



(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)



1-0038108

(51)<sup>2006.01</sup> C07K 16/30; C12N 5/10; C12N 1/21; (13) B  
C12N 1/15; C12N 1/19

- 
- (21) 1-2019-02971 (22) 17/11/2017  
(86) PCT/JP2017/041486 17/11/2017 (87) WO2018/092885 24/05/2018  
(30) 2016-224811 18/11/2016 JP  
(45) 25/01/2024 430 (43) 25/09/2019 378A  
(73) Astellas Pharma Inc. (JP)  
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038411, Japan  
(72) MORINAKA, Akifumi (JP); SHIRAI, Hiroki (JP); HIRAYAMA, Kazunori (JP);  
HOSOGAI, Naomi (JP); DOIHARA, Hitoshi (JP).  
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
- 

(54) MẢNH FAB CỦA KHÁNG THỂ KHÁNG MUCIN 1 (MUC1) NGƯỜI, THỂ LIÊN HỢP CHỨA MẢNH FAB NÀY, DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA MẢNH FAB CỦA KHÁNG THỂ KHÁNG MUC1 NGƯỜI NÀY HOẶC THỂ LIÊN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến mảnh Fab của kháng thể kháng Mucin 1 (MUC1) người. Mảnh Fab này được kỳ vọng là có thể sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư, cụ thể là, chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư bàng quang. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc 10, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12, và thể liên hợp chứa mảnh Fab. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người hoặc thể liên hợp. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit này, tế bào chủ được biến nạp với vectơ biểu hiện này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến mảnh Fab mới của kháng thể kháng MUC1 của người. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chẩn đoán và/hoặc điều trị chứa mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng mảnh Fab này.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Mucin 1 (MUC1) là glycoprotein liên kết màng mà được biểu hiện ở phía lòng trong của tế bào biểu mô cấu thành nên biểu mô của tuyến vú, khí quản và ống dạ dày ruột, v.v (Nat. Rev. Cancer, 2004 Jan; 4 (1): 45-60). MUC1 được biểu hiện quá mức trong các tế bào ung thư của bệnh ung thư vú (Mod. Pathol., 2005 Oct; 18 (10): 1295-304), ung thư phổi (Hum. Pathol., 2008 Jan; 39 (1): 126-36), ung thư đại trực tràng (Int. J. Oncol., 2000 Jan; 16 (1): 55-64), ung thư bàng quang (PLoS One, 2014 Mar; 9 (3): e92742), ung thư da (Histopathology, 2000 Sep; 37 (3): 218-23), ung thư tuyến giáp (J. Pathol., 2003 Jul; 200 (3): 357-69), ung thư dạ dày (J. Pathol., 2000 Mar; 190 (4): 437-43), ung thư tuyến tụy (Int. J. Oncol., 2004 Jan; 24 (1): 107-13), ung thư thận (Mod. Pathol., 2004 Feb; 17 (2): 180-8), ung thư buồng trứng (Gynecol. Oncol., 2007 Jun; 105 (3): 695-702) và ung thư cổ tử cung (Am. J. Clin. Pathol., 2004 Jul; 122 (1): 61-9), v.v. MUC1 có thể được dùng làm phân tử đích để phát hiện ổ bệnh ung thư (Nat. Rev. Cancer, 2004 Jan; 4 (1): 45-60; and Pathol. Res. Pract., 2010 Aug 15; 206 (8): 585-9).

MUC1 trải quá trình O-glycosyl hóa threonin ở vị trí số 9 của trình tự lặp nối tiếp gồm 20 axit amin HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA (SEQ ID NO: 15) có mặt trong miền ngoại bào. Trong các tế bào ung thư, quá trình O-glycosyl hóa này không hoàn toàn, và quá trình O-glycosyl hóa như T(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr), Tn(GalNAc $\alpha$ 1-O-

Ser/Thr) và 2,3ST(Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr) được biết là diễn ra theo cách đặc hiệu ung thư (PTL 1 và NPL 1). Do MUC1 là mô bình thường không trải qua quá trình O-glycosyl hóa đặc hiệu ung thư, nên MUC1 đặc hiệu ung thư ở người đặc biệt hữu dụng làm phân tử đích để điều trị các bệnh ung thư khác nhau ở người.

Ví dụ, kháng thể 1B2 (PTL 1), kháng thể PankoMab (NPL 2), và kháng thể 5E5 (PTL 2) được biết là các kháng thể kháng MUC1 đặc hiệu ung thư ở người. Trong số các kháng thể, kháng thể 1B2 được thông báo là có tính đặc hiệu cao với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người so với kháng thể PankoMab (PTL 1). Cũng đã có thông báo rằng hằng số phân ly của kháng thể 1B2 là  $3,7 \times 10^{-10}$  M (PTL 1), và hằng số phân ly của kháng thể 5E5 là  $1,7 \times 10^{-9}$  M (NPL 1).

Trong khi đó, cũng có những nhu cầu lớn đối với việc hiển thị tổn thương do ung thư. Thứ nhất, vẫn có nhu cầu phát hiện sớm thương tổn do ung thư. Các phương thức chẩn đoán hiện nay như chụp ảnh tia X (X-ray photography), siêu âm, chụp cắt lớp vi tính (computed tomography-CT), chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging-MRI), chụp cắt lớp bằng đồng vị phát positron (positron emission tomography - PET), và chụp cắt lớp vi tính bằng đồng vị phát đơn photon (single photon emission computed tomography - SPECT) không thể phát hiện nhạy các ung thư có kích thước nhỏ. Nếu các ung thư có kích thước nhỏ có thể được phát hiện, thì ung thư nguyên phát có thể được chữa trị bằng cách phẫu thuật hoặc xạ trị hoặc thậm chí ung thư di căn có thể chữa trị theo cách duy trì sự sống bằng cách can thiệp sớm bằng dược phẩm. Tiếp theo, vẫn có nhu cầu phân biệt tổn thương do ung thư và tổn thương lành tính. Các phương pháp chẩn đoán hiện nay thường chẩn đoán nhằm tổn thương lành tính là thương tổn do ung thư. Nếu sự phân biệt có thể được thực hiện giữa tổn thương do ung thư và tổn thương lành tính, thì việc sinh thiết không cần thiết có thể được giảm. Ngoài ra, vẫn có nhu cầu hiển thị trong khi phẫu thuật tổn thương do ung thư. Hiện nay, vị trí hoặc mức độ tổn thương do ung thư không thể được xác định chính xác trong khi phẫu thuật ung thư bao gồm ung thư vú, ung thư bàng quang, và ung thư da. Vì thế, tổn thương do ung thư không thể được phục hồi hoàn toàn, và có nguy cơ kết thúc phẫu thuật trong khi vẫn còn các tế bào ung thư. Hơn nữa, vẫn có nhu cầu xác định chính xác các vị trí thương tổn do ung thư. Ngay cả khi nghi ngờ tái phát và di căn sau phẫu thuật do việc gia tăng dấu chuẩn khối u trong máu, thì các phương

pháp chẩn đoán hiện nay không thể hiển thị ung thư kích thước nhỏ di căn. Vì thế, việc điều trị tối ưu không thể chọn lựa được do không thể xác định được ung thư có thực sự di căn hay không hoặc ung thư đã di căn đến cơ quan nào. Vì thế, cũng hữu ích khi hiển thị tổn thương do ung thư bằng các kỹ thuật tạo hình ảnh phân tử như tạo hình ảnh huỳnh quang và tạo hình ảnh tia  $\gamma$  (PET và SPECT) bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết đặc hiệu với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người làm được chất chẩn đoán *in vivo*. Tuy nhiên, trường hợp bất kỳ trước đây sử dụng kháng thể kháng MUC1 đặc hiệu ung thư ở người làm được chất chẩn đoán *in vivo* chưa được biết đến.

Vì thế vẫn có nhu cầu về được chất điều trị bệnh ung thư như được chất được liên hợp với kháng thể. Kháng thể được chất được mong đợi là phương pháp điều trị bệnh ung thư với phản ứng bất lợi ít hơn do sự phân phối đặc hiệu đến tổn thương ung thư. Xạ trị miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể được gắn kết với đồng vị phóng xạ (Takashi Tsuruo, "Molecular Target Therapy of Cancer", NANZANDO Co., Ltd., published on Sep. 15, 2008, p. 332-336; J. Nucl. Med., 2016 Jul; 57 (7): 1105-1111; and Nucl. Med. Biol., 2010 Nov; 37 (8): 949-955), photoimmunotherapy using an antibody bound to IREDye700DX (Nat. Med., 2011 Dec; 17 (12): 1685-91), và phương pháp tương tự đã được thông báo. IREDye700DX là thuốc nhuộm huỳnh quang cận hồng ngoại có thể cũng được sử dụng trong chẩn đoán. Đã được thông báo rằng việc chết tế bào có thể được cảm ứng theo cách đặc hiệu ung thư thông qua tác dụng gây độc do ánh sáng của IREDye700DX bằng cách gắn kết thuốc nhuộm này với kháng thể kháng kháng nguyên được biểu hiện trên màng tế bào ung thư, và cho phép phức hợp tạo thành tích tụ đặc hiệu trong mô ung thư, sau đó chiếu xạ bằng ánh sáng cận hồng ngoại (Nat. Med., 2011 Dec; 17 (12): 1685-91). Tuy nhiên, trường hợp bất kỳ trước đây về việc sử dụng lâm sàng kháng thể được chất là kháng thể kháng MUC1 người đặc hiệu ung thư được gắn kết với được chất điều trị bệnh ung thư vẫn chưa được biết đến.

Thông thường, các kháng thể có thời gian bán hủy trong máu dài và cần khoảng thời gian dài khoảng 4 ngày đến 5 ngày để đạt được tỷ lệ khối u/máu mà tạo ra tỷ lệ tín hiệu trên nền đủ để hiển thị bệnh ung thư, sau khi dùng trong cơ thể (Clin. Pharmacol. Ther., 2010 May; 87 (5): 586-92). Ngoài ra, các mảnh Fc của các kháng thể gây ra tác dụng được lý như hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular

cytotoxicity ADCC) hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC) (NPL 1; and Curr. Opin. Biotechnol., 2002 Dec; 13 (6): 609-14). Hơn nữa, các kháng thể tích tụ nhiều trong gan không phụ thuộc vào đích, và các tế bào ung thư như ung thư vú di căn mạnh đến gan. Việc tích tụ trong gan can thiệp vào việc phát hiện di căn gan tại thời điểm chẩn đoán tổn thương toàn thân do ung thư (Clin. Pharmacol. Ther., 2010 May; 87 (5): 586-92).

Ví dụ, mảnh kháng thể tái tổ hợp phân tử nhỏ như Fab, scFv, diabody, và minibody được kỳ vọng là được sử dụng làm các kháng thể trị liệu do việc dễ tiếp cận đến ổ bệnh với khả năng thâm nhập mô cao của chúng và chi phí sản xuất thấp bằng cách sử dụng hệ biểu hiện ở *E. coli* hoặc nấm men. Và ngoài ra, chúng được thông báo là được sử dụng làm được chất chẩn đoán do thời gian bán thải trong máu ngắn và đặc điểm bài tiết qua thận của nó (Nat. Biotechnol., 2005 Sep; 23 (9): 1126-36).

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

PTL 1: WO2010/050528

PTL 2: WO2008/040362

Tài liệu phi sáng chế

NPL 1: Glycoconj. J., 2013 Apr; 30 (3): 227-36

NPL 2: Cancer Immunol Immunother, 2006 Nov; 55 (11): 1337-47

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

Vấn đề kỹ thuật

Mảnh Fab hóa trị một có khối lượng phân tử bằng khoảng 50 kDa, nhỏ hơn các kháng thể có khối lượng phân tử bằng khoảng 150 kDa, được loại bỏ bằng cách bài tiết qua thận, và cũng có thời gian bán thải trong máu ngắn. Vì thế, chúng đạt đến tỷ lệ khối u/máu mà tạo ra tỷ lệ tín hiệu/nền đủ để hiển thị bệnh ung thư, trong vòng 2 đến 32 giờ sau khi sử dụng. Chúng thiếu vùng Fc và vì thế không gây ra hiện tượng ADCC lẫn CDC. Mảnh Fab thường được loại bỏ bằng cách bài tiết qua thận và vì thế, không can thiệp vào việc phát

hiện di căn gan. Từ các đặc điểm này, mảnh Fab có thể được kỳ vọng là có hiệu quả hơn với vai trò là dược chất chẩn đoán *in vivo* so với kháng thể.

Tuy nhiên, hoạt tính gắn kết của mảnh Fab thường bị yếu đi do chúng có hóa trị một, mà không phải hóa trị hai. Kháng thể phải được đánh dấu bằng chất có thể phát hiện được như thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc chất cảm quang để sử dụng làm dược chất chẩn đoán *in vivo* hoặc dược chất để sử dụng trong phương pháp trị liệu quang miễn dịch. Một vấn đề nữa là việc giảm hoạt tính gắn kết của chúng là do việc đánh dấu bằng chất như vậy.

Mục đích của sáng chế là đề xuất mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có hoạt tính gắn kết tuyệt vời và được kỳ vọng là tích lũy trong ổ ung thư trong thời gian cho trước (ví dụ 24 giờ) sau khi dùng. Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm chẩn đoán chứa mảnh Fab và phương pháp chẩn đoán bằng cách sử dụng chế phẩm này, và chế phẩm điều trị chứa mảnh Fab và phương pháp điều trị bằng cách sử dụng chế phẩm này.

