G T M V T
301 TTTATAGCTGGAACACTACTTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
      V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
361 GTCTCTTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC
      T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
421 ACCTCTGGGGGCCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
      T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
481 ACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGAACAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTA
      Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
541 CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
      T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K
601 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
      V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L
661 GTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAACCGTGCCACAGCACCTGAACTC
      L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
721 CTGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCC
      R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
781 CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
      F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
841 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
      Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
901 CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTG
      N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
961 AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
      T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
1021 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
      R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
1081 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTGTATCCC
      S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1141 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGACCAATGGGCGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG
      P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K
1201 CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGGTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
      S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N

```

Fig.2A (tiếp)

1261 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
H Y T Q K S L S L S P G K *

1321 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

Fig.2B. Trình tự ADN bổ sung (SEQ ID NO:5) và trình tự axit amin (SEQ ID NO.6) của chuỗi nhẹ của CHv62.21. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng một gạch chân là vùng hằng định kappa của người

```

      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
1  GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACC
      I T C R A S Q G I R N D L G W Y Q Q K P
61 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
      G K A P K R L I Y A A S S L Q S G V P S
121 GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
      R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P
181 AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
      E D F A T Y Y C L Q H N G F P Y T F G Q
241 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAG
      G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P
301 GGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
      S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
361 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
      P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
421 CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
      E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
481 GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAAG
      L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
541 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
      L S S P V T K S F N R G E C *
601 CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

```

Fig.2C. Trình tự ADN bổ sung (SEQ ID NO:7) và trình tự axit amin (SEQ ID NO.8) của chuỗi nhẹ của CHv62.21 được cải biến bằng cách chèn axit amin không có trong tự nhiên. Vị trí được đánh dấu bằng X là vị trí của bộ ba mã hóa amber để chèn axit amin không có trong tự nhiên para-axetylphenylalanine (pAF) ở gốc axit nucleic 371. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng một gạch chân là vùng hằng định của IgG1 của chuỗi nặng của người.

```

      E V Q L V E S G G G L V R P G G S L R L
1  GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
      S C A A S G F T F S G Y S I N W V R Q A
61 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGGCTATAGCATAAACTGGGTCCGCCAGGCT
      P G K G L E W V S S I S S S S N Y I Y Y
121 CCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAATTACATATACTAC
      A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
181 GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
      L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G
241 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGGG
      F I A G T T F D A F D I W G Q G T M V T
301 TTTATAGCTGGAACACTACTTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
      V S S K S T K G P S V F P L A P S S K S
361 GTCTCTTCATAGTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC
      T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
421 ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
      T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
481 ACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTA
      Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
541 CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
      T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K
601 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACACGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
      V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L
661 GTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTC
      L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
721 CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCC
      R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K
781 CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
      F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
841 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
      Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
901 CAGTACACACGACGTAACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTG
      N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
961 AATGGCAAGCAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
      T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
1021 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCC
      R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
1081 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGCCTTCTATCCC
      S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
1141 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG

```

Fig.2C (tiếp)

P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K
1201 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCAACCGTGGACAAG
S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N
1261 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
H Y T Q K S L S L S P G K *
1321 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAA

Fig.3A. Trình tự axit amin (SEQ ID NO.9) của chuỗi nặng của CHv62.21. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng một gạch chân là vùng hằng định của IgG1 của người

```

1  EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFSGY SINWVRQAPGKGLEWVSS
51 ISSSSNYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
101 FIAGTTFDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
151 LVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
201 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
251 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
401 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
451 PGK

```


Fig.3B. Trình tự axit amin (SEQ ID NO.10) của chuỗi nhẹ của CHv62.21. Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng một gạch chân là vùng hằng định kappa của người.

```

      1  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGITRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYA
51  ASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLOHNGFPPYTFGQ
101 GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
151 DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
201 LSSPVTKSFNRGEC

```

Fig.3C. Trình tự axit amin (SEQ ID NO.11) của chuỗi nặng của CHv62.21. Vị trí axit amin số 124, được đánh dấu bằng X là vị trí của bộ ba mã hóa amber để xen axit amin không có trong tự nhiên ("nnAA"). Vùng hai gạch chân là vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng một gạch chân là vùng hằng định của IgG1 của người.