#### Vấn đề cần giải quyết

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu kỹ lưỡng về việc tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có hoạt tính gắn kết tuyệt vời kháng MUC1 đặc hiệu ung thư ở người, và sau đó là tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12 (Ví dụ 1) và phát hiện ra rằng: mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có hoạt tính gắn kết tuyệt vời đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người (Ví dụ 3) và không làm giảm hoạt tính gắn kết đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người bằng cách đánh dấu huỳnh quang và đánh dấu bằng chất tạo chelat (Ví dụ 5 và Ví dụ 7); và thể liên hợp chứa mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có thể dùng trong chẩn đoán ung thư (Ví dụ 8, Ví dụ 12 và Ví dụ 13) và thể hiện tác dụng kháng u trong mô hình mang ung thư dưới da (Ví dụ 15).

Kết quả là phương pháp chẩn đoán và phương pháp điều trị bằng cách sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người và thể liên hợp chứa mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được đề xuất.

Sáng chế bao gồm các khía cạnh được nêu dưới đây là các chất và phương pháp hữu ích về mặt y tế hoặc công nghiệp.

Cụ thể là, theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm các phương án như sau:

[1] Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

[2] Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1] được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

[3] Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1] được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng

biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

[4] Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [3] được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

[5] Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [4] mà là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

[6] Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [4] mà là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

[7] Thể liên hợp chứa một hoặc nhiều gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo bất kỳ trong số [1] đến [6].

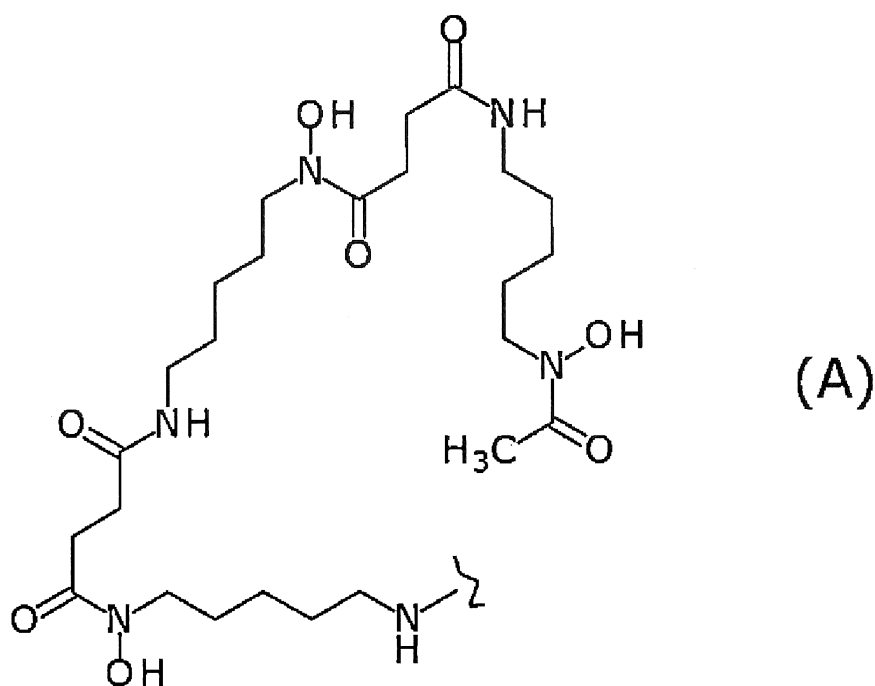
[8] Thể liên hợp theo [7], trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, (ii)

phối tử, (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phần tử liên kết, hoặc (iv) thuốc nhuộm huỳnh quang.

[9] Thể liên hợp theo [8], trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phần tử liên kết hoặc (ii) phối tử.

[10] Thể liên hợp theo [9], trong đó phối tử là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:

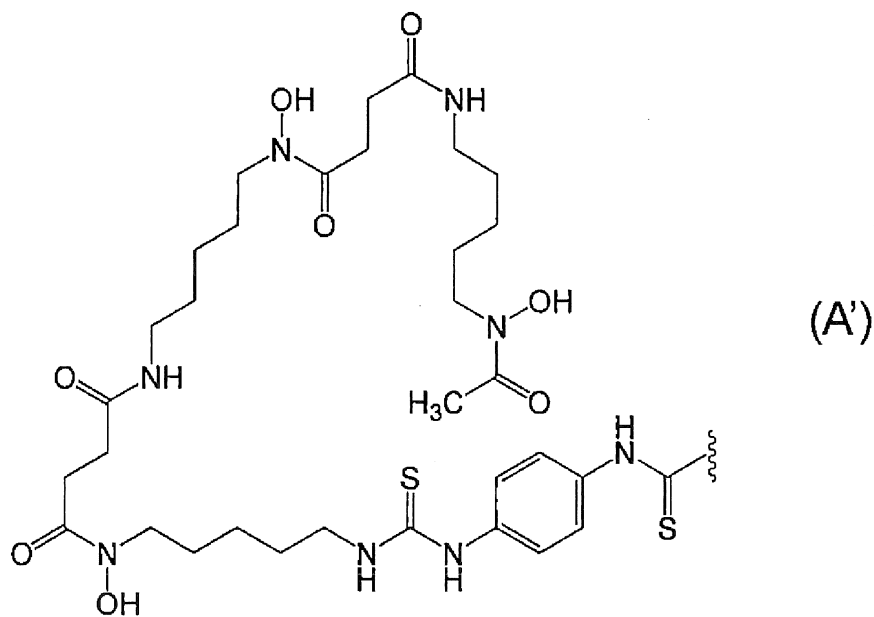
[Công thức hóa học 1]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người hoặc phần tử liên kết.

[11] Thể liên hợp theo [10], trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phần tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A') dưới đây:

[Công thức hóa học 2]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người.

[12] Thể liên hợp theo [11], trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=S) đầu tận gốc đánh dấu.

[13] Thể liên hợp được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây:

(a) thể liên hợp theo [12] trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5];

(b) thể liên hợp theo [12] trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [6]; và

(c) thể liên hợp mà là hỗn hợp của (a) và (b).

[14] Thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số [9] đến [13], còn chứa kim loại.

[15] Thể liên hợp theo [14], trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

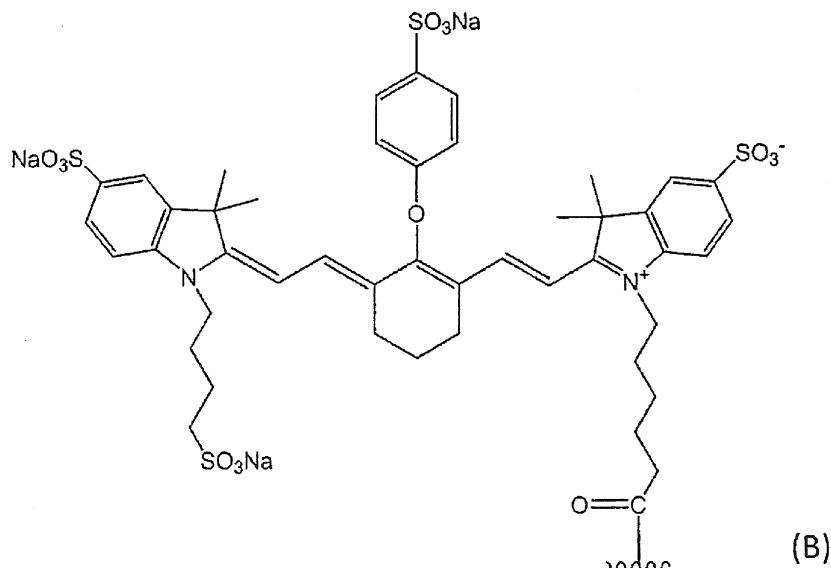
[16] Thể liên hợp theo [15], trong đó kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ .

[17] Thể liên hợp theo [13], còn chứa  $^{89}\text{Zr}$ .

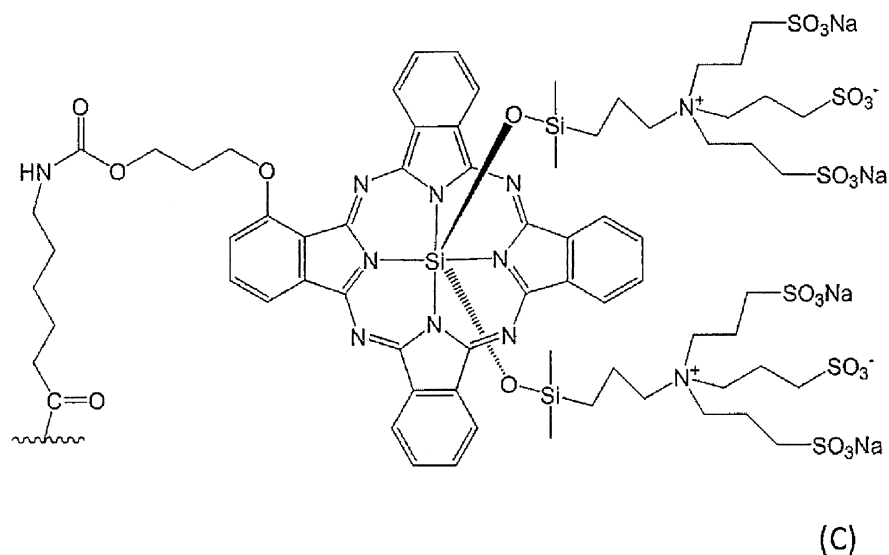
[18] Thể liên hợp theo [8], trong đó gốc đánh dấu là (i) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết hoặc (ii) thuốc nhuộm huỳnh quang.

[19] Thể liên hợp theo [18], trong đó thuốc nhuộm huỳnh quang là thuốc nhuộm huỳnh quang được chọn từ nhóm bao gồm công thức (B) dưới đây và công thức (C) dưới đây:

[Công thức hóa học 3]



[Công thức hóa học 4]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người hoặc phân tử liên kết.

[20] Thể liên hợp theo [19], trong đó đường lượn sóng thể hiện gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=O) đầu tận gốc đánh

dấu.

[21] Thể liên hợp theo [20], trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B).

[22] Thể liên hợp được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) dưới đây:

(a) thể liên hợp theo [21] trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5];

(b) thể liên hợp theo [21] trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [6]; và

(c) thể liên hợp mà là hỗn hợp của (a) và (b).

[23] Thể liên hợp theo [20], trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C).

[24] Thể liên hợp được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây:

(a) thể liên hợp theo [23] trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5];

(b) thể liên hợp theo [23] trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [6]; và

(c) thể liên hợp mà là hỗn hợp của (a) và (b).

[25] Polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1].

[26] Polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể

kháng MUC1 người theo [5].

[27] Vector biểu hiện bao gồm (a) và/hoặc (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1].

[28] Vector biểu hiện bao gồm (a) và/hoặc (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5]; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5].

[29] Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1];

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1];

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1]; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1].

[30] Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự

nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5];

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5];

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5]; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5].

[31] Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1];

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1]; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1], và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [1].

[32] Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm bước

nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5] và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5];

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5] và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5]; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5], và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo [5].

[33] Phương pháp tạo ra thể liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, bao gồm bước: tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bằng phương pháp bằng phương pháp theo [31] hoặc [32]; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu.

[34] Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo [33], trong đó bước liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu là bước i) liên kết mảnh Fab qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử.

[35] Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo [34], còn chứa bước đánh dấu phối tử của thể liên hợp bằng đồng vị phóng xạ kim loại.

[36] Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo [33], trong đó bước liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu là bước i) liên kết mảnh Fab qua phần tử liên kết với thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với thuốc nhuộm huỳnh quang.

[37] Chế phẩm chẩn đoán chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ [7]

đến [24], và chất mang được dụng.

[38] Chế phẩm chẩn đoán theo [37], trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo bất kỳ trong số [17], [22] và [24].

[39] Chế phẩm chẩn đoán theo [38], trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo [17].

[40] Chế phẩm chẩn đoán theo [38], trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo [22].

[41] Chế phẩm chẩn đoán theo [38], trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo [24].

[42] Chế phẩm chẩn đoán theo bất kỳ trong số từ [37] đến [41] được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện MUC1 người.

[43] Chế phẩm chẩn đoán theo [42], trong đó bệnh ung thư là ung thư vú hoặc ung thư bàng quang.

[44] Dược phẩm chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ [7] đến [24], và chất mang được dụng.

[45] Dược phẩm theo [44], trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo bất kỳ trong số [17], [22] và [24].

[46] Dược phẩm theo [45], trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo [24].

[47] Dược phẩm theo bất kỳ trong số [44] đến [46] là dược phẩm để điều trị bệnh ung thư biểu hiện MUC1 người.

[48] Dược phẩm theo [47], trong đó bệnh ung thư là ung thư vú hoặc ung thư bàng quang.

[49] Sử dụng thể liên hợp theo bất kỳ trong số [7] đến [24] để sản xuất chế phẩm chẩn đoán ung thư vú hoặc ung thư bàng quang và/hoặc dược phẩm để điều trị ung thư vú hoặc ung thư bàng quang.

[50] Thể liên hợp theo bất kỳ trong số [7] đến [24] để sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc điều trị ung thư vú hoặc ung thư bàng quang.

[51] Phương pháp chẩn đoán ung thư vú hoặc ung thư bàng quang, bao gồm dùng trước phẫu thuật hoặc trong khi phẫu thuật thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ [7] đến [24] cho đối tượng.

[52] Phương pháp điều trị ung thư vú hoặc ung thư bàng quang, bao gồm bước dùng lượng có tác dụng điều trị bệnh của thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ [7] đến [24].

Hiệu quả của sáng chế

Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế có hoạt tính gắn kết tuyệt vời đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người và được kỳ vọng là có thể sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc điều trị các bệnh ung thư như ung thư vú.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig. 1 là đồ thị và bảng thể hiện hoạt tính gắn kết của P10-1 Fab, P10-2 Fab và 1B2 Fab của Ví dụ so sánh đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người.

Fig. 2 là đồ thị và bảng thể hiện hoạt tính gắn kết của thuốc nhuộm P10-1 Fab, thuốc nhuộm P10-2 Fab và thuốc nhuộm 1B2 Fab của Ví dụ so sánh đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người.

Fig. 3 là đồ thị và bảng thể hiện hoạt tính gắn kết của P10-2 Fab DFO và P10-2 Fab đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người.

Fig. 4 là đồ thị thể hiện hoạt tính gắn kết của P10-2 Fab đối với dòng tế bào ung thư vú tế bào MDA-MB-468 (còn được gọi là tế bào MM-468) và dòng tế bào ung thư bàng quang tế bào 647-V biểu hiện MUC1 đặc hiệu ung thư ở người. Trục hoành thể hiện nồng độ ( $\text{Log}(\text{mg/mL})$ ) của P10-2 Fab, và trục tung thể hiện mức phát quang.

Fig. 5A là ảnh đại diện được chụp bằng máy ảnh thông thường (bên trái) và máy ảnh huỳnh quang cận hồng ngoại (ở giữa và bên phải) 6 giờ sau khi dùng thuốc nhuộm P10-2 Fab được dùng trong tĩnh mạch ở lượng 3 mg/kg cho mô hình mang ung thư dưới da.

Fig. 5B là đồ thị định lượng tỷ lệ khối u/nền của vị trí khối u và vị trí nền xung quang khối u và chỉ ra giá trị trung bình + sai số chuẩn. Trục hoành mô tả liều lượng và thời gian sau khi dùng P10-2 Fab thuốc nhuộm.

Fig. 6 là đồ thị định lượng mức phát quang của các vị trí khối u dùng P10-2 Fab IR700 cho chuột được cấy ghép tế bào MM-468, giết chuột 2 giờ sau khi dùng, cắt một mô khối u, chụp ảnh bằng IVIS SPECTRUM. Trục tung là mức phát quang.

Fig. 7 là đồ thị thể hiện kết quả đo hoạt tính gây độc tế bào khi cho P10-2 Fab IR700 phản ứng với các tế bào MM-468, tế bào 647-V hoặc tế bào CHO-K1 bằng cách chiếu ánh sáng trong ví dụ so sánh. Cột bên trên của trục hoành của mỗi đồ thị thể hiện nồng độ của P10-2 Fab IR700, và cột bên dưới thể hiện việc tiếp xúc với ánh sáng. Trục tung thể hiện mức phát quang và cho biết giá trị trung bình + sai số chuẩn.

Fig. 8 là đồ thị thể hiện kết quả đo tác dụng kháng u phụ thuộc vào việc có hoặc không chiếu ánh sáng (0 J hoặc 200 J) tại thời điểm dùng P10-2 Fab IR700 bằng cách sử dụng chuột trụi lông được cấy ghép tế bào MM-468. Trục hoành thể hiện số ngày khi ngày mà thể tích khối u đạt được 300 mm<sup>3</sup> được xác định là ngày 1. Trục tung thể hiện thể tích khối u (mm<sup>3</sup>) và cho biết giá trị trung bình + sai số chuẩn.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở đó. Các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong sáng chế thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trừ khi có quy định khác.

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu kỹ lưỡng về việc tạo ra kháng thể kháng MUC1 đặc hiệu ung thư ở người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và sau đó đã thành công tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có khả năng gắn kết chặt với MUC1 đặc hiệu ung thư.

Cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể là phổ biến giữa các lớp kháng thể và được cấu thành bằng các chuỗi nặng có phân tử lượng từ 50000 đến 70000 và các chuỗi nhẹ có phân tử lượng từ 20000 đến 30000. Chuỗi nặng thường bao gồm chuỗi polypeptit chứa khoảng 440 axit amin, có đặc điểm cấu trúc của mỗi lớp, và được gọi là các chuỗi  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ , và  $\epsilon$  tương ứng với IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE. IgG còn có IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 mà tương ứng được gọi là  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3, và  $\gamma$ 4. Chuỗi nhẹ thường chứa chuỗi polypeptit bao gồm khoảng 220 axit amin và đã biết là có hai loại, loại L và K, mà tương ứng được gọi là chuỗi  $\lambda$  và  $\kappa$ . Do cấu hình peptit của cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể, hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau được liên kết qua liên kết disulfua (liên kết S-S) và liên kết phi cộng hóa trị để tạo ra khối lượng phân tử từ 150000 đến 190000. Hai chuỗi nhẹ này có thể bắt cặp với bất kỳ trong số các chuỗi nặng. Một phân tử kháng thể cụ thể

chắc chắn được cấu thành từ hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau.

Bốn (hoặc năm đối với các chuỗi  $\mu$  và  $\epsilon$ ) và hai liên kết S-S trong chuỗi tương ứng có mặt trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và mỗi chuỗi tạo thành một vòng từ mỗi 100 đến 110 gốc axit amin. Cấu hình này là tương tự giữa các vòng và được gọi là miền hoặc đơn vị cấu trúc. Đối với cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, miền được nằm ở đầu tận N không có trình tự axit amin không đổi thậm chí trong số các dạng bào chế từ cùng một lớp (phân lớp) của các động vật cùng loài, và vì thế được gọi là vùng biến đổi. Các miền tương ứng được gọi là vùng biến đổi của chuỗi nặng (miền VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (miền VL). Trình tự axit amin của phía đầu tận C từ đó hầu như không đổi trên cơ sở lớp hoặc phân lớp và được gọi là vùng hằng định. Các miền tương ứng được biểu diễn bởi CH1, CH2, CH3 và CL.

Tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể đối với kháng nguyên phụ thuộc vào trình tự axit amin của gốc được cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Mặt khác, hoạt tính sinh học như sự gắn kết với bề mặt hoặc các tế bào khác nhau phản ánh sự khác biệt trong cấu trúc giữa các vùng hằng định của các Ig của các lớp tương ứng. Đã biết rằng tính biến đổi của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và của chuỗi nhẹ bị giới hạn đáng kể bằng ba vùng siêu biến nhỏ có mặt trong cả các chuỗi. Các vùng này được gọi là vùng quyết định tính hỗ trợ (CDRs; CDR1, CDR2, và CDR3 theo thứ tự từ phía đầu tận N). Các gốc còn lại của vùng biến đổi được gọi là vùng khung (framework regions - Frs) và tương đối ổn định.

Vùng giữa miền CH1 và miền CH2 của vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể được gọi là vùng bản lề. Vùng này giàu gốc prolin và chứa nhiều liên kết S-S trong chuỗi kết nối hai chuỗi nặng. Ví dụ, vùng bản lề của IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 người chứa 2, 4, 11, và 2 gốc xystein, tương ứng, mà tạo thành liên kết S-S giữa các chuỗi nặng. Vùng bản lề là vùng nhạy cảm cao với enzym phân giải protein như papain hoặc pepsin. Trong trường hợp phân giải kháng thể bằng papain, chuỗi nặng được phân cắt ở vị trí phía đầu tận N từ liên kết S-S giữa chuỗi nặng của vùng bản lề và vì thế bị phân giải thành hai mảnh Fab và một mảnh Fc. Mảnh Fab được cấu thành bởi chuỗi nhẹ và mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH), miền CH1 và một phần của vùng bản lề. Mảnh Fab bao gồm vùng biến đổi và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên.

Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế

Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là mảnh Fab có đặc điểm sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

Vùng hằng định bất kỳ của Igy1, Igy2, Igy3 hoặc Igy4, v.v có thể được chọn làm vùng hằng định của chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế. Theo một phương án, vùng hằng định của chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là vùng hằng định của Igy1 người.

Vùng hằng định bất kỳ của Igl hoặc Igg có thể được chọn làm vùng hằng định của chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế. Theo một phương án, vùng hằng định của chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là vùng hằng định của Igg người.

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là mảnh Fab như sau:

mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu

diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Trong trường hợp biểu hiện kháng thể bao gồm mảnh Fab trong tế bào, kháng thể được biết là trải qua quá trình biến đổi sau dịch mã. Các ví dụ về biến đổi sau dịch mã bao gồm phân cắt lysin đầu tận C của chuỗi nặng bằng carboxypeptidaza, biến đổi glutamin hoặc axit glutamic đầu tận N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng quá trình pyroglutamyl hóa, glycosyl hóa, oxy hóa, khử amit và đường hóa. Biến đổi sau dịch mã được biết là diễn ra ở các kháng thể khác nhau (J. Pharm. Sci., 2008; 97: 2426-2447).

Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế cũng có thể bao gồm mảnh Fab thu được từ quá trình biến đổi sau dịch mã. Các ví dụ về mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế thu được từ quá trình biến đổi sau dịch mã bao gồm mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có chuỗi nặng được pyroglutamyl hóa đầu tận N. Đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật rằng việc biến đổi sau dịch mã bằng cách pyroglutamyl hóa đầu tận N như vậy không ảnh hưởng đến hoạt tính của kháng thể (Anal. Biochem., 2006; 348: 24-39).

Theo một phương án, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có đặc điểm sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

Theo một phương án nhất định, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có đặc điểm sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi

nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

Theo một phương án khác, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có đặc điểm sau đây:

mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Theo một phương án nhất định, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người có đặc điểm như sau:

mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế gắn kết với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người. MUC1 đặc hiệu ung thư được biểu hiện ở các bệnh ung thư như ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tụy, ung thư thận, ung thư buồng trứng hoặc ung thư cổ tử cung. Phương pháp xác định hoạt tính gắn kết của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người thu được đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người bao gồm các phương pháp như ELISA và FACS. Trong trường hợp sử dụng, ví dụ, ELISA, tế bào dương tính với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người (ví dụ, tế bào T-47D) được cố định trên đĩa ELISA, nơi mà sau đó mảnh Fab được bổ sung và phản ứng, và sau đó, kháng thể kháng IgG hoặc kháng thể tương tự được đánh dấu bằng peroxidaza cây cải ngựa hoặc tương tự được phản ứng. Sau đó, việc gắn kết của kháng thể thứ cấp được nhận biết bằng cách xác định hoạt tính bằng cách sử dụng thuốc thử để phát hiện hoạt tính của nó (ví dụ cơ chất peroxidaza cây cải ngựa phát quang hóa học đối với chất đánh dấu peroxidaza cây cải ngựa) hoặc dạng tương tự.

Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế có thể dễ dàng được

tạo ra bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này trên cơ sở thông tin trình tự trên mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được bộc lộ ở đây. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế có thể được tạo ra theo, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, phương pháp được mô tả trong, ví dụ, <Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế> được đề cập dưới đây.

Thể liên hợp theo sáng chế

Thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế.

"Gốc đánh dấu" là (i) phối tử và phần tử liên kết, (ii) phối tử, (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phần tử liên kết, hoặc (iv) thuốc nhuộm huỳnh quang. Một phương án nhất định là (i) phối tử và phần tử liên kết, hoặc (ii) phối tử. Một phương án nhất định là (i) thuốc nhuộm huỳnh quang và phần tử liên kết, hoặc (ii) thuốc nhuộm huỳnh quang. Phối tử của "gốc đánh dấu" có thể còn chứa kim loại. Một phương án nhất định là (i) phối tử và phần tử liên kết hoặc (ii) phối tử chứa kim loại, và nói cách khác, là (i) phối tử được tạo phức hợp chelat với kim loại, và phần tử liên kết, hoặc (ii) phối tử được tạo phức hợp chelat với kim loại.

Thể liên hợp theo sáng chế chứa kim loại hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được sử dụng trong các chất cản quang và/hoặc chất điều trị bệnh ung thư khác nhau và được sử dụng trong, ví dụ, chất cản quang MRI, chất đánh dấu PET, chất tạo ảnh phân tử được đánh dấu huỳnh quang, và được chất để sử dụng trong phương pháp trị liệu quang miễn dịch.

Trong sáng chế, "kim loại" có nghĩa là ion kim loại thuận từ hoặc đồng vị phóng xạ kim loại.

Ion kim loại thuận từ thích hợp được sử dụng trong chất cản quang MRI. Các ví dụ về các phương án của ion kim loại thuận từ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Rh}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Pm}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ , và  $\text{Mn}^{2+}$ . Một phương án nhất định là  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , hoặc  $\text{Fe}^{3+}$ . Một phương án nhất định là  $\text{Mn}^{3+}$  hoặc  $\text{Mn}^{2+}$ . Trong trường hợp này, halogen hoặc

chất tương tự có thể được sử dụng làm anion trái dấu trong thể liên hợp. Theo cách khác, anion trái dấu có thể là  $C(=O)O^-$  của phối tử. Thể liên hợp còn có thể có cation trái dấu như  $Na^+$ .

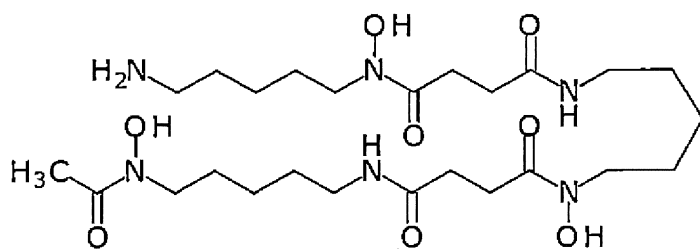
Đồng vị phóng xạ kim loại được sử dụng trong, ví dụ, chất đánh dấu PET. Các ví dụ của phương án nhất định bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở,  $^{89}Zr$ ,  $^{51}Mn$ ,  $^{52}Fe$ ,  $^{60}Cu$ ,  $^{67}Ga$ ,  $^{68}Ga$ ,  $^{72}As$ ,  $^{99m}Tc$ , và  $^{111}In$ . Một phương án nhất định là  $^{89}Zr$ ,  $^{60}Cu$ ,  $^{67}Ga$ ,  $^{68}Ga$ ,  $^{99m}Tc$ , hoặc  $^{111}In$ . Một phương án nhất định là chất đồng vị phóng xạ của zirconium. Một phương án nhất định là  $^{89}Zr$ .