```

1  EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTESGYSINWVRQAPGKGLEWVSS
51 ISSSSNYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
101 FIAGTTFDAFDIWGQGTMTVSSXSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
151 LVKDYFPEPVTVSWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
201 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
251 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
301 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
351 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
401 PPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLS
451 PGK

```

Fig. 4A

[illegible]

Fig.4B
Trình tự sắp thẳng hàng của chuỗi nhẹ CHv62.21 với dòng phôi Ig của người

Query_1	1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R	90
IGKV1-17*01	1	G A C A T C C A G A T S A C C A G T C C A T C C T G T G T C A T C T G T A G G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C G G G C A A G T C A G G C A T T A G A	90
V 99.3% (282/284)			
		D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R	
Query_1	91	N D L G W Y Q Q K P G K A P K R L I Y A A S S L Q S G V P S	180
IGKV1-17*01	91	A A T G A T T A G G C T G T A T C A G A G A C C A G G A A G C C C T A G C C T G A T C T A T G C T G C A T C C A G T T T G C A A G T G G G T C C C A T C A	180
V 99.3% (282/284)			
		N D L G W Y Q Q K P G K A P K R L I Y A A S S L Q S G V P S	
Query_1	181	R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q	270
IGKV1-17*01	181	A G G T C A G S G G C A G T G G A T C A G A G A T C A C T C T C A C A T C A G A G C C T G C A G S C T G A G A T T T T C A C T A T T A C T G T C T A C A G	270
V 99.3% (282/284)			
		R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q	
Query_1	271	H N G F P Y T F G Q G T K L E I K	322
IGKV1-17*01	271	C A T A T G G T T C C G T A C A C T T T G G C C A G G A C C A G A C T G A G A T C A A C	284
V 99.3% (282/284)			
		H N S Y P	
J 100.0% (38/38)	2		39

Fig.5

SQ 14-019

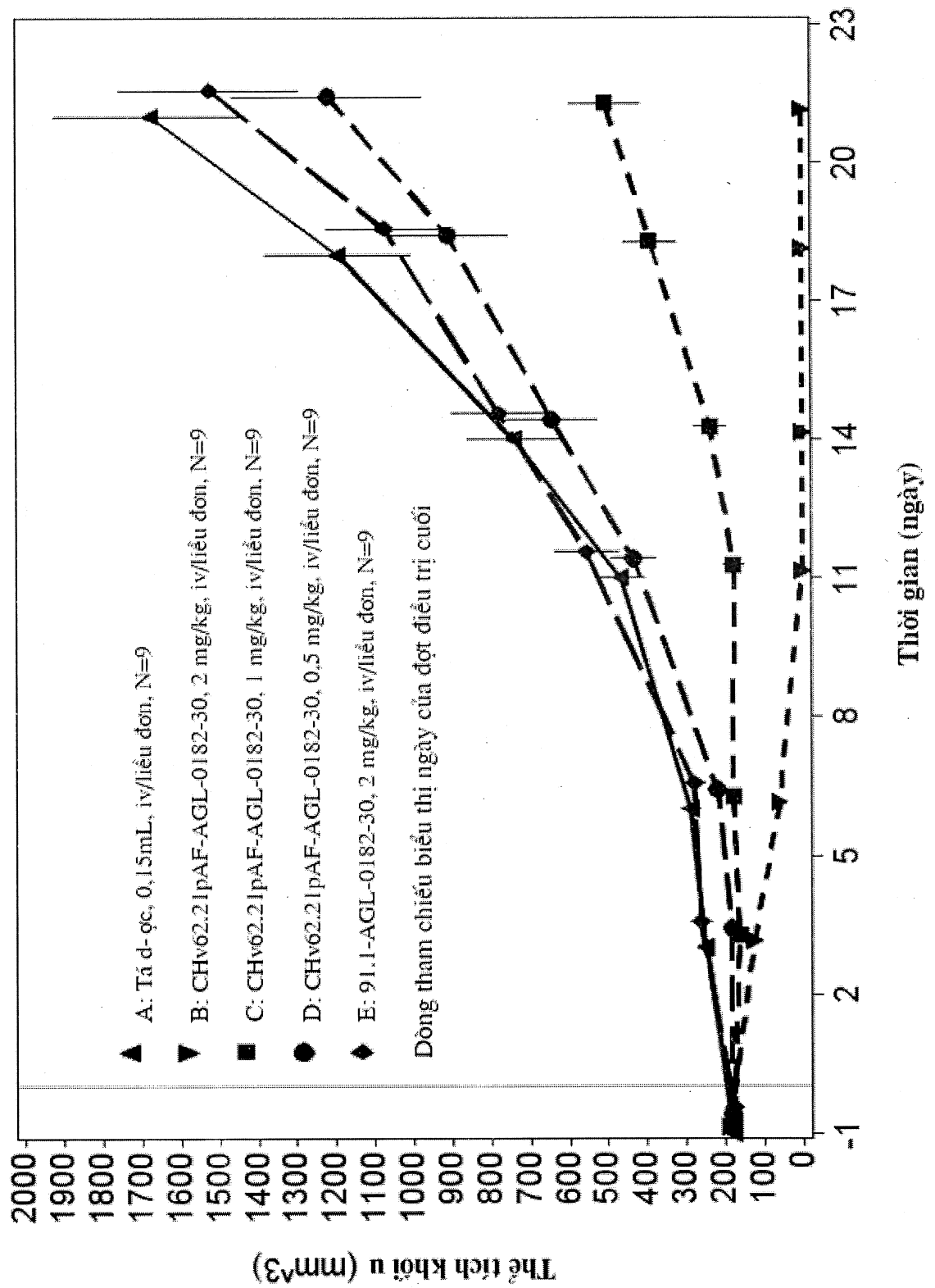