"Phối tử" là gốc có thể tạo ra phức hợp chelat với kim loại trong thể liên hợp và có nghĩa là nhóm được cấu thành bằng chất tạo chelat. Nhóm cấu thành là nhóm có liên kết bằng cách loại bỏ proton từ chất tạo chelat.

"Chất tạo chelat" là hợp chất tạo thành liên kết phối trí với kim loại.

Các ví dụ về "chất tạo chelat" bao gồm thể mang sắt và thể không mang sắt. Các ví dụ về thể mang sắt bao gồm loại axit hydroxamic, loại catechol, và loại phối tử hỗn hợp. Các ví dụ về thể mang sắt loại axit hydroxamic bao gồm sắc tố chứa sắt, deferoxamin (DFO) được biểu diễn bởi công thức dưới đây:

[Công thức hóa học 5]



fusarinin C, ornibactin, và axit rhodotorulic. Các ví dụ về thể mang sắt loại catechol bao gồm enterobactin, bacillibactin, và vibriobactin. Các ví dụ về thể mang sắt loại phối tử hỗn hợp bao gồm azotobactin, pyoverdine, và yersiniabactin. Trong trường hợp thể mang sắt, DFO có thể được phản ứng thông qua nhóm chức phản ứng của nó  $-NH_2$  với phần tử liên kết hoặc mảnh Fab, và thể mang sắt khác ngoài DFO cũng có thể được phản ứng qua nhóm chức phản ứng của nó như nhóm carboxy, nhóm hydroxy, hoặc nhóm amino với phần tử liên kết hoặc mảnh Fab bằng phương pháp thường được người có kỹ năng trung bình trong

lĩnh vực này sử dụng.

Các ví dụ về thể không mang sắt bao gồm DTPA (axit diethylentriaminpentaaxetic, CAS số: 67-43-6), DTPA-BMA (axit 1,7-bis(metylcarbamoymetyl)-1,4,7-triazaheptan-1,4,7-triaxetic, CAS số: 119895-95-3), EOB-DTPA (DTPA được liên kết với nhóm etoxybenzyl, CAS số: 158599-72-5), TTHA (axit triethylentetraminhexaaxetic, CAS số: 869-52-3), DO3A (axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7-triaxetic, CAS số: 217973-03-0), HP-DO3A (axit 10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7-triaxetic, CAS số: 120041-08-9), DOTA (axit 1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic, CAS số: 60239-18-1), và các dẫn xuất phản ứng đã biết của chúng.

Các hợp chất và thể liên hợp được mô tả ở đây cũng bao gồm dạng tự do và các muối của nó trừ khi được quy định khác. Trong ngữ cảnh này, "muối của nó" là muối mà có thể được tạo ra bằng hợp chất hoặc thể liên hợp mà có thể tạo ra muối cộng axit hoặc muối với bazơ phụ thuộc vào loại phân tử thể trong hợp chất hoặc thể liên hợp. Ví dụ cụ thể của chúng bao gồm muối cộng axit với các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit hydroiodic, axit sulfuric, axit nitric, và axit phosphoric; hoặc các axit hữu cơ như axit formic, axit axetic, axit propionic, axit oxalic, axit malonic, axit succinic, axit fumaric, maleic, axit lactic, axit malic, axit mandelic, axit tartaric, axit dibenzoyltartaric, axit ditoluoyltartaric, axit citric, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, axit aspartic và axit glutamic; hoặc các bazơ vô cơ như natri, kali, magie, canxi, và nhôm; muối với các bazơ hữu cơ như metylamin, etylamin, etanolamin, lysin, và ornithin; muối với các axit amin khác nhau và các dẫn xuất của axit amin như acetyleuxin; và các muối amoni. Ví dụ, DFO tồn tại dưới dạng deferoxamin metansulfonat hoặc tồn tại dưới dạng các muối khác. DTPA tồn tại ở cả dạng tự do và dạng muối natri.

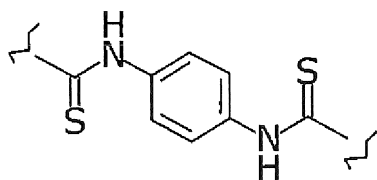
Một phương án nhất định của "chất tạo chelat" để sử dụng trong chất cản quang MRI là chất tạo chelat mang sắt hoặc không mang sắt được mô tả ở trên.

Phương án nhất định của "chất tạo chelat" để sử dụng trong chất đánh dấu PET là chất tạo chelat chứa sắt hoặc không chứa sắt được mô tả ở trên. Một phương án nhất định là MAG3 (mercapto-acetyl-glyxin-glyxin-glyxin, CAS số: 66516-09-4). Một phương án nhất định là DFO.

Các ví dụ về một phương án nhất định của "chất tạo chelat" cấu thành phối tử được chứa trong thể liên hợp theo sáng chế bao gồm DFO, DTPA, DTPA-BMA, EOB-DTPA, DO3A, HP-DO3A, và DOTA. Một phương án nhất định là DFO, DTPA, hoặc DOTA. Một phương án nhất định là DFO.

"Phần tử liên kết là nhóm tạo ra khoảng cách giữa mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người và phối tử. Các ví dụ về phương án nhất định của "phần tử liên kết" trong thể liên hợp bao gồm công thức dưới đây:

[Công thức hóa học 6]



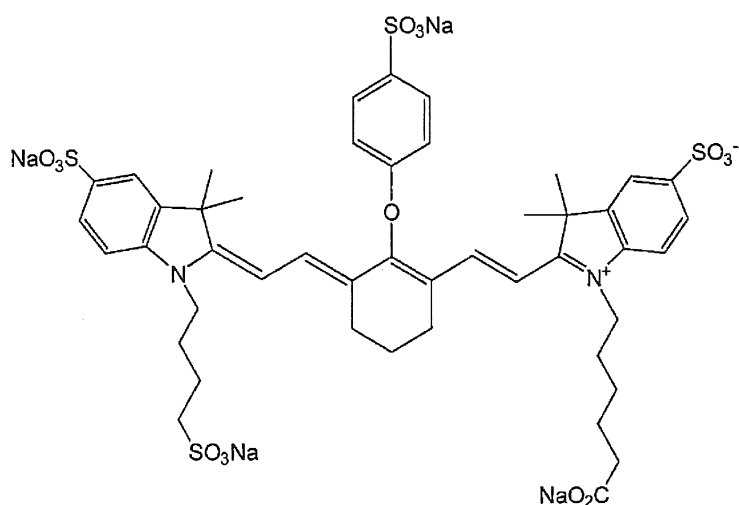
(dưới đây, được gọi là -C(=S)-NH-(1,4-phenylene)-NH-C(=S)-, -CH<sub>2</sub>-(1,4-phenylene)-NH-C(=S)-, và -C(=O)-(C<sub>1-20</sub> alkylene)-C(=O)-. Trong ngữ cảnh này, "C<sub>1-20</sub> alkylene" là alkylene mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Một phương án nhất định của C<sub>1-20</sub> alkylene là C<sub>1-10</sub> alkylene hoặc C<sub>1-2</sub> alkylene. Một phương án nhất định của C<sub>1-20</sub> alkylene là etylen. Một phương án nhất định là -C(=S)-NH-(1,4-phenylene)-NH-C(=S)-. Một phương án nhất định là -C(=O)-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C(=O)-. Các ví dụ về thuốc thử mà có thể được sử dụng làm phần tử liên kết bao gồm HO-C(=O)-(C<sub>1-20</sub> alkylene)-C(=O)-OH, axit succinic, và p-di-NCS-benzen(p-diisoxyanobenzen).

Thể liên hợp theo sáng chế chứa thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được sử dụng làm chất tạo ảnh phân tử được đánh dấu huỳnh quang, được chất để sử dụng trong phương pháp trị liệu quang miễn dịch, hoặc chất tạo ảnh phân tử được đánh dấu huỳnh quang và được chất để sử dụng trong phương pháp trị liệu quang miễn dịch.

Thuốc nhuộm có mức hấp thụ tối đa và mức phát xạ tối đa ở bước sóng cận hồng ngoại (650 đến 1000 nm) thường được sử dụng trong nhiếp ảnh có thể được sử dụng làm thuốc nhuộm huỳnh quang để sử dụng trong thể liên hợp theo sáng chế. Các ví dụ về phương án nhất định của thuốc nhuộm huỳnh quang bao gồm các hợp chất xyanin và indoxyanin. Các ví dụ về phương án nhất định bao gồm IRDye800CW và IRDye700DX

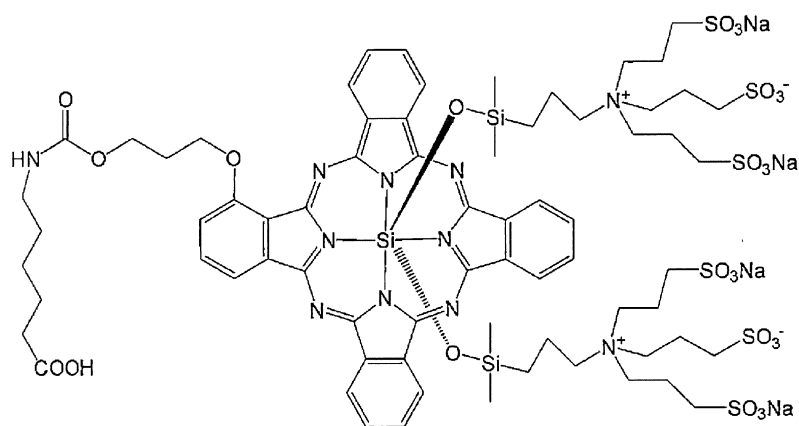
(LI-COR Bioscience, Inc.), Cy (Molecular Probes, Inc.), Alexa Fluor, BODIPY, và DyLight (Thermo Fisher Scientific Inc.), CF790 (Biotium, Inc.), DY (Dyomics GmbH), HiLyte Fluor 680 và HiLyte Fluor 750 (AnaSpec Inc.), và PULSAR650 và QUASAR670 (LGC Biosearch Technologies). Một phương án nhất định là IRDye800CW được biểu diễn bởi công thức dưới đây:

[Công thức hóa học 7]



hoặc IRDye700DX được biểu diễn bởi công thức dưới đây:

[Công thức hóa học 8]



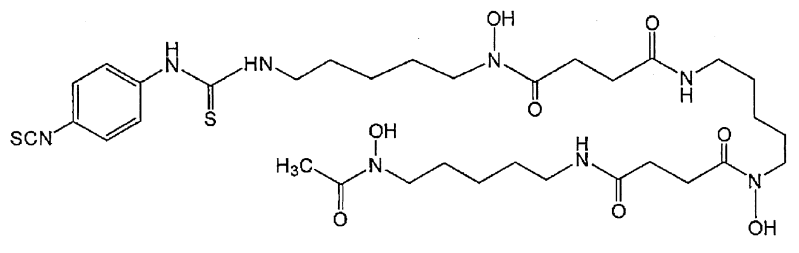
Thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được phản ứng qua nhóm carboxy, nhóm hydroxy, nhóm amino của nó, hoặc tương tự hoặc qua nhóm hoạt tính được đưa vào bằng phương pháp thường được sử dụng bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này với mảnh Fab hoặc phân tử liên kết. Một phương án nhất định của thuốc nhuộm huỳnh quang

có nhóm hoạt tính được đưa vào là thuốc nhuộm huỳnh quang được este hóa với nhóm N-hydroxysuccinimide (NHS). Ví dụ, este NHS của IRDye800CW và IRDye700DX được đề cập ở trên được bán trên thị trường, và chúng có thể được sử dụng.

Việc gắn kết của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế với gốc đánh dấu có thể thích hợp được thực hiện bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này bằng phương pháp đã biết. Ví dụ, gốc đánh dấu có thể liên kết với một hoặc nhiều nhóm amino (ví dụ, nhóm amino đầu tận N và nhóm amino của chuỗi bên axit amin), một hoặc nhiều nhóm thiol (ví dụ, nhóm thiol của chuỗi bên axit amin), hoặc một hoặc nhiều nhóm carboxyl (ví dụ, các nhóm carboxyl của đầu tận C và chuỗi bên axit amin) của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế. Một phương án nhất định của thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu được gắn kết với một hoặc nhiều nhóm amino của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế.

Khi gốc đánh dấu là phối tử và phần tử liên kết, thể liên hợp theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách cho chất tạo chelat phản ứng với chất thu được thông qua phản ứng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế với phần tử liên kết. Nó có thể được tạo ra bằng cách cho mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế phản ứng với chất thu được thông qua phản ứng của chất tạo chelat với phần tử liên kết. Với vai trò là ví dụ phản ứng, chất thu được từ phản ứng của nhóm amino của chất tạo chelat với phần tử liên kết có thể được phản ứng với một hoặc nhiều nhóm amino (ví dụ, nhóm amino đầu tận N và nhóm amino của chuỗi bên lysin) của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế. Phản ứng tổng hợp thioure bằng cách bổ sung isothioxyanat vào amin, phản ứng tổng hợp amit bằng cách bổ sung amin và axit carboxylic, hoặc chất tương tự có thể được sử dụng trong sản xuất thể liên hợp. Phản ứng này có thể được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp đã biết với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này. Hợp chất của chất tạo chelat được liên kết với phần tử liên kết trước có thể được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu. Các ví dụ về hợp chất của chất tạo chelat được liên kết với phần tử liên kết bao gồm p-SCN-Bn-DFO (DFO được liên kết với nhóm p-isothioxyanophenylaminothiocarbonyl, CAS số: 1222468-90-7) được biểu diễn bởi công thức dưới đây:

[Công thức hóa học 9]



DTPA được liên kết với nhóm p-isothioxyanobenzyl (p-NCS-Bn-DTPA, CAS số: 102650-30-6), DOTA được liên kết với nhóm p-isothioxyanobenzyl (p-NCS-Bn-DOTA, CAS số: 127985-74-4), và p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA ([axit (R)-2-amino-3-(4-isothioxyanatophenyl)propyl]-trans-(S,S)-xyclohexan-1,2-diamin-pentaaxetic, CAS số: 157380-45-5).