Fig.6

SQ 14-056

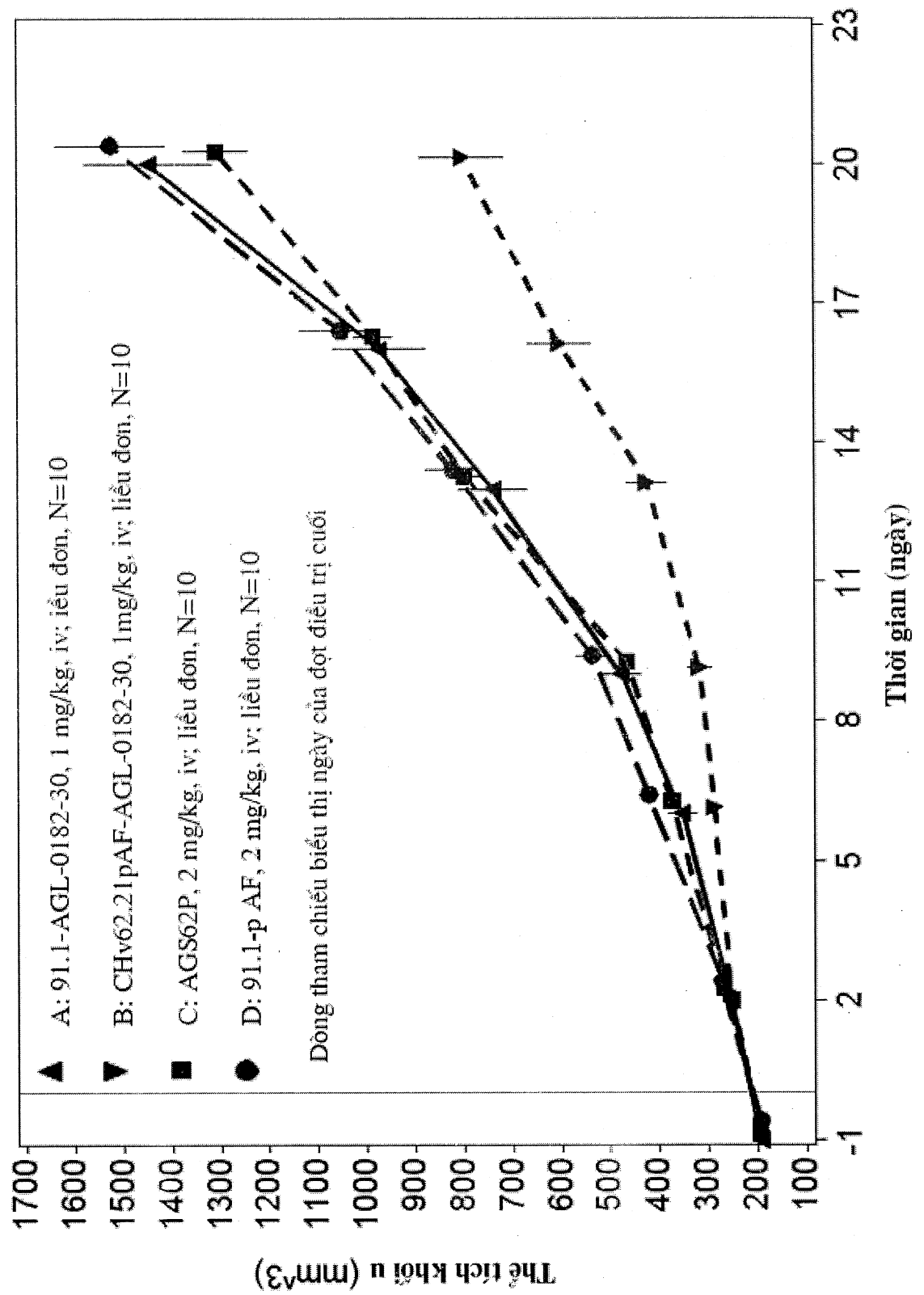


Fig.7

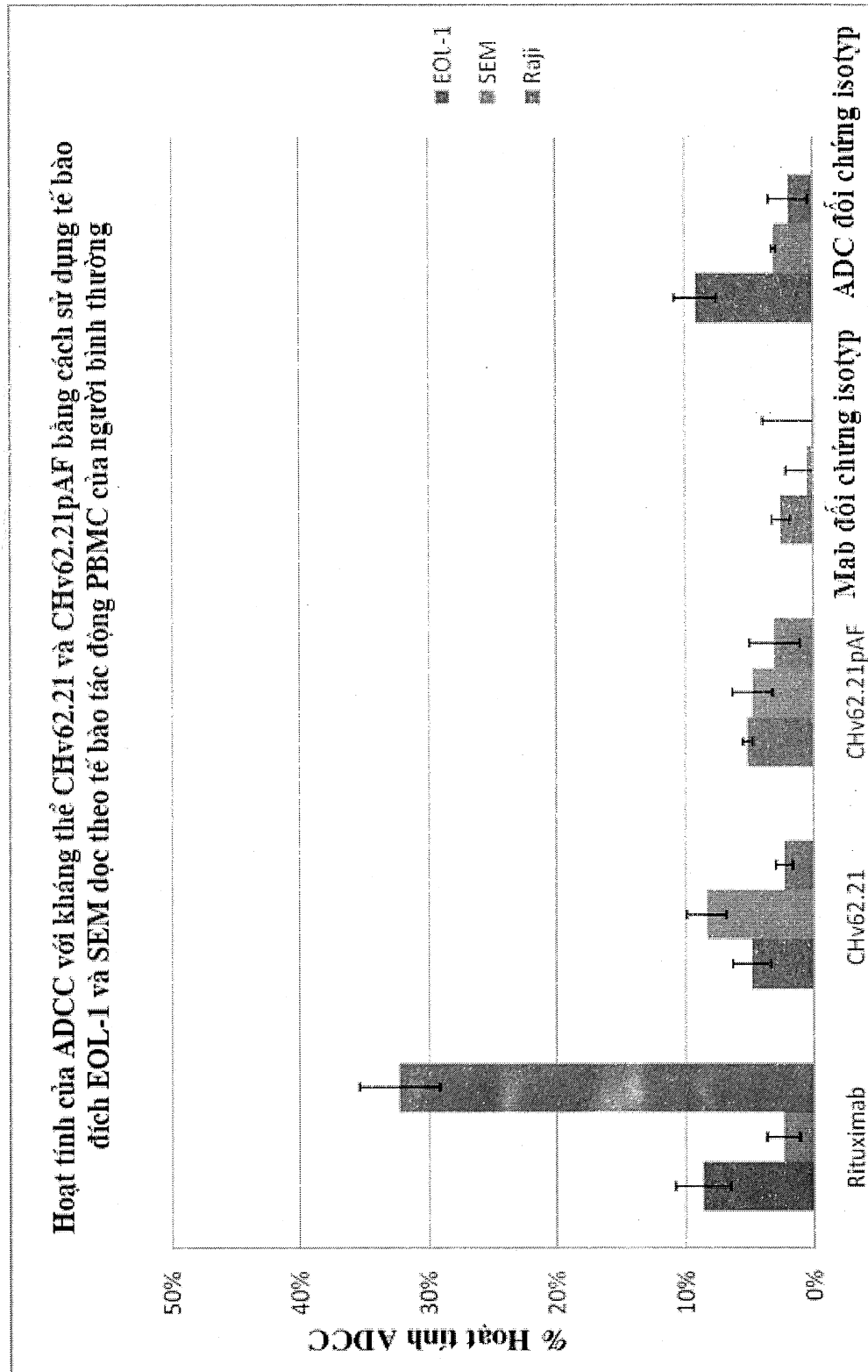


Fig.8

Một số kháng thể v62 bảo vệ thụ thể Flt3 đã- ọc biotinyl hóa thu được từ quá trình gắn kết với dạng Flt3-Fc được bất động

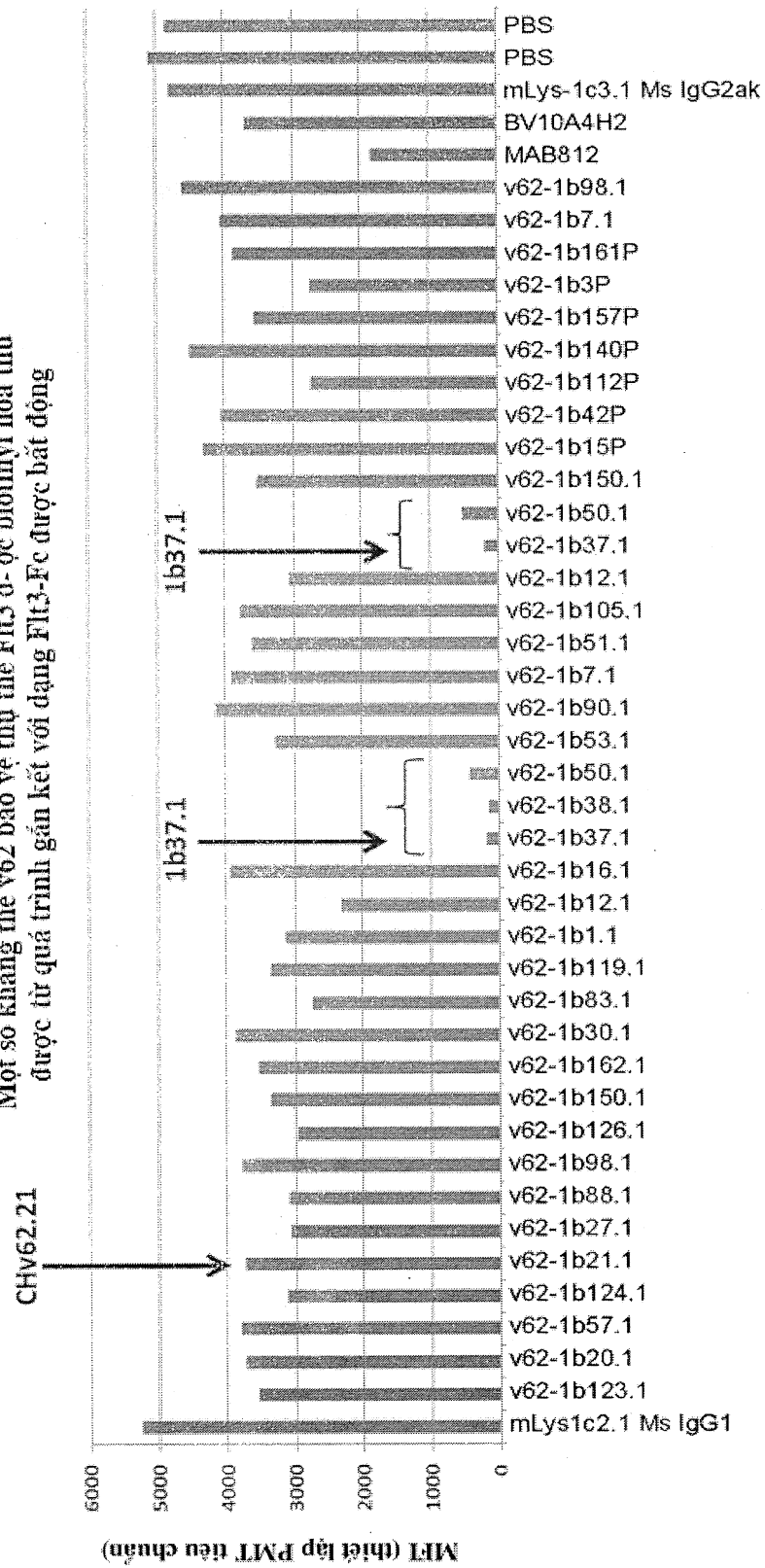


Fig.9

Phát triển EOL1 + hFL

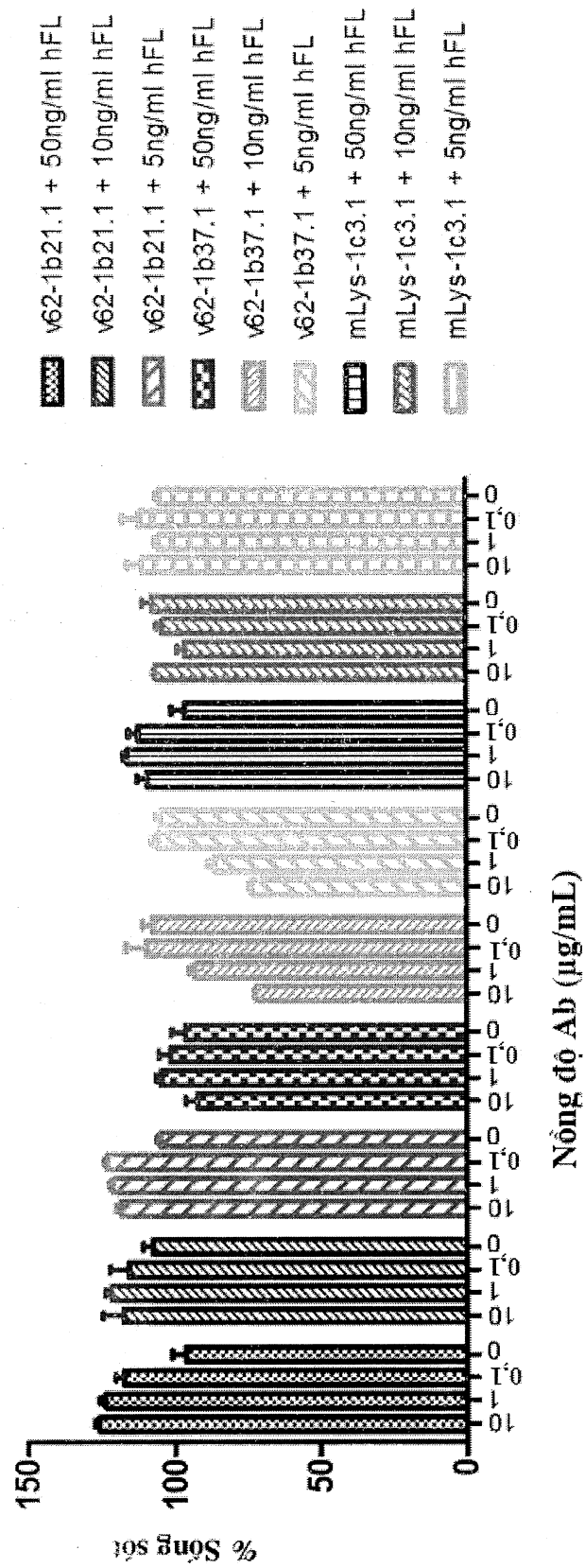


Fig.10

Hoạt tính gây độc tế bào của mAb phong bế phối tử 1b37.1 được giảm khi có mặt FL

Fig.10A

CHv62.21 (chất không phong bế thụ thể)
Gây độc tế bào RS-4-11

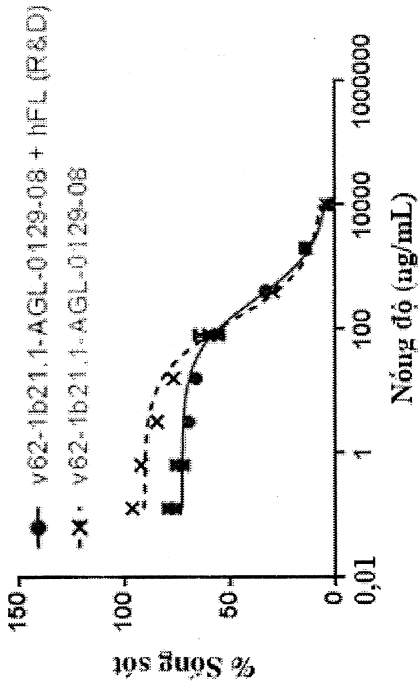
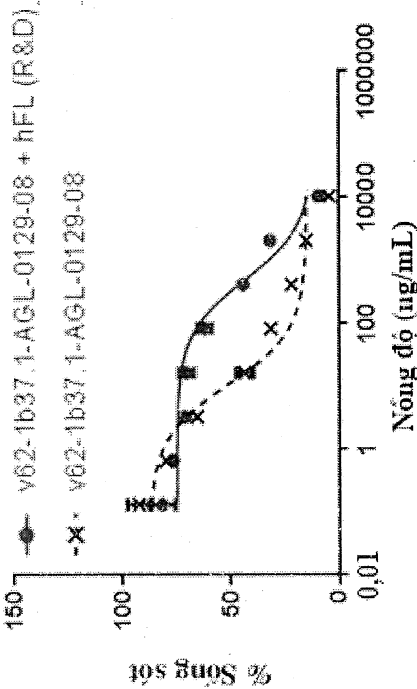


Fig.10B

1b37.1 (chất phong bế thụ thể)
Gây độc tế bào RS-4-11



ADC	Phối tử	DAR	RS411		
			IC50 (ng/ml)	Trị số R ²	Điểm gấp nếp
v62 1b21.1-AGL-0129-08	hFLT3 (R&D)	5,3	304	0,984	2,2
	N/A		138,6	0,9865	N/A
1b37.1-AGL-0129-08	hFLT3 (R&D)	3,9	472,3	0,9506	45,5
	N/A		10,37	0,9573	N/A

Fig.11

Thụ thể FLT3 không gây cản trở hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian CHV62.21pAF-AGL-0182-30 ở tế bào MOLM-13

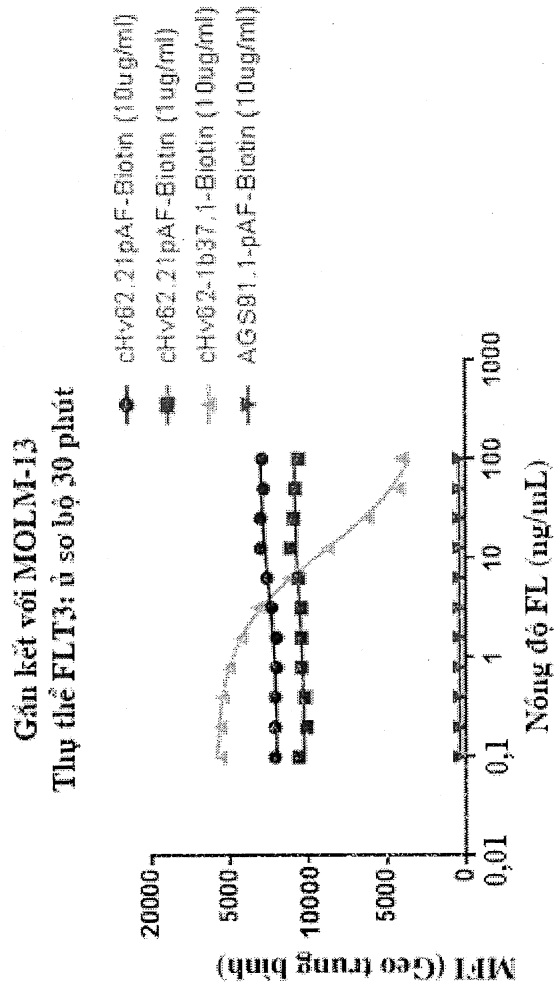


Fig.11B

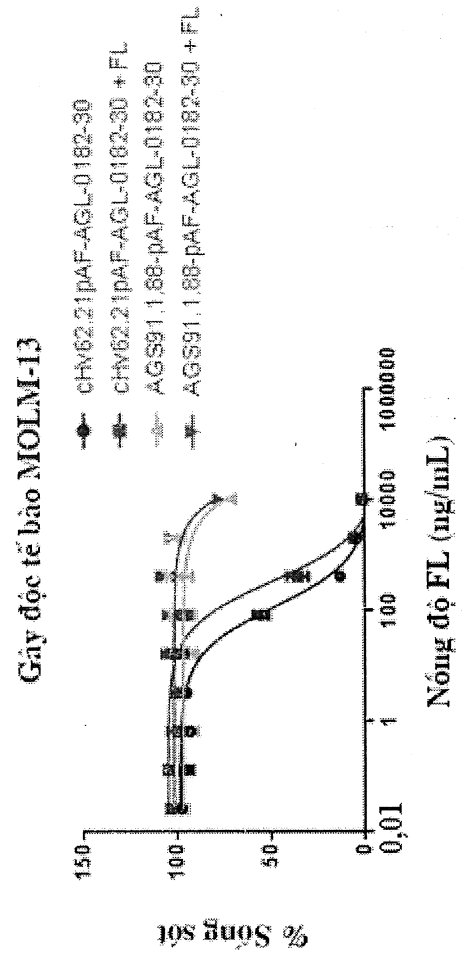


Fig.12

So sánh độ ổn định *in vitro* của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 với ADC chứa FLT3 CHv62-1b21-AGL-0301-20-

Fig.12A. Độ ổn định của CHv62.21pAF-AGL-0182-30 ở huyết thanh người

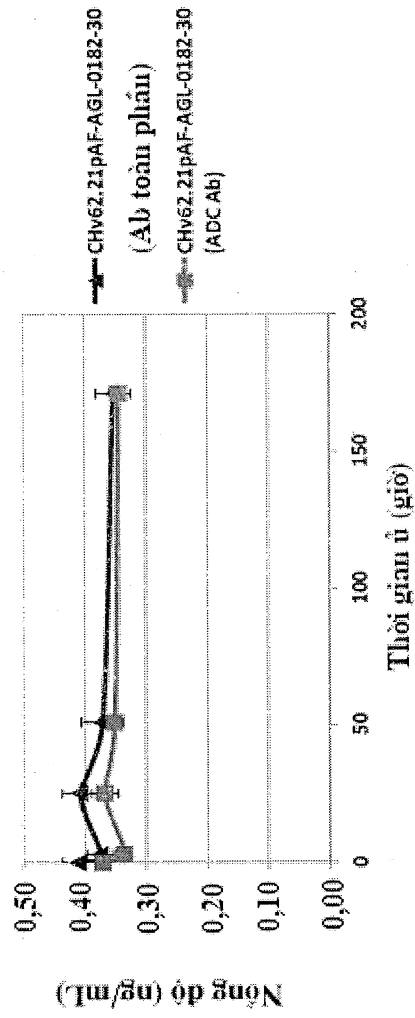


Fig. 12B. Độ ổn định của cHv62-1b21-AGL-0301-20 ở huyết thanh người

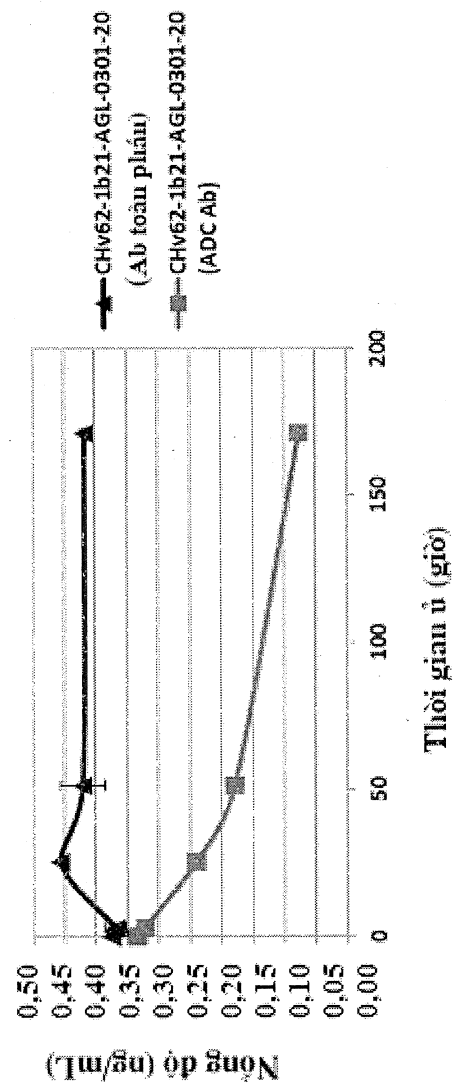


Fig.13

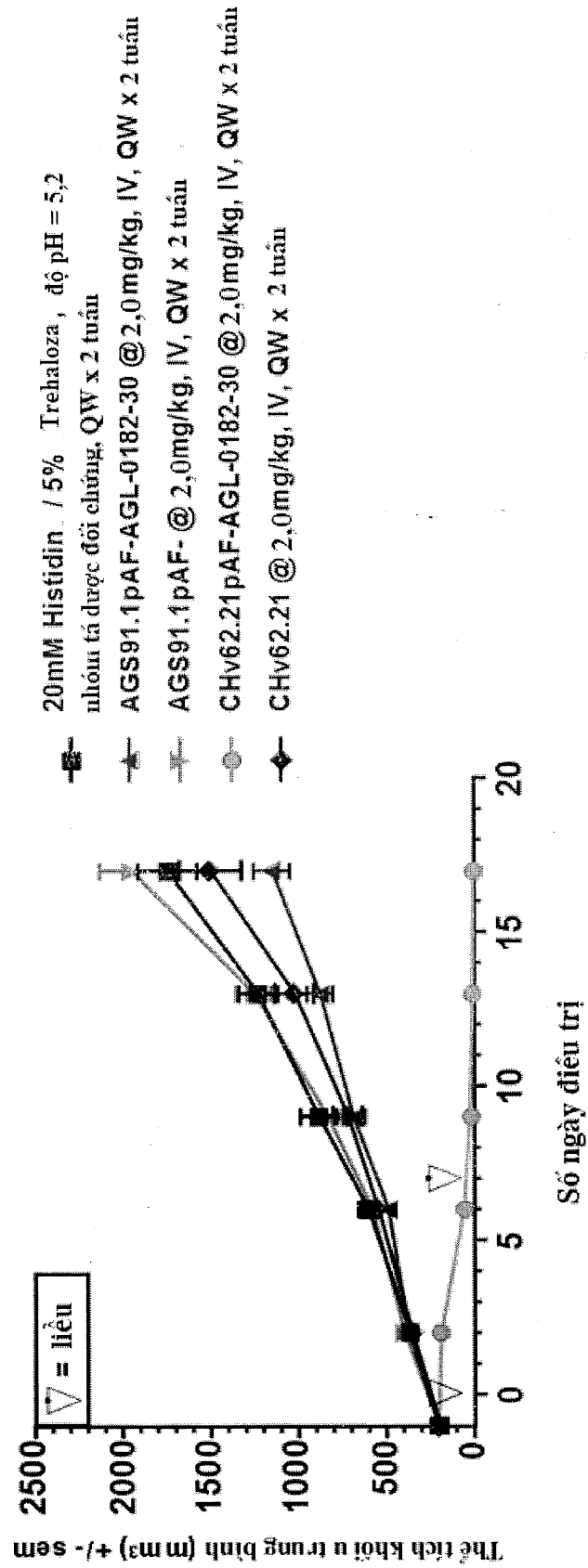
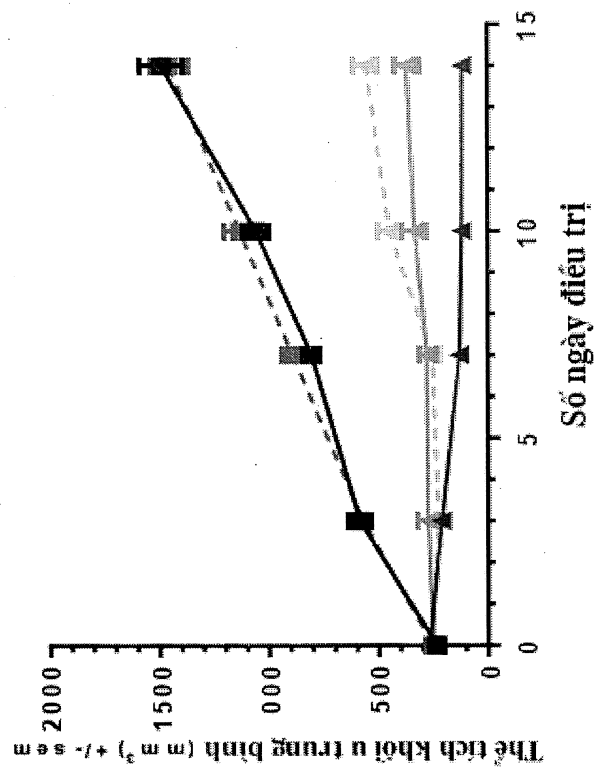


Fig.14

SQ 14-077/SEM-xcI/CV



■ Nhóm tá được đối chứng 20mM histidin/5% Trehaloza, độ pH = 5,2

■ AGS91.1-AGL-0182-30 @ 5 mg/kg, 1 lần

▲ CHv62.21pAF-AGL-0182-30 @ 5 mg/kg, 1 lần

▲ CHv62.21pAF-AGL-0182-30 @ 2 mg/kg, 1 lần

▲ CHv62.21pAF-AGL-0182-30 @ 1 mg/kg, 1 lần

Fig.15

Biểu đồ thể hiện kết quả của FACS gắn kết/dòng tế bào

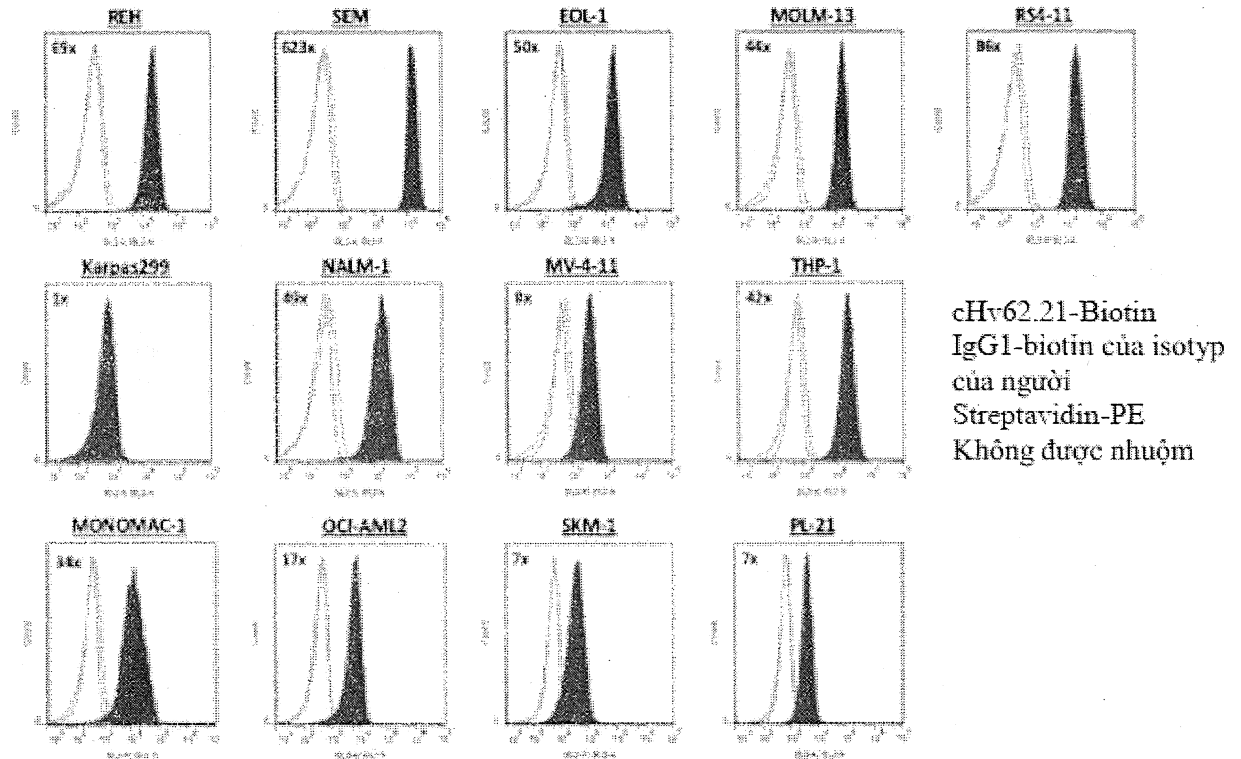