Kim loại (ion kim loại thuận từ hoặc đồng vị phóng xạ kim loại) có thể được bổ sung vào mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được liên kết với một hoặc nhiều gốc đánh dấu vì thế được tạo ra bằng phương pháp sản xuất để thu được thể liên hợp theo sáng chế chứa kim loại.

Ngoài ra, thể liên hợp theo sáng chế có thể được tạo ra dưới dạng thể liên hợp mà là mảnh Fab được liên kết qua nhóm amino của nó với một hoặc nhiều gốc đánh dấu bằng cách phản ứng một hoặc nhiều nhóm amino (ví dụ nhóm amino đầu tận N và nhóm amino của chuỗi bên axit amin) của mảnh Fab với gốc đánh dấu có nhóm carboxyl hoặc axit isothioxyanic được hoạt hóa bằng N-hydroxysuxinimit (NHS).

Thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp chứa một hoặc nhiều gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 27 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 23 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 15 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 11 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 9 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 7 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 5 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là

mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với 1 đến 4 gốc đánh dấu. Một phương án nhất định là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với một hoặc nhiều gốc đánh dấu còn chứa kim loại.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, (ii) phối tử, (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết, hoặc (iv) thuốc nhuộm huỳnh quang.

Theo một phương án nhất định, các ví dụ của thể liên hợp theo sáng chế bao gồm như sau:

(1) thể liên hợp trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng chứa bao gồm biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12;

(2) thể liên hợp theo (1), trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;

(3) thể liên hợp trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12;

(4) thể liên hợp theo (2), trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;

(5) thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ (1) đến (4), trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, hoặc (ii) phối tử;

(6) thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ (1) đến (4), trong đó phối tử là nhóm được cấu thành từ chất tạo chelat được chọn từ nhóm bao gồm DFO, DTPA, DTPA-BMA, EOB-DTPA, DO3A, HP-DO3A và DOTA, và phần tử liên kết là phần tử liên kết được chọn từ nhóm bao gồm  $-C(=S)-NH-(1,4\text{-phenylen})-NH-C(=S)-$ ,  $-CH_2-(1,4\text{-phenylen})-NH-C(=S)-$  và  $-C(=O)-(C_{1-20}\text{ alkylen})-C(=O)-$ ;

(7) thể liên hợp theo (6), trong đó phối tử là nhóm được cấu thành bởi chất tạo chelat được chọn từ nhóm bao gồm DFO, DTPA, và DOTA;

(8) thể liên hợp theo (6), trong đó phối tử là nhóm được cấu thành bởi DFO, và phần tử liên kết là  $-C(=S)-NH-(1,4\text{-phenylen})-NH-C(=S)-$ ;

(9) thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ (5) đến (8), còn chứa kim loại;

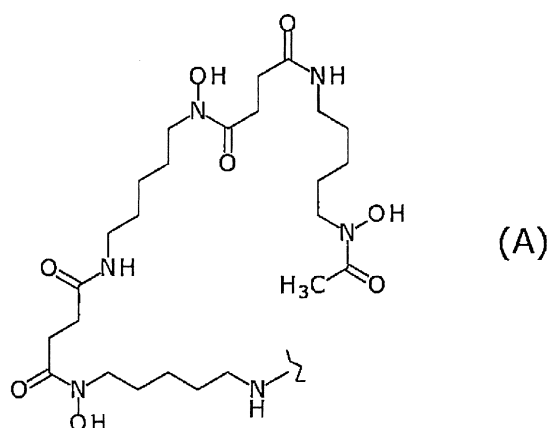
(10) thể liên hợp theo (9), trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại; và

(11) thể liên hợp theo (10), trong đó kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ .

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phần tử liên kết, hoặc (ii) phối tử.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó phối tử là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:

[Công thức hóa học 10]

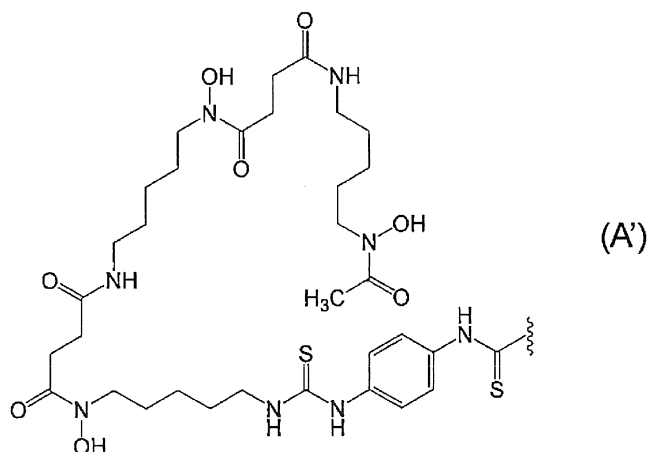


trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người hoặc phần tử liên kết.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế trong đó phối tử là phối

tử được biểu diễn bởi công thức (A) là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phân tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A') dưới đây:

[Công thức hóa học 11]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và

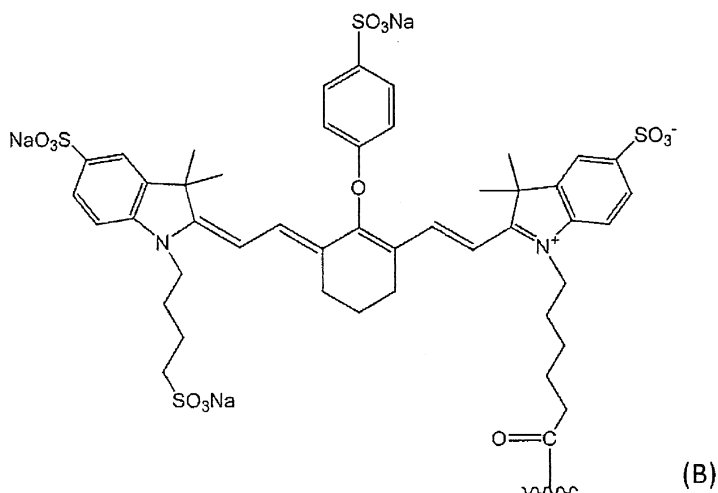
mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=S) đầu tận gốc đánh dấu.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết, hoặc (ii) phối tử, thể liên hợp còn chứa kim loại. Một phương án nhất định của kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại. Một phương án nhất định của chất đồng vị phóng xạ kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ .

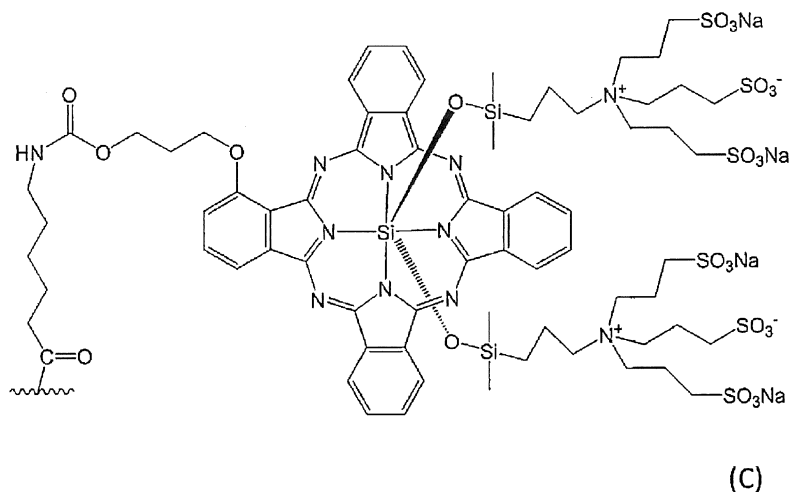
Theo một phương án khác, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là (i) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết, hoặc (ii) thuốc nhuộm huỳnh quang.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế trong đó gốc đánh dấu chứa thuốc nhuộm huỳnh quang là thể liên hợp trong đó thuốc nhuộm huỳnh quang là thuốc nhuộm huỳnh quang được chọn từ nhóm bao gồm công thức (B) dưới đây và công thức (C) dưới đây:

[Công thức hóa học 12]



[Công thức hóa học 13]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người hoặc phân tử liên kết.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B) là thể liên hợp trong đó đường lượn sóng và liên kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm  $\text{C}(=\text{O})$  đầu tận gốc đánh dấu.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C) là thể liên hợp trong đó đường lượn sóng là gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được gắn kết thông qua nhóm amino của nó với nguyên

tử cacbon của nhóm C(=O) đầu tận gốc đánh dấu.

Các phương án nhất định của thể liên hợp theo sáng chế sẽ được thể hiện thêm dưới đây:

(1) thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phần tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A'), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12;

(2) thể liên hợp theo (1), trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;

(3) thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phần tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A'), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12;

(4) thể liên hợp theo (3), trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;

(5) thể liên hợp theo (2) hoặc (4) là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với từ 1 đến 11 gốc đánh dấu;

(6) thể liên hợp theo (2) hoặc (4) là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với từ 1 đến 4 gốc đánh dấu;

- (7) thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ (1) đến (6), còn chứa kim loại;
- (8) thể liên hợp theo (7), trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại;
- (9) thể liên hợp theo (8), trong đó kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ ;
- (10) thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B) hoặc công thức (C), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12;
- (11) thể liên hợp theo (10), trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;
- (12) thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B) hoặc công thức (C), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12;
- (13) thể liên hợp theo (12), trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;
- (14) thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ (10) đến (13), trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C);
- (15) thể liên hợp theo (14) là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với từ 1 đến 11 gốc đánh dấu;

(16) thể liên hợp theo (15) là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với từ 1 đến 5 gốc đánh dấu;

(17) thể liên hợp theo bất kỳ trong số từ (10) đến (13), trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B);

(18) thể liên hợp theo (17) là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với từ 1 đến 11 gốc đánh dấu; và

(19) thể liên hợp theo (18) là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được liên kết với từ 1 đến 5 gốc đánh dấu.

Theo một phương án khác, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp được biểu diễn bởi công thức (I) dưới đây:

[Công thức hóa học 14]



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người,

L là (i) phối tử hoặc (ii) thuốc nhuộm huỳnh quang,

X là phần tử liên kết hoặc liên kết, và

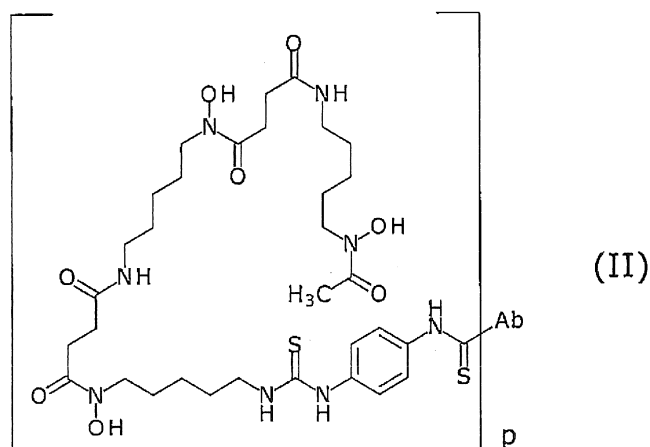
p là số tự nhiên từ 1 đến 27. Một phương án nhất định của p là số tự nhiên từ 1 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 15. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 11. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 7. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 5. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 4.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp có công thức (I), thể liên hợp này còn chứa kim loại. Một phương án nhất định của kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại. Một phương án nhất định của chất đồng vị phóng xạ thì kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ .

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp có công thức (I) là thể liên hợp theo sáng chế trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phần tử liên kết được biểu diễn bởi công thức

(A'). Theo một phương án nhất định, thể liên hợp này là thể liên hợp được biểu diễn bởi công thức (II) dưới đây:

[Công thức hóa học 15]



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và

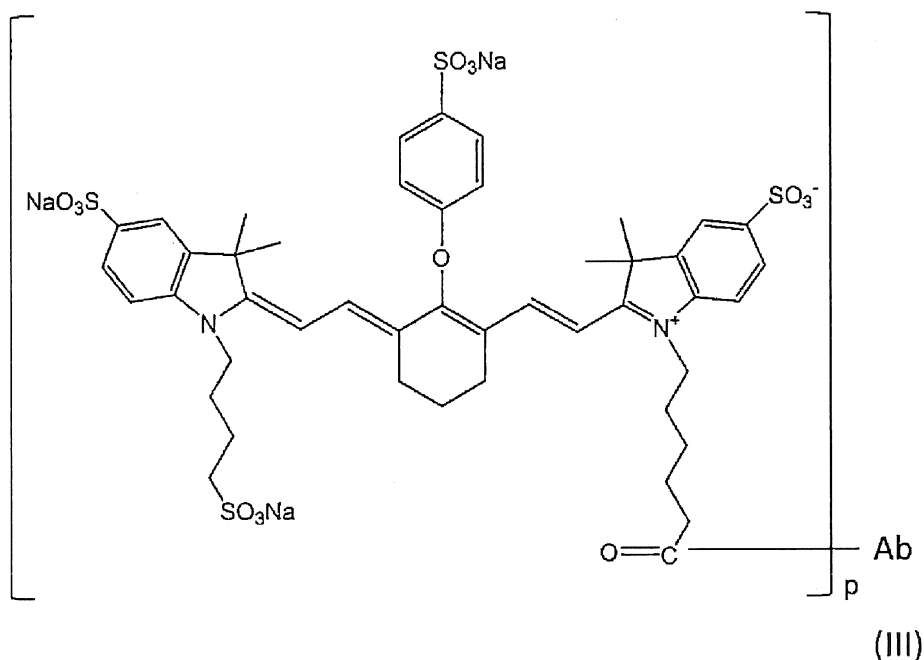
p là số tự nhiên từ 1 đến 27. Một phương án nhất định của p là số tự nhiên từ 1 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 15. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 11. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 7. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 5. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 4.