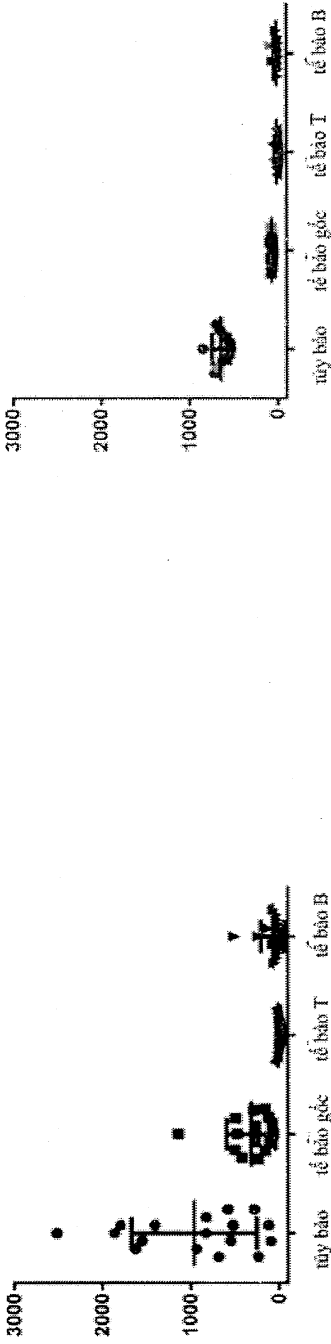


Fig.16

Biểu hiện FLT3 ở các mẫu AML sơ cấp và mẫu bình thường

Biểu hiện FLT3 ở mẫu AML

Biểu hiện ở mẫu bình thường



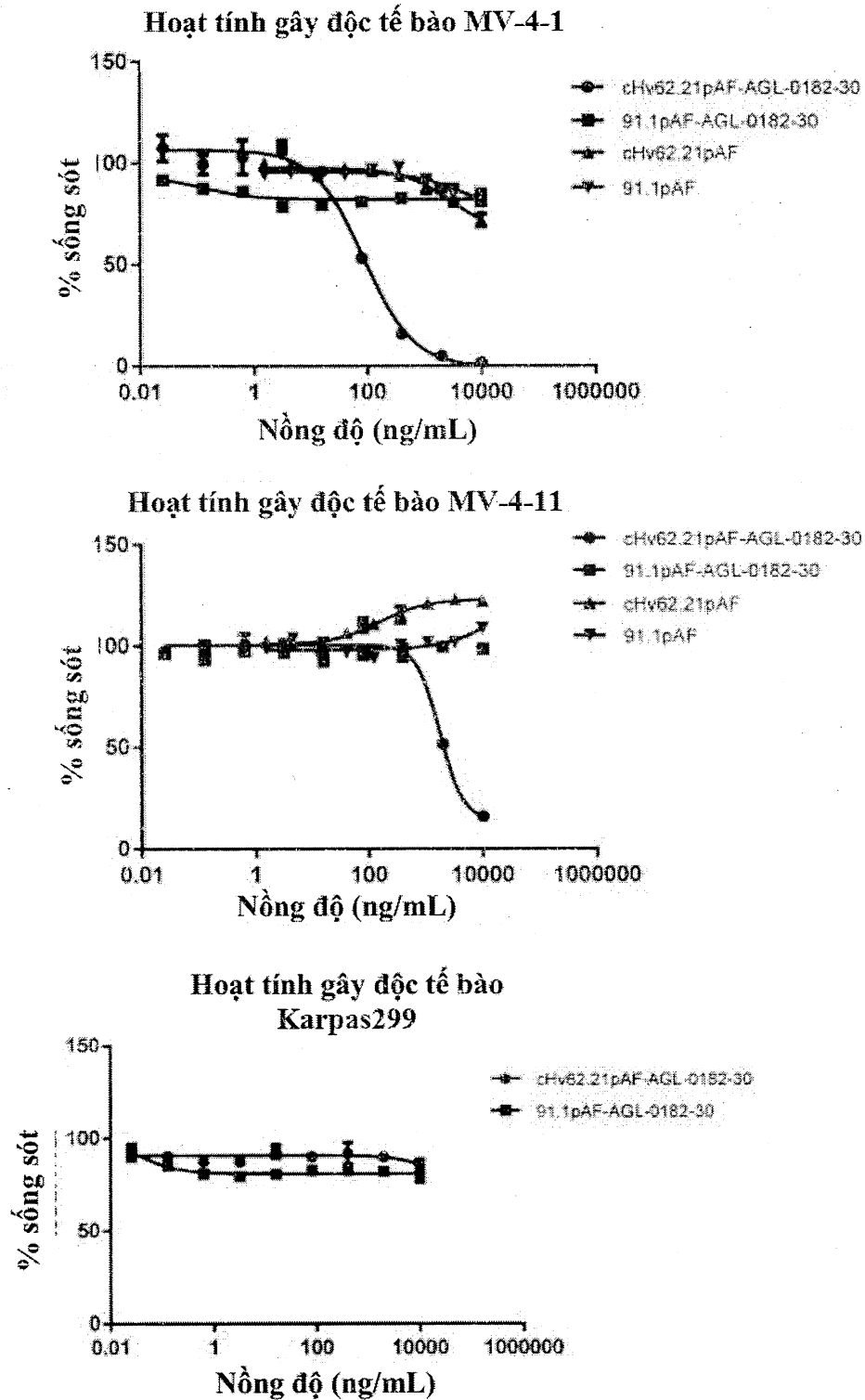
Mẫu AML

	Tủy bào	Tế bào gốc	Tế bào T	Tế bào B
Trung bình	963,1	318,3	9,842	72,60

9 mẫu máu ở tủy sống/l mẫu tủy xương

	Tủy bào	Tế bào gốc	Tế bào T	Tế bào B
Trung bình	642,4	68,29	11,66	13,73

Fig.17. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào in-vitro của CHv62.21 pAF-AGL-0182-30 và CHv62.21 pAF trên các tế bào MOLM-13, MV-4-11 & Karpas299



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AGENSYS, INC.
 <120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI PROTEIN FLT3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> 511582009200
 <140> Chưa được gán
 <141> Concurrently Herewith
 <150> US 62/130,476
 <151> 2015-03-09
 <160> 34
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 3307
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> FLT3 của người
 <400> 1

```

gttttacacg aggcggcatc gcagggctgg gccggcgcg cctggggacc ccgggctccg 60
gaggccatgc cggcggttggc gcgcgacggc ggccagctgc cgctgctcgt tgttttttct 120
gcaatgatata ttgggactat tacaaatcaa gatctgcctg tgatcaagtg tgttttaatc 180
aatcataaga acaatgattc atcagtgggg aagtcattcat catatcccat ggtatcagaa 240
tccccggaag acctcgggtg tgcgttgaga cccagagctc cagggacagt gtacgaagct 300
gccgctgtgg aagtggatgt atctgcttcc atcacactgc aagtgctggt cgatgcccc 360
gggaacattt cctgtctctg ggtctttaag cacagctccc tgaattgcca gccacatttt 420
gatttacaaa acagaggagt tgtttccatg gtcattttga aaatgacaga aaccaagct 480
ggagaatacc tactttttat tcagagtga gctaccaatt acacaatatt gtttacagt 540
agtataagaa ataccctgct ttacacattt agaagacctt acttttagaaa aatggaaaac 600
caggacgccc tggctcgcac atctgagagc gttccagagc cgatcgtgga atgggtgctt 660
tgcgattcac aggggggaaa ctgtaaaaga gaaagtcag ctggtgttaa aaaggaggaa 720
aaagtgcctt atgaattatt tgggatggac ataaggtgct gtgccagaaa tgaactgggc 780
agggaatgca ccaggctggt cacaatagat ctaaatcaaa ctctcagac cacattgcca 840
caattatttt ttaaagtagg ggaaccctta tggataaggt gcaaagctgt tcatgtgaac 900
catggattcg ggctcacctg ggaattagaa aacaaagcac tcgaggaggg caactacttt 960
gagatgagta cctattcaac aaacagaact atgatacggg ttctgtttgc tttgtatca 1020
tcagtggcaa gaaacgacac cggatactac acttgttccct cttcaaagca tcccagtc 1080
tcagctttgg ttaccatcgt agaaaaggga tttataaatg ctaccaattc aagtgaagat 1140
tatgaaaattg accaatatga agagttttgt ttttctgtca ggtttaaagc ctaccacaa 1200
atcagatgta cgtggacctt ctctcgaaaa tcatttcctt gtgagcaaaa ggtccttgat 1260
aacggataca gcatatccaa gttttgcaat cataagcacc agccaggaga atatatattc 1320
catgcagaaa atgatgatgc ccaatttacc aaaatgttca cgctgaatat aagaaggaaa 1380
cctcaagtgc tcgcagaagc atcggcaagt caggcgctct gtttctcgga tggataccca 1440
ttaccatctt ggacctggaa gaagtgttca gacaagtctc ccaactgcac agaagagatc 1500
acagaaggag tctggaatag aaaggctaac agaaaagtgt ttggacagtg ggtgtcgagc 1560
agtactctaa acatgagtga agccataaaa ggttctcctg tcaagtgtgt tgcatacaat 1620
tcccttgcca catcttgtga gacgatcctt ttaaactctc caggcccctt ccctttcatc 1680
caagacaaca tctcattcta tgcaacaatt ggtgtttgtc tcctcttcat tgtcgtttta 1740
accctgctaa tttgtcacaa gtacaaaaag caatttaggt atgaaagcca gctacagatg 1800
gtacaggtga ccggctcctc agataatgag tacttctacg ttgatttcag agaatatgaa 1860
tatgatctca aatgggagtt tccaagagaa aatttagagt ttgggaagggt actaggatca 1920
ggtgcttttg gaaaagtgat gaacgcaaca gcttatggaa ttagcaaaaac aggagtctca 1980
atccaggttg ccgtcaaaaat gctgaaagaa aaagcagaca gctctgaaag agaggcactc 2040
atgtcagaac tcaagatgat gaccagctg ggaagccacg agaattattg gaacctgctg 2100
ggggcggtga cactgtcagg accaatttac ttgatttttg aatactgttg ctatggtgat 2160
cttctcaact atctaagaag taaaagagaa aaatttcaca ggacttggac agagattttc 2220
aaggaacaca atttcagttt ttaccccact ttccaatcac atccaaattc cagcatgcct 2280
ggttcaagag aagttcagat acaccgggac tcggatcaaa tctcagggct tcatgggaat 2340
tcatttcact ctgaagatga aattgaatat gaaaaccaa aaaggctgga agaaggagg 2400
gacttgaatg tgcttacatt tgaagatctt ctttgctttg catatcaagt tgccaaagga 2460
atggaatttc tggaaattta gtctgtgtgt cacagagacc tggccgccag gaacgtgctt 2520
gtcaccacgc ggaaagtggg gaagatatgt gactttggat tggctcgaga tatcatgagt 2580
gattccaact atgttgtcag gggcaatgcc cgtctgcctg taaaatggat ggccccgaa 2640
agcctgtttg aaggcatcta caccattaag agtgatgtct ggtcatatgg aatattactg 2700

```

tgggaaatct tctcacttgg tgtgaatcct taccctggca ttccggttga tgctaacttc 2760
 tacaaactga ttcaaaatgg atttaaaatg gatcagccat tttatgctac agaagaaata 2820
 tacattataa tgcaatcctg ctgggctttt gactcaagga aacggccatc cttccctaata 2880
 ttgacttctg ttttaggatg tcagctggca gatgcagaag aagcgatgta tcagaatgtg 2940
 gatggccgtg tttcgggaatg tcctcacacc taccaaaaca ggcgaccttt cagcagagag 3000
 atggatttgg ggctactctc tccgcaggct caggtcgaag attcgtagag gaacaattta 3060
 gttttaagga cttcatccct ccacctatcc ctaacaggct gtagattacc aaaacaagat 3120
 taatttcac cactaaaagaa aatctattat caactgctgc ttcaccagac ttttctctag 3180
 aagctgtctg cgtttactct tgttttcaaa gggacttttg taaaatcaaa tcatcctgtc 3240
 acaaggcagg aggagctgat aatgaacttt attggagcat tgatctgcat ccaaggcctt 3300
 ctcaggc 3307

<210> 2

<211> 993

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FLT3 của người

<400> 2

Met	Pro	Ala	Leu	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Val
1				5					10					15	
Phe	Ser	Ala	Met	Ile	Phe	Gly	Thr	Ile	Thr	Asn	Gln	Asp	Leu	Pro	Val
			20					25					30		
Ile	Lys	Cys	Val	Leu	Ile	Asn	His	Lys	Asn	Asn	Asp	Ser	Ser	Val	Gly
		35				40					45				
Lys	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Val	Ser	Glu	Ser	Pro	Glu	Asp	Leu	Gly
	50					55					60				
Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly	Thr	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Ala
65					70					75				80	
Val	Glu	Val	Asp	Val	Ser	Ala	Ser	Ile	Thr	Leu	Gln	Val	Leu	Val	Asp
			85						90					95	
Ala	Pro	Gly	Asn	Ile	Ser	Cys	Leu	Trp	Val	Phe	Lys	His	Ser	Ser	Leu
			100						105				110		
Asn	Cys	Gln	Pro	His	Phe	Asp	Leu	Gln	Asn	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Met
		115					120					125			
Val	Ile	Leu	Lys	Met	Thr	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Tyr	Leu	Leu	Phe
	130					135					140				
Ile	Gln	Ser	Glu	Ala	Thr	Asn	Tyr	Thr	Ile	Leu	Phe	Thr	Val	Ser	Ile
145					150					155				160	
Arg	Asn	Thr	Leu	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Arg	Pro	Tyr	Phe	Arg	Lys	Met
			165						170					175	
Glu	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Val	Cys	Ile	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Glu	Pro
		180							185				190		
Ile	Val	Glu	Trp	Val	Leu	Cys	Asp	Ser	Gln	Gly	Glu	Ser	Cys	Lys	Glu
	195					200						205			
Glu	Ser	Pro	Ala	Val	Val	Lys	Lys	Glu	Glu	Lys	Val	Leu	His	Glu	Leu
	210					215					220				
Phe	Gly	Met	Asp	Ile	Arg	Cys	Cys	Ala	Arg	Asn	Glu	Leu	Gly	Arg	Glu
225					230					235				240	
Cys	Thr	Arg	Leu	Phe	Thr	Ile	Asp	Leu	Asn	Gln	Thr	Pro	Gln	Thr	Thr
			245						250					255	
Leu	Pro	Gln	Leu	Phe	Leu	Lys	Val	Gly	Glu	Pro	Leu	Trp	Ile	Arg	Cys
		260						265					270		
Lys	Ala	Val	His	Val	Asn	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Thr	Trp	Glu	Leu	Glu
	275						280					285			
Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Gly	Asn	Tyr	Phe	Glu	Met	Ser	Thr	Tyr	Ser
	290					295					300				
Thr	Asn	Arg	Thr	Met	Ile	Arg	Ile	Leu	Phe	Ala	Phe	Val	Ser	Ser	Val
305					310					315				320	
Ala	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Cys	Ser	Ser	Ser	Lys	His	Pro
			325						330					335	
Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Ile	Val	Glu	Lys	Gly	Phe	Ile	Asn	Ala
	340							345					350		
Thr	Asn	Ser	Ser	Glu	Asp	Tyr	Glu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Glu	Glu	Phe	Cys

355		360		365
Phe Ser Val Arg Phe Lys Ala Tyr Pro Gln Ile Arg Cys Thr Trp Thr				
370		375		380
Phe Ser Arg Lys Ser Phe Pro Cys Glu Gln Lys Gly Leu Asp Asn Gly				
385		390		395
Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys Asn His Lys His Gln Pro Gly Glu Tyr				400
	405		410	
Ile Phe His Ala Glu Asn Asp Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe Thr				415
	420		425	430
Leu Asn Ile Arg Arg Lys Pro Gln Val Leu Ala Glu Ala Ser Ala Ser				
	435		440	445
Gln Ala Ser Cys Phe Ser Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Ser Trp Thr Trp				
	450		455	460
Lys Lys Cys Ser Asp Lys Ser Pro Asn Cys Thr Glu Glu Ile Thr Glu				
465		470		475
Gly Val Trp Asn Arg Lys Ala Asn Arg Lys Val Phe Gly Gln Trp Val				480
	485		490	495
Ser Ser Ser Thr Leu Asn Met Ser Glu Ala Ile Lys Gly Phe Leu Val				
	500		505	510
Lys Cys Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Gly Thr Ser Cys Glu Thr Ile Leu				
	515		520	525
Leu Asn Ser Pro Gly Pro Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ile Ser Phe				
	530		535	540
Tyr Ala Thr Ile Gly Val Cys Leu Leu Phe Ile Val Val Leu Thr Leu				
545		550		555
Leu Ile Cys His Lys Tyr Lys Lys Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu				560
	565		570	575
Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val				
	580		585	590
Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu				
	595		600	605
Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val				
	610		615	620
Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln				
625		630		635
Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Lys Ala Asp Ser Ser Glu Arg Glu				640
	645		650	655
Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Met Met Thr Gln Leu Gly Ser His Glu				
	660		665	670
Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Leu Ser Gly Pro Ile Tyr				
	675		680	685
Leu Ile Phe Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Tyr Leu Arg				
	690		695	700
Ser Lys Arg Glu Lys Phe His Arg Thr Trp Thr Glu Ile Phe Lys Glu				
705		710		715
His Asn Phe Ser Phe Tyr Pro Thr Phe Gln Ser His Pro Asn Ser Ser				
	725		730	735
Met Pro Gly Ser Arg Glu Val Gln Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Ile				
	740		745	750
Ser Gly Leu His Gly Asn Ser Phe His Ser Glu Asp Glu Ile Glu Tyr				
	755		760	765
Glu Asn Gln Lys Arg Leu Glu Glu Glu Glu Asp Leu Asn Val Leu Thr				
	770		775	780
Phe Glu Asp Leu Leu Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Glu				
785		790		795
Phe Leu Glu Phe Lys Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn				800
	805		810	815
Val Leu Val Thr His Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu				
	820		825	830
Ala Arg Asp Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val Val Arg Gly Asn Ala				
	835		840	845
Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Phe Glu Gly Ile				
850		855		860

Tyr Thr Ile Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu
 865 870 875 880
 Ile Phe Ser Leu Gly Val Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Asp Ala
 885 890 895
 Asn Phe Tyr Lys Leu Ile Gln Asn Gly Phe Lys Met Asp Gln Pro Phe
 900 905 910
 Tyr Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Ile Ile Met Gln Ser Cys Trp Ala Phe
 915 920 925
 Asp Ser Arg Lys Arg Pro Ser Phe Pro Asn Leu Thr Ser Phe Leu Gly
 930 935 940
 Cys Gln Leu Ala Asp Ala Glu Glu Ala Met Tyr Gln Asn Val Asp Gly
 945 950 955 960
 Arg Val Ser Glu Cys Pro His Thr Tyr Gln Asn Arg Arg Pro Phe Ser
 965 970 975
 Arg Glu Met Asp Leu Gly Leu Leu Ser Pro Gln Ala Gln Val Glu Asp
 980 985 990

Ser

<210> 3

<211> 1362

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nặng của CHv62.21

<400> 3

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaggc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctgggatt caccttcagt ggctatagca taaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggaatg ggtctcatcc attagtagta gtagtaatta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaggg 300
 tttatagctg gaactacttt tgatgctttt gatatctggg gccaaaggac aatgggtcacc 360
 gtctcttcag catccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
 acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaaa 660
 gttgagccca aatcttgatga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720
 ctgggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780
 cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgaggaggag 900
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080
 cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
 cctcccgtyg tggactccga cggctccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag 1260
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattaggc tctgcacaac 1320
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat aa 1362

<210> 4

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nặng của CHv62.21

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 5

<211> 645

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nhệ của CHv62.21

<400> 5

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatggtt tcccgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acggactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 645

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của CHv62.21

<400> 6

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp
			20					25					30		
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70				75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asn	Gly	Phe	Pro	Tyr
			85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115				120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155				160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
			165					170					175		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210														

<210> 7

<211> 1362

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nặng của CHv62.21

<400> 7

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ctgggtcaggc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	ggctatagca	taaactgggt	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	ggctggaatg	ggtctcatcc	attagtagta	gtagtaatta	catatactac	180
gcagactcag	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
ctgcaaata	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagaaggg	300
tttatagctg	gaactacttt	tgatgctttt	gatatctggg	gccaagggac	aatggtcacc	360
gtctcttcat	agtccaccaa	gggcccatcg	gtcttcccc	tggcaccctc	ctccaagagc	420
acctctgggg	gcacagcggc	cctgggctgc	ctgggtcaagg	actacttccc	cgaaccgggtg	480
acgggtgtcgt	ggaactcagg	cgccctgacc	agcggcgtgc	acaccttccc	ggctgtccta	540
cagtcctcag	gactctactc	cctcagcagc	gtgggtgaccg	tgccctccag	cagcttgggc	600
acccagacct	acatctgcaa	cgtgaatcac	aagcccagca	acaccaaggt	ggacaagaaa	660
gttgagccca	aatcttgtga	caaaactcac	acatgcccac	cgtgcccagc	acctgaactc	720
ctggggggac	cgctcagtctt	cctcttcccc	ccaaaaccca	aggacaccct	catgatctcc	780
cggacccctg	aggtcacatg	cgtgggtggtg	gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtcaag	840
ttcaactggg	acgtggacgg	cgtggagggtg	cataatgcca	agacaaagcc	gcgggaggag	900
cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtggtcagc	gtcctcaccg	tcctgcacca	ggactggctg	960