Ab được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=S) đầu tận gốc đánh dấu.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là thể liên hợp có công thức (II), thể liên hợp này còn chứa kim loại. Một phương án nhất định của kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại. Một phương án nhất định của chất đồng vị phóng xạ kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ .

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp có công thức (I) là thể liên hợp theo sáng chế trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B). Theo một phương án nhất định, thể liên hợp là thể liên hợp được biểu diễn bởi công thức (III) dưới đây:

[Công thức hóa học 16]



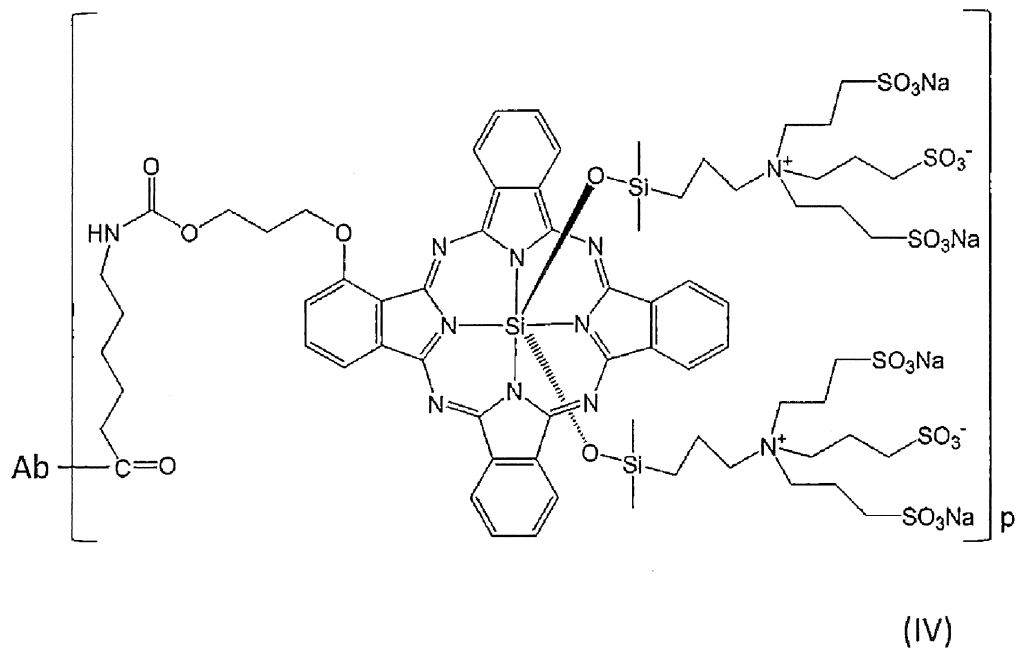
trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và

p là số tự nhiên từ 1 đến 27. Một phương án nhất định của p là số tự nhiên từ 1 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 15. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 11. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 7. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 5. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 4.

Ab được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=O) đầu tận gốc đánh dấu.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp có công thức (I) là thể liên hợp theo sáng chế trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C). Theo một phương án nhất định, thể liên hợp này là thể liên hợp được biểu diễn bởi công thức (IV) dưới đây:

[Công thức hóa học 17]



trong đó Ab là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và

p là số tự nhiên từ 1 đến 27. Một phương án nhất định của p là số tự nhiên từ 1 đến 23. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 15. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 11. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 9. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 7. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 5. Một phương án nhất định là số tự nhiên từ 1 đến 4.

Ab được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=O) đầu tận gốc đánh dấu.

Theo một phương án nhất định, thể liên hợp theo sáng chế là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được đánh dấu bằng phân tử có thể phát hiện. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được đánh dấu bằng phân tử có thể phát hiện là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và phân tử có thể phát hiện được liên kết qua liên kết cộng hóa trị một cách trực tiếp hoặc qua phân tử liên kết thích hợp. Trong sáng chế, phân tử có thể phát hiện có nghĩa là mỗi gốc có thể phát hiện được bằng kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh đã biết trong lĩnh vực này. Khi kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh là, ví dụ, tạo ảnh huỳnh quang, phân tử có thể phát hiện là thuốc nhuộm huỳnh quang. Khi kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh là PET, phân tử có thể phát hiện là hợp chất có thể tạo ảnh bằng PET. Một phương án nhất định là hợp chất chứa phối tử được đánh

dấu bằng hạt nhân phóng xạ, hoặc gốc đường được đánh dấu bằng hạt nhân phóng xạ phi kim loại. Một phương án nhất định của hợp chất chứa phối tử được đánh dấu bằng hạt nhân phóng xạ là phối tử đã tạo ra phức hợp chelat với đồng vị phóng xạ kim loại. Khi kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh là MRI, phân tử có thể phát hiện là hợp chất có thể phát hiện được bằng kỹ thuật MRI. Một phương án nhất định là hợp chất chứa phối tử được đánh dấu có ion kim loại thuận từ. Một phương án nhất định của hợp chất chứa phối tử được đánh dấu có ion kim loại thuận từ là phối tử tạo ra phức hợp chelat với ion kim loại thuận từ.

Khi mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người của sáng chế được đánh dấu bằng phân tử có thể phát hiện được sử dụng trong ngữ cảnh của phân tử có thể phát hiện, hợp chất có thể tạo ảnh bằng PET được chỉ là chất đánh dấu PET, và hợp chất có thể phát hiện bằng kỹ thuật MRI để chỉ chất cản quang MRI.

Các ví dụ về các phương án nhất định của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được đánh dấu bằng phân tử có thể phát hiện bao gồm như sau:

- (1) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người trong đó phân tử có thể phát hiện là thuốc nhuộm huỳnh quang, chất đánh dấu PET, hoặc chất cản quang MRI;
- (2) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo (1), trong đó phân tử có thể phát hiện là thuốc nhuộm huỳnh quang;
- (3) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo (2), trong đó phân tử có thể phát hiện là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B);
- (4) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo (2), trong đó phân tử có thể phát hiện là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C);
- (5) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo (1), trong đó phân tử có thể phát hiện là chất đánh dấu PET hoặc chất cản quang MRI;
- (6) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người trong đó phân tử có thể phát hiện là chất cản quang MRI chứa phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) và ion kim loại thuận từ, hoặc chất đánh dấu PET chứa phối tử và đồng vị phóng xạ kim loại; và
- (7) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo (6), trong đó phân tử có thể phát hiện và phần tử liên kế là chất cản quang MRI chứa phối tử và phần tử liên kết được biểu diễn

bởi công thức (A') và ion kim loại thuận từ, hoặc chất đánh dấu PET chứa phối tử và phân tử liên kết và đồng vị phóng xạ kim loại.

Phương pháp được đề cập ở trên có thể được dùng để gắn kết mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế với phân tử có thể phát hiện.

Thể liên hợp theo sáng chế cũng bao gồm thể liên hợp là hỗn hợp của nhiều thể liên hợp theo sáng chế. Ví dụ, thể liên hợp là hỗn hợp của thể liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người không được biến đổi sau dịch mã của sáng chế, và thể liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế thu được từ việc biến đổi sau dịch mã mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người cũng được bao gồm trong thể liên hợp theo sáng chế.

Các phương án nhất định của thể liên hợp theo sáng chế là hỗn hợp của nhiều thể liên hợp theo sáng chế sẽ được thể hiện dưới đây:

(1) thể liên hợp mà là hỗn hợp của thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phân tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A'), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6, và thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phân tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A'), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;

(2) thể liên hợp theo (1), còn chứa kim loại;

(3) thể liên hợp theo (2), trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại;

(4) thể liên hợp theo (3), trong đó kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ ;

(5) thể liên hợp mà là hỗn hợp của thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự

axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6, và thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6; và

(6) thể liên hợp mà là hỗn hợp của thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6, và thể liên hợp trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C), và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

#### Polynucleotit theo sáng chế

Polynucleotit theo sáng chế bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế.

Theo một phương án, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8, hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10.

Các ví dụ về polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8

bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 7. Các ví dụ về polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1. Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12 bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án, polynucleotit theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6 bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 5.

Polynucleotit theo sáng chế có thể tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp gen đã biết trong lĩnh vực này trên cơ sở trình tự nucleotit được thiết kế từ trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế. Các phương pháp khác nhau đã biết với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này, như phương pháp tổng hợp gen kháng thể được mô tả trong công bố quốc tế

số WO 90/07861 có thể được sử dụng làm phương pháp tổng hợp gen.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế

Vectơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm vectơ biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế, và vectơ biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế tốt hơn là bao gồm vectơ biểu hiện chứa polynucleotit gồm có trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4, vectơ biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6, và vectơ biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là polypeptit được mã hóa bằng polynucleotit theo sáng chế có thể được tạo ra trong các tế bào chủ khác nhau của tế bào nhân sơ và/hoặc tế bào nhân chuẩn. Các ví dụ về vectơ biểu hiện như vậy bao gồm vectơ plasmit và các vectơ virus (ví dụ, adenovirus và retrovirus). Tốt hơn là, pEE6.4 hoặc pEE12.4 (Lonza Ltd.) có thể được sử dụng.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm vùng khởi đầu được liên kết hoạt động với gen mã hóa mảnh chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trong polynucleotit theo sáng chế. Các ví dụ về vùng khởi đầu để biểu hiện mảnh Fab theo sáng chế trong tế bào chủ bao gồm vùng khởi đầu Trp, vùng khởi đầu lac, vùng khởi đầu recA, vùng khởi đầu  $\lambda$ P<sub>L</sub>, vùng khởi đầu lpp, và vùng khởi đầu tac khi tế bào chủ là vi khuẩn thuộc giống *Escherichia*. Các ví dụ về vùng khởi đầu để biểu hiện ở nấm men bao gồm vùng khởi đầu PH05, vùng khởi đầu PGK, vùng khởi đầu GAP, và vùng khởi đầu ADH. Các ví dụ về vùng khởi đầu để biểu hiện ở vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* bao gồm vùng khởi đầu SL01, vùng khởi đầu

SP02, và vùng khởi đầu penP. Các ví dụ của chúng bao gồm vùng khởi đầu có nguồn gốc từ virus như vùng khởi đầu CMV, RSV, và SV40, retrovirus, vùng khởi đầu actin, vùng khởi đầu EF (yếu tố kéo dài) 1 $\alpha$ , và vùng khởi đầu sốc nhiệt khi vật chủ là tế bào nhân chuẩn như tế bào động vật có vú.

Trong trường hợp sử dụng vi khuẩn, cụ thể là, *E. coli*, làm tế bào chủ, vector biểu hiện theo sáng chế có thể còn bao gồm codon khởi đầu, codon kết thúc, vùng kết thúc và đơn vị có khả năng sao chép. Mặt khác, trong trường hợp sử dụng nấm men, tế bào động vật hoặc tế bào côn trùng làm vật chủ, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm codon khởi đầu và codon kết thúc. Trong trường hợp này, trình tự tăng cường, các vùng không dịch mã 5' và 3' của gen mã hóa mảnh chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ theo sáng chế, trình tự tín hiệu tiết, vị trí nối, vị trí polyadenyl hóa, hoặc đơn vị có khả năng sao chép, v.v có thể được bao gồm trong đó. Ngoài ra, dấu chuẩn chọn lọc thường được sử dụng (ví dụ, gen kháng tetracyclin, gen kháng ampicilin, gen kháng kanamycin, gen kháng neomycin, gen dihydrofolat reductaza) có thể được chứa trong đó tùy theo mục đích.

Tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế

Tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế bao gồm tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế, được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự

nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế là tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế, được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (d) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Tế bào chủ được biến nạp không bị giới hạn cụ thể miễn là nó phù hợp với vector biểu hiện được sử dụng và có thể được biến nạp với vector biểu hiện để biểu hiện mảnh Fab. Các ví dụ của nó bao gồm các tế bào khác nhau như tế bào tự nhiên và tế bào được tạo ra theo cách nhân tạo thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế (ví dụ, vi khuẩn (vi khuẩn thuộc giống *Escherichia* và vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*), nấm men (giống *Saccharomyces*, giống *Pichia*, v.v), tế bào động vật và tế bào côn trùng (ví dụ, Sf9)), và các dòng tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào được nuôi cấy như tế bào CHO-K1SV, tế bào CHO-DG44, và tế bào 293). Việc biến nạp chính nó có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết, ví dụ, phương pháp canxi phosphat hoặc phương pháp điện di.

Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế

Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được nuôi cấy trong phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế.

Dạng nhất định của tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được nuôi cấy trong phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) sau đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm

trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

Tốt hơn là, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế được sử dụng là tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế, hoặc tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế.

Trong phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế, tế bào chủ được biến nạp có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng. Môi trường dinh dưỡng tốt hơn là chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn nitơ hữu cơ, cần thiết cho sự sinh trưởng của tế bào chủ được biến nạp. Các ví dụ về nguồn cacbon bao gồm glucoza, dextran, tinh bột hòa tan, và sucroza. Các ví dụ về nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn nitơ hữu cơ bao gồm muối amoni, nitrat, axit amin, dịch chiết ngô, pepton, casein, dịch chiết thịt, bột đậu nành, và dịch chiết khoai tây. Ngoài ra, các chất dinh dưỡng khác (ví dụ, muối vô cơ (ví dụ canxi clorua, natri dihydro phosphat, và magie clorua), vitamin, và chất kháng sinh (ví dụ tetracyclin, neomycin, ampicilin, và kanamycin)) có thể được bao gồm, nếu muốn.

Việc tự nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp được thực hiện bằng phương pháp đã biết. Các điều kiện nuôi cấy, ví dụ, nhiệt độ, độ pH của môi trường, và thời gian nuôi cấy được chọn một cách thích hợp. Khi vật chủ là, ví dụ, tế bào động vật, môi trường MEM (Science; 1952; 122: 501), môi trường DMEM (Virology; 1959; 8: 396-97), môi trường RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc.; 1967; 199: 519-24), môi trường 199 (Proc. Soc. Exp.

Biol. Med.; 1950; 73:1-8), hoặc môi trường tương tự chứa khoảng 5 đến 20% huyết thanh thai bò có thể được sử dụng làm môi trường. Độ pH của môi trường tốt hơn là khoảng 6 đến 8. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 30 đến 40°C trong khoảng 15 đến 336 giờ, và việc sục khí hoặc khuấy cũng có thể được thực hiện, nếu cần. Khi tế bào chủ là tế bào côn trùng, các ví dụ của chúng bao gồm môi trường Grace (PNAS; 1985; 82: 8404-8) chứa huyết thanh thai bò. Độ pH của nó tốt hơn là khoảng 5 đến 8. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 20 đến 40°C trong 15 đến 100 giờ, và việc sục khí hoặc khuấy cũng có thể được thực hiện, nếu cần. Nếu vật chủ là vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, hoặc nấm sợi, ví dụ, môi trường lỏng chứa nguồn dinh dưỡng được mô tả ở trên là thích hợp. Môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 8 được ưu tiên. Nếu vật chủ là *E. coli*, thì các ví dụ được ưu tiên về môi trường gồm môi trường LB và môi trường M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory; 1972: 431). Trong trường hợp như vậy, việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 14 đến 43°C trong khoảng 3 đến 24 giờ có sục khí hoặc khuấy, nếu cần. Khi vật chủ là vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, việc nuôi cấy thường được thực hiện ở 30 đến 40°C trong khoảng 16 đến 96 giờ có sục khí hoặc khuấy, nếu cần. Khi vật chủ là nấm men, các ví dụ về môi trường bao gồm môi trường tối thiểu Burkholder (PNAS; 1980; 77: 4505-8). Độ pH của nó mong muốn là trong khoảng từ 5 đến 8. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 20 đến 35°C trong khoảng 14 đến 144 giờ, và việc sục khí hoặc khuấy cũng có thể được thực hiện, nếu cần.

Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế có thể bao gồm bước thu hồi, tốt hơn là tách hoặc tinh chế, mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được biểu hiện, ngoài bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người. Các ví dụ về phương pháp tách và tinh chế bao gồm: phương pháp dựa vào độ hòa tan, như loại muối và kết tủa dung môi; phương pháp dựa vào sự khác biệt trọng lượng phân tử, như thẩm tách, siêu lọc, lọc gel, và điện di gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit; phương pháp dựa trên sự khác nhau về điện tích, sắc ký trao đổi ion và sắc ký hydroxylapatit; phương pháp dựa trên ái lực đặc thù, như sắc ký ái lực; phương pháp dựa trên sự khác nhau về tính kỵ nước, như sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo; và phương pháp dựa trên sự khác nhau về điểm đẳng điện, như sự hội tụ đẳng điện.

### Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế

Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế bao gồm bước liên kết cộng hóa trị mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế với gốc đánh dấu. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; thu hồi mảnh Fab đã biểu hiện; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước bổ sung kim loại. Phần tử liên kết, chất tạo chelat, kim loại, hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang, v.v, và phương pháp liên kết được sử dụng có thể sử dụng được mô tả trong phần <Thể liên hợp theo sáng chế>.

Theo một phương án, phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu. Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu.

Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; và i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử. Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; và i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử.

Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh

Fab của kháng thể kháng MUC1 người; i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử; và đánh dấu phối tử của thể liên hợp bằng kim loại (tức là, tạo ra phức hợp chelat). Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử; và đánh dấu phối tử của thể liên hợp bằng kim loại.

Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử; và đánh dấu phối tử của thể liên hợp bằng đồng vị phóng xạ kim loại (tức là, tạo ra phức hợp chelat). Phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử; và đánh dấu phối tử của thể liên hợp bằng đồng vị phóng xạ kim loại.

Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; và i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với thuốc nhuộm huỳnh quang. Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; và i) gắn kết mảnh Fab thông qua phần tử liên kết với thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với thuốc nhuộm huỳnh quang.

Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; và đánh dấu mảnh Fab bằng phân tử có thể

phát hiện. Một phương án nhất định của phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế là phương pháp bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người; thu hồi mảnh Fab được biểu hiện; và đánh dấu mảnh Fab bằng phân tử có thể phát hiện.

Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế có thể được thực hiện dưới dạng phương pháp gồm hai hoặc nhiều bước được xác định ở trên dưới dạng một loạt các bước hoặc có thể được thực hiện dưới dạng phương pháp bao gồm ít nhất một trong các bước được xác định ở trên. Ví dụ, phương pháp bao gồm bước gắn kết mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế với gốc đánh dấu, và phương pháp bao gồm bước đánh dấu mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được liên kết với gốc đánh dấu bằng kim loại cũng được bao gồm trong phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế. Ngoài ra, phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế bao gồm phương pháp có thứ tự các bước khác nhau. Ví dụ, phương pháp bao gồm bước đánh dấu chất tạo chelat bằng kim loại, và sau đó liên kết cộng hóa trị chất tạo chelat với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế cũng được bao gồm trong phương pháp tạo ra thể liên hợp theo sáng chế.

Chế phẩm chẩn đoán và phương pháp chẩn đoán

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chẩn đoán chứa thể liên hợp theo sáng chế bao gồm kim loại hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang (dưới đây, được gọi là thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế). Chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo sáng chế. Cụ thể, chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế có thể chứa một thể liên hợp theo sáng chế, hoặc có thể chứa hai hay nhiều thể liên hợp theo sáng chế trong tổ hợp. Thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế có thể được điều chế theo phương pháp thông thường và được sử dụng làm dược chất chẩn đoán sớm, dược chất phân đoạn hoặc dược chất chẩn đoán trong phẫu thuật (cụ thể là, dược chất chẩn đoán ung thư). Dược chất chẩn đoán trong khi phẫu thuật có nghĩa là dược chất chẩn đoán có thể xác định được vị trí thương tổn trong khi phẫu thuật như phẫu thuật hoặc phẫu thuật nội soi và kiểm tra bản chất của nó. Trong trường hợp sử dụng chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế làm dược chất chẩn đoán trong khi phẫu thuật, chế phẩm chẩn đoán được dùng cho bệnh nhân, ví dụ, 2 đến 32 giờ, 6 đến 24 giờ trong phương án nhất định, hoặc 2 giờ trong phương án khác,

trước khi phẫu thuật.

Được chất chẩn đoán sớm có nghĩa là được chất chẩn đoán tập trung vào việc thực hiện chẩn đoán khi không quan sát thấy tình trạng bệnh lý hoặc ở giai đoạn sớm. Ví dụ, đối với bệnh ung thư, nó có nghĩa là được chất chẩn đoán được sử dụng khi không quan sát thấy tình trạng bệnh lý hoặc ở giai đoạn 0 hoặc giai đoạn 1.

Được chất phân đoạn có nghĩa là được chất chẩn đoán có thể kiểm tra mức độ tiến triển hoặc tình trạng bệnh lý. Ví dụ, đối với ung thư, nó có nghĩa là được chất chẩn đoán có thể kiểm tra được giai đoạn ung thư.

Bệnh ung thư được mong đợi là có thể được chẩn đoán bằng chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế là bệnh ung thư biểu hiện MUC1 người. Các ví dụ về phương án nhất định bao gồm ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tụy, ung thư thận, ung thư buồng trứng và ung thư cổ tử cung. Tốt hơn là, bệnh ung thư là ung thư vú hoặc ung thư bàng quang.

Lượng của thể liên hợp theo sáng chế được bổ sung vào dạng bào chế của chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế khác nhau phụ thuộc vào mức độ triệu chứng hoặc độ tuổi của bệnh nhân, dạng liều lượng của dạng bào chế được sử dụng, hoặc hiệu giá gắn kết của mảnh Fab, v.v. Ví dụ, khoảng 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg dựa trên khối lượng của mảnh Fab có thể được sử dụng cho mỗi đơn vị thể trọng của bệnh nhân.

Các ví dụ về dạng liều lượng của chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế có thể bao gồm chất để dùng ngoài đường tiêu hóa như tiêm hoặc chất để truyền nhỏ giọt. Việc dùng có thể được thực hiện bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm trong cơ tại chỗ đến mô đích, tiêm dưới da, dùng trong bàng quang hoặc dạng tương tự. Đối với dạng bào chế này, chất mang hoặc chất phụ trợ thích hợp cho các dạng liều này có thể được sử dụng trong khoảng được dụng. Loại chất mang hoặc chất phụ trợ được dụng không bị giới hạn cụ thể, và chất mang hoặc chất phụ trợ đã biết rõ với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế để sản xuất chế phẩm chẩn đoán sớm, chế phẩm để xác định giai đoạn hoặc chế phẩm chẩn đoán trong khi phẫu thuật đối với bệnh ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp có

thể phát hiện theo sáng chế để sử dụng trong chẩn đoán sớm, xác định giai đoạn hoặc chẩn đoán trong khi phẫu thuật đối với bệnh ung thư.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư, bao gồm dùng trước phẫu thuật hoặc trong khi phẫu thuật thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế cho đối tượng. Trong ngữ cảnh này, "đối tượng" là người hoặc động vật có vú khác bất kỳ cần tiếp nhận việc chẩn đoán. Một phương án nhất định là người có nhu cầu tiếp nhận việc chẩn đoán. Lượng hữu hiệu của thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế có thể là lượng giống như lượng hữu hiệu của thể liên hợp theo sáng chế đối với dạng bào chế được mô tả ở trên. Trong phương pháp chẩn đoán theo sáng chế, thể liên hợp có thể phát hiện theo sáng chế tốt hơn là được dùng bằng cách tiêm trong cơ cục bộ tại mô đích, tiêm dưới da hoặc tương tự. Trong phương pháp chẩn đoán của sáng chế, trong trường hợp dùng thể liên hợp theo sáng chế trước phẫu thuật, thể liên hợp được dùng cho bệnh nhân, ví dụ, từ 2 đến 48 giờ, từ 6 đến 24 giờ trong phương án nhất định, và 2 giờ trong phương án khác trước khi phẫu thuật.

Theo một phương án khác, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế để tạo ra thể liên hợp theo sáng chế. Theo một phương án nhất định, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế để sản xuất chế phẩm chẩn đoán chứa thể liên hợp theo sáng chế.

Với một phương án trong đó chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế chứa đồng vị phóng xạ kim loại được tạo ra, nó có thể được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ kim loại ngay trước khi sử dụng hoặc có thể được tạo ra dưới dạng chế phẩm chẩn đoán chứa chất đồng vị phóng xạ kim loại.

#### Chế phẩm điều trị và phương pháp điều trị

Sáng chế bao gồm được phẩm chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo sáng chế và tá dược được dùng. Cụ thể, chế phẩm điều trị theo sáng chế có thể chứa một thể liên hợp theo sáng chế, hoặc có thể chứa hai hoặc nhiều thể liên hợp theo sáng chế trong tổ hợp. Thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng trong bào chế được phẩm bằng phương pháp thường được sử dụng bằng cách sử dụng tá dược thường được sử dụng trong lĩnh vực

này, tức là tá dược được dụng, chất mang được dụng, hoặc chất tương tự. Các ví dụ về dạng liều lượng của các dược phẩm này bao gồm chất để dùng ngoài đường tiêu hóa như tiêm và chất để truyền nhỏ giọt. Việc dùng có thể được thực hiện bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, dùng trong bàng quang hoặc tương tự. Để bào chế, tá dược, chất mang, chất phụ trợ hoặc chất tương tự thích hợp cho các dạng liều lượng này có thể được sử dụng trong khoảng được dụng.

Lượng của thể liên hợp theo sáng chế được bổ sung vào dạng bào chế được mô tả ở trên khác nhau phụ thuộc vào mức độ của triệu chứng hoặc độ tuổi của bệnh nhân, dạng liều lượng của chế phẩm được sử dụng, hoặc hiệu giá gắn kết của mảnh Fab, v.v. Ví dụ, khoảng 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg dựa trên khối lượng của mảnh Fab có thể được sử dụng cho mỗi đơn vị thể trọng của bệnh nhân.

Dược phẩm chứa thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư. Bệnh ung thư dự kiến có thể được điều trị bằng dược phẩm chứa thể liên hợp theo sáng chế là bệnh ung thư biểu hiện MUC1 người. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tụy, ung thư thận, ung thư buồng trứng và ung thư cổ tử cung.

Một phương án nhất định của dược phẩm chứa thể liên hợp theo sáng chế là dược phẩm chứa thể liên hợp bao gồm thuốc nhuộm huỳnh quang và có thể được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng phương pháp trị liệu quang miễn dịch. Phương pháp trị liệu quang miễn dịch là phương pháp cho phép thể liên hợp chứa thuốc nhuộm huỳnh quang tích lũy đặc hiệu trong mô ung thư, sau đó chiếu xạ bằng ánh sáng có chiều dài bước sóng kích thích thuốc nhuộm huỳnh quang được chứa trong thể liên hợp để gây chết tế bào theo cách đặc hiệu ung thư thông qua tác dụng gây độc bằng ánh sáng của thuốc nhuộm huỳnh quang. Trong trường hợp sử dụng thể liên hợp theo sáng chế chứa thuốc nhuộm huỳnh quang trong phương pháp trị liệu quang miễn dịch, chiều dài bước sóng của ánh sáng chiếu xạ có thể là bước sóng cận hồng ngoại (650 đến 1000 nm).

Sáng chế bao gồm dược phẩm để điều trị ung thư vú hoặc ung thư bàng quang, chứa thể liên hợp theo sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm phương pháp điều trị ung thư vú

hoặc ung thư bàng quang, bao gồm bước dùng lượng có tác dụng điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế, mà có thể bao gồm bước thực hiện chiếu xạ bằng ánh sáng có bước sóng cận hồng ngoại (650 đến 1000 nm, ví dụ, 660 đến 740 nm, ví dụ, 680 nm), ngoài bước được mô tả ở trên. Một phương án nhất định của liều lượng chiếu ánh sáng là ít nhất là 1 J/cm<sup>2</sup>. Một phương án nhất định là ít nhất là 10 J/cm<sup>2</sup>. Một phương án nhất định là ít nhất là 100 J/cm<sup>2</sup>. Một phương án nhất định là từ 1 đến 500 J/cm<sup>2</sup>. Một phương án nhất định là từ 50 đến 200 J/cm<sup>2</sup>. Theo một phương án nhất định, việc chiếu xạ có thể được thực hiện nhiều lần sau khi dùng thể liên hợp theo sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm phương pháp cảm ứng quá trình chết tế bào của các tế bào ung thư của ung thư vú hoặc ung thư bàng quang, bao gồm bước dùng một lượng có tác dụng điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế.

Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư cũng có thể được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư. Ví dụ, dược phẩm để điều trị ung thư vú hoặc ung thư bàng quang cũng có thể được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư.

Sáng chế cũng bao gồm thể liên hợp theo sáng chế để sử dụng trong điều trị ung thư vú hoặc ung thư bàng quang. Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng thể liên hợp theo sáng chế để sản xuất dược phẩm để điều trị ung thư vú hoặc ung thư bàng quang.

Theo một phương án khác, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế để sản xuất dược phẩm chứa thể liên hợp theo sáng chế.

Sáng chế nói chung được mô tả ở trên. Các ví dụ cụ thể sẽ được nêu ở đây để tham khảo nhằm hiểu rõ hơn. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa mà không giới hạn sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Ví dụ 1: Tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người

Hai mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được đặt tên là P10-1 Fab và P10-2 Fab được tạo ra.

Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi

nhẹ của P10-1 Fab và P10-2 Fab được thiết kế đặc thù là các trình tự được kỳ vọng là cải thiện ái lực và không làm giảm ái lực ngay cả bằng việc gắn kết gốc đánh dấu, bằng cách sử dụng mẫu phân tử của kháng thể được làm giống như của người được tạo cấu trúc theo tài liệu (Proteins, 2014 Aug; 82 (8): 1624-35) sau khi làm giống như của người kháng thể 1B2, là kháng thể chuột có nguồn gốc từ kháng thể kháng MUC1 đặc hiệu ung thư ở người, với việc tham khảo phương pháp được mô tả trong tài liệu (Front Biosci., 2008 Jan 1; 13: 1619-33).

Vector GS pEE6.4 (Lonza Ltd.) có đoạn gắn chèn gen mảnh chuỗi nặng được tạo ra bằng cách nối gen mã hóa trình tự tín hiệu (MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 13)) với đầu 5' của gen vùng biến đổi của chuỗi nặng của P10-1 Fab hoặc P10-2 Fab và nối gen vùng hằng định Igγ1 người (chứa trình tự nucleotit từ các vị trí nucleotit 355 đến 669 của SEQ ID NO: 1 hoặc 3) với đầu 3' của nó được tạo ra. Ở đây, để biểu hiện từng mảnh Fab, codon kết thúc được gắn chèn vào sau codon Asp ở vị trí 221 dựa trên chỉ số EU do Kabat và các đồng tác giả cung cấp (tương ứng với Asp ở vị trí 222 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và 4 được nêu dưới đây) trong gen vùng hằng định của chuỗi nặng. Ngoài ra, vector GS pEE12.4 (Lonza Ltd.) có đoạn gắn chèn của gen chuỗi nhẹ được tạo ra bằng cách nối gen mã hóa trình tự tín hiệu (MSVPTQVLGLLLLWLTDARC (SEQ ID NO: 14)) với đầu 5' của gen vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thông thường của P10-1 Fab và P10-2 Fab và nối gen vùng hằng định chuỗi κ người (chứa trình tự nucleotit từ các vị trí nucleotit 340 đến 660 của SEQ ID NO: 5) với đầu 3' của nó được tạo ra.

Việc biểu hiện của từng mảnh Fab được thực hiện bằng phương pháp biểu hiện tạm thời. Tế bào Expi293F (Thermo Fisher Scientific Inc.) được nuôi cấy thành khoảng 2500000 tế bào/mL trong môi trường biểu hiện Expi293 (Thermo Fisher Scientific Inc.) được chuyển nhiễm bằng vector GS của mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đề cập ở trên bằng cách sử dụng kit chuyển nhiễm ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific Inc.), và được nuôi cấy trong 8 ngày. Sau khi biểu hiện, dịch nuôi cấy nổi được tinh chế bằng cách sử dụng KappaSelect (GE Healthcare Japan Corp.) để thu được từng mảnh Fab.

Trình tự nucleotit của mảnh chuỗi nặng của P10-1 Fab được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, và trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng của P10-1 Fab được thể hiện trong SEQ ID NO: 7. Trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 8.

Trình tự nucleotit của mảnh chuỗi nặng của P10-2 Fab được thể hiện trong SEQ ID NO: 3. Trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 4. Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng của P10-2 Fab được thể hiện trong SEQ ID NO: 9. Trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 10.

Chuỗi nhẹ là phổ biến ở P10-1 Fab và P10-2 Fab. Trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 5. Trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 6. Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của P10-1 Fab và P10-2 Fab được thể hiện trong SEQ ID NO: 11. Trình tự axit amin được mã hóa theo đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 12.

Ví dụ 2: Phân tích sự biến đổi axit amin của mảnh Fab

Kết quả phân tích sự biến đổi axit amin của P10-2 Fab đã tinh chế, đã đề xuất rằng glutamin đầu tận N của chuỗi nặng được biến đổi thành axit pyroglutamic trong phần lớn các kháng thể đã tinh chế.

Ví dụ 3: Đánh giá hoạt tính gắn kết của mảnh Fab

Hoạt tính gắn kết đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người được so sánh với P10-1 Fab và P10-2 Fab được biểu hiện bằng phương pháp được đề cập ở trên với mảnh Fab của kháng thể 1B2 khảm (dưới đây, được gọi là 1B2 Fab; được tạo ra bằng cách liên kết miền CH1 của IgG1 và miền CL chuỗi κ với miền VH và miền VL (thông tin trình tự của chúng được nêu trong tài liệu sáng chế 1), tương ứng, của kháng thể 1B2 (Tài liệu sáng chế 1); để thuận tiện cho việc liên kết của miền CH1 và miền CL, gốc alanin ở vị trí 113 dựa trên chỉ số EU (Kabat et al.) trong miền VH được thay thế bằng gốc serin, và gốc alanin ở vị trí 109 dựa trên chỉ số EU (Kabat et al.) trong miền VL được thay thế bằng gốc threonin) bằng ELISA tế bào (cell ELISA). Cụ thể, dòng tế bào ung thư vú T-47D (được mua từ ATCC; HTB-133) biểu hiện MUC1 đặc hiệu ung thư ở người được cấy ở  $0,75 \times 10^4$  tế bào cho mỗi lỗ trong đĩa ELISA 96 lỗ được phủ collagen I, và được nuôi cấy qua

đêm. Sau đó, các tế bào này được cố định trong formalin, và P10-1 Fab, P10-2 Fab hoặc 1B2 Fab được mô tả ở trên được phản ứng với chúng. Sau đó, kháng thể dê kháng Igk người được đánh dấu peroxidaza cây cải ngựa (HRP) (Southern Biotechnology Associates, Inc.) được phản ứng là kháng thể thứ cấp. Dung dịch phát hiện ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Japan Corp.) được bổ sung vào đó để phát quang, và mức độ phát quang được kiểm tra. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 1. P10-1 Fab và P10-2 Fab đã khẳng định có hoạt tính gắn kết đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người khoảng 10 hoặc lớn hơn 10 lần so với 1B2 Fab.

#### Ví dụ 4: Đánh dấu huỳnh quang mảnh Fab

Tiếp theo, các tác giả sáng chế đánh dấu P10-1 Fab, P10-2 Fab và 1B2 Fab bằng thuốc nhuộm huỳnh quang được đề cập ở trên.

Cụ thể, mỗi dung dịch mảnh Fab được điều chỉnh đến khoảng 1 mg/mL bằng nước muối đệm phosphat, (độ pH=7,4) được điều chỉnh đến độ pH=8,5 bằng cách bổ sung 1/10 lượng dung dịch dikali hydro phosphat 1M (độ pH=9). IRDye800CW NHS Este (LI-COR Bioscience, Inc.) được bổ sung vào đó đến nồng độ cuối là 310,8  $\mu\text{g/mL}$ , và sản phẩm thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong tối trong 2 giờ. IRDye800CW NHS Este có nhóm N-hydroxysuxinimit và vì thế phản ứng ngay lập tức với Lys của mảnh Fab. Sản phẩm này được thu hồi bằng máy lọc ly tâm Amicon Ultra 3K-0,5 mL (Merck Millipore) để tinh chế mảnh Fab được đánh dấu huỳnh quang. P10-1 Fab, P10-2 Fab và 1B2 Fab mang thuốc nhuộm huỳnh quang này được gọi là P10-1 Fab thuốc nhuộm, P10-2 Fab thuốc nhuộm và 1B2 Fab thuốc nhuộm.

#### Ví dụ 5: Đánh giá hoạt tính gắn kết của mảnh Fab được đánh dấu huỳnh quang

Hoạt tính gắn kết đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người được so sánh với P10-1 Fab thuốc nhuộm và P10-2 Fab thuốc nhuộm được đánh dấu bằng phương pháp được đề cập ở trên với 1B2 Fab thuốc nhuộm bằng Cell ELISA. Cụ thể, dòng tế bào ung thư vú tế bào T-47D biểu hiện MUC1 đặc hiệu ung thư ở người được cấy ở mật độ  $0,75 \times 10^4$  tế bào cho mỗi lỗ vào đĩa ELISA 96 lỗ được phủ collagen I, và được nuôi cấy qua đêm. Sau đó, tế bào được cố định trong formalin, và P10-1 Fab thuốc nhuộm, P10-2 Fab thuốc nhuộm hoặc 1B2 Fab thuốc nhuộm được mô tả ở trên được phản ứng với nó. Sau đó, kháng thể dê kháng

Igk người được đánh dấu HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc.) được phản ứng là kháng thể thứ cấp. Dung dịch phát hiện ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Japan Corp.) được bổ sung vào đó để phát quang, và mức độ phát quang được kiểm tra. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 2, hoạt tính gắn kết của 1B2 Fab thuốc nhuộm bị giảm bởi việc đánh dấu, trong khi đó P10-1 Fab thuốc nhuộm và P10-2 Fab thuốc nhuộm đã khẳng định là không bị giảm hoạt tính gắn kết bởi việc đánh dấu.

#### Ví dụ 6: Đánh dấu mảnh Fab bằng chất tạo chelat

Sau đó, các tác giả sáng chế đánh dấu P10-2 Fab bằng chất tạo chelat được đề cập ở trên.

Cụ thể, dung dịch mảnh Fab được điều chỉnh đến 12,5 mg/mL bằng nước muối đệm phosphat, (độ pH=7,) được điều chỉnh đến độ pH=9,0 bằng cách bổ sung dung dịch natri cacbonat 100 M ở 10 mM. p-SCN-Bn-deferoxamin (Macrocyclics, Inc.) được bổ sung vào đó ở nồng độ cuối là 1 mM, và sản phẩm thu được được phản ứng ở 37°C trong 2 giờ. p-SCN-Bn-deferoxamin có nhóm isothioxyanat và vì thế phản ứng ngay với Lys của mảnh Fab. Sản phẩm này được thu hồi bằng máy lọc ly tâm Amicon Ultra 10K-0,5 mL để tinh chế mảnh Fab được đánh dấu chất tạo chelat. P10-2 Fab được đánh dấu chất tạo chelat được gọi là P10-2 Fab DFO.

#### Ví dụ 7: Đánh giá hoạt tính gắn kết của mảnh Fab được đánh dấu chất tạo chelat

Hoạt tính gắn kết đối với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người được so sánh với P10-2 Fab DFO được đánh dấu bằng phương pháp được đề cập ở trên với P10-2 Fab bằng Cell ELISA. Cụ thể, tế bào T-47D biểu hiện MUC1 đặc hiệu ung thư ở người được cấy ở  $0,75 \times 10^4$  tế bào vào đĩa ELISA 96 lỗ được phủ collagen I, và được nuôi cấy qua đêm. Sau đó, tế bào được cố định trong formalin, và P10-2 Fab DFO hoặc P10-2 Fab được mô tả ở trên được phản ứng với nó. Sau đó, kháng thể dê kháng Igk người được đánh dấu HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc.) được phản ứng là kháng thể thứ cấp. Dung dịch phát hiện ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Japan Corp.) được bổ sung vào đó để phát quang, và mức độ phát quang được kiểm tra. Kết quả là như được thể hiện trên Fig. 3, P10-2 Fab DFO và P10-2 Fab có hoạt tính gắn kết tương đương. P10-2 Fab đã khẳng định là không giảm hoạt tính gắn kết bởi việc đánh dấu bằng chất