```

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag 1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat aa 1362

```

<210> 8

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nặng của CHv62.21

<220>

<221> Biến thể

<222> 124

<223> Xaa = para-axetylphenylalanin (pAF)

<400> 8

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
          20          25          30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
          65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
          100          105          110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly
          115          120          125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
          130          135          140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
          145          150          155          160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
          165          170          175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
          180          185          190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
          195          200          205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
          210          215          220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
          225          230          235          240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
          245          250          255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
          260          265          270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
          275          280          285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
          290          295          300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
          305          310          315          320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
          325          330          335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
          340          345          350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

```

```

      355              360              365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
      370              375              380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
      385              390              395              400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
      405              410              415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
      420              425              430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
      435              440              445
Leu Ser Pro Gly Lys
      450
<210> 9
<211> 453
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Chuỗi nặng của CHv62.21
<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
      20              25              30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
      100              105              110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
      115              120              125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
      130              135              140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
      145              150              155              160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
      165              170              175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      180              185              190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
      195              200              205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
      210              215              220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
      225              230              235              240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
      245              250              255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
      260              265              270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
      275              280              285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
      290              295              300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
      305              310              315              320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
      325              330              335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

```

340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của CHv62.21

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 11

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nặng của CHv62.21

<220>

<221> Biến thể

<222> 124

<223> Xaa = para-axetylphenylalanin (pAF)

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
      20                      25                      30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
      100                     105                     110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly
      115                     120                     125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
      130                     135                     140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
      145                     150                     155                     160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
      165                     170                     175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      180                     185                     190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
      195                     200                     205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
      210                     215                     220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
      225                     230                     235                     240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
      245                     250                     255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
      260                     265                     270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
      275                     280                     285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
      290                     295                     300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
      305                     310                     315                     320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
      325                     330                     335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
      340                     345                     350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
      355                     360                     365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
      370                     375                     380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
      385                     390                     395                     400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
      405                     410                     415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
      420                     425                     430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
      435                     440                     445
Leu Ser Pro Gly Lys
      450

```

<210> 12

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nặng của v62-1b37.1

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Tyr Thr Tyr Gly Pro Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của v62-1b37.1

<400> 13

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
          20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
 1           5           10

```

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
 1           5           10

```

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

Arg Asn Asp Leu Gly Trp Tyr
 1           5

```

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1           5

```

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

```

```

1           5
<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19
Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
1           5           10
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr Thr
1           5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr Thr
1           5
<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22
Leu Gln His Asn Gly Phe Pro Tyr Thr
1           5
<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23
Gly Tyr Ser Ile Asn
1           5
<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
1           5
<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
Ser Gly Tyr Ser Ile Asn
1           5
<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26
Gly Tyr Ser Ile Asn
1           5
<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr

```

```

1           5
<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28
Ser Gly Tyr Ser Ile Asn
1           5
<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29
Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1           5           10           15
Gly
<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30
Ser Ser Ser Ser Asn
1           5
<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31
Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ile
1           5           10
<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32
Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1           5           10
<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33
Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1           5           10
<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34
Ala Arg Glu Gly Phe Ile Ala Gly Thr Thr Phe Asp Ala Phe Asp
1           5           10           15

```


1/27

Fig.1. Trình tự ADN hỗ trợ (SEQ ID NO:1) và trình tự axit amin (SEQ ID NO.2) của FLT3 của người. Methionin khởi đầu được gạch chân. Khung đọc mở kéo dài từ axit nucleic 67 đến 3048 bao gồm bộ ba mã hóa kết thúc

```

1  GTTTTACACGAGGCGGCATCGCAGGGCTGGGCGCGCGCGGCGCTGGGGACCCCGGGGCTCCG
    M P A L A R D G G Q L P L L V V F S
61  GAGGCCATGCGCGCGCTTGGCGCGCGACGGCGGCCAGCTGCGCGCTGCTCGTTGTTTTTTCT
    A M I F G T I T N Q D L P V I K C V L I
121 GCAATGATATTTGGGACTATTACAAATCAAGATCTGCCTGTGATCAAGTGTGTTTTAATC
    N H K N N D S S V G K S S S Y P M V S E
181 AATCATAAGAACAATGATTCATCAGTGGGGAAGTCATCATCATATCCCATGGTATCAGAA
    S P E D L G C A L R P Q S S G T V Y E A
241 TCCCCGGAAGACCTCGGGTGTGCGTTGAGACCCAGAGGTCAGGGACAGTGTACGAAGCT
    A A V E V D V S A S I T L Q V L V D A P
301 GCCGCTGTGGAAGTGGATGTATCTGCTTCCATCACACTGCAAGTGTGCTGGTTCGATGCCCCA
    G N I S C L W V F K H S S L N C Q P H F
361 GGGAACATTTCTGTCTCTGGGTCTTTAAGCACAGCTCCCTGAATTGCCAGCCACATTTT
    D L Q N R G V V S M V I L K M T E T Q A
421 GATTTACAAAACAGAGGAGTTGTTTCCATGGTCAATTTTGAAAATGACAGAAACCCCAAGCT
    G E Y L L F I Q S E A T N Y T I L F T V
481 GGAGAATACCTACTTTTTATTTCAGAGTGAAGCTACCAATTACACAATATTGTTTACAGTG
    S I R N T L L Y T L R R P Y F R K M E N
541 AGTATAAGAAATACCCTGCTTTACACATTAAGAAGACCTTACTTTAGAAAAATGGAAGAC
    Q D A L V C I S E S V P E P I V E W V L
601 CAGGACGCCCTGGTCTGCATATCTGAGAGCGTTCCAGAGCCGATCGTGGAAATGGGTGCTT
    C D S Q G E S C K E E S P A V V K K E E
661 TGCGATTACAGGGGGAAAGCTGTAAAGAAGAAAGTCCAGCTGTTGTTAAAAAGGAGGAA
    K V L H E L F G M D I R C C A R N E L G
721 AAAGTGCTTCATGAATTATTTGGGATGGACATAAGGTGCTGTGCCAGAAATGAACTGGGC
    R E C T R L F T I D L N Q T P Q T T L P
781 AGGGAATGCACCAGGCTGTTTACAAATAGATCTAAATCAAACCTCAGACCACATTGCCAA
    Q L F L K V G E P L W I R C K A V H V N
841 CAATTATTTCTTAAAGTAGGGGAACCCCTTATGGATAAGGTGCAAAGCTGTTTCATGTGAAC
    H G F G L T W E L E N K A L E E G N Y F
901 CATGGATTGCGGCTCACCTGGGAATTAGAAACAAAGCACTCGAGGAGGGCAAACCTACTTT
    E M S T Y S T N R T M I R I L F A F V S
961 GAGATGAGTACCTATTCAACAAACAGAACTATGATACGGATTCTGTTTGCTTTTGTATCA
    S V A R N D T G Y Y T C S S S K H P S Q
1021 TCAGTGGCAAGAAACGACACCGGATACTACACTTGTTCCTCTTCAAAGCATCCCAGTCAA
    S A L V T I V E K G F I N A T N S S E D
1081 TCAGCTTTGGTTACCATCGTAGAAAAGGGATTTATAAATGCTACCAATTCAAGTGAAGAT
    Y E I D Q Y E E F C F S V R F K A Y P Q
1141 TATGAAATTGACCAATATGAAGAGTTTTGTTTTCTGTCAGGTTTAAAGCCTACCCACAA
    I R C T W T F S R K S F P C E Q K G L D
1201 ATCAGATGTACGTGGACCTTCTCTCGAAAATCATTTCCTTGTGAGCAAAAGGGTCTTGAT
    N G Y S I S K F C N H K H Q P G E Y I F
1261 AACGGATACAGCATATCCAAGTTTTTGCAATCATAAGCACCAGCCAGGAGAATATATATTC

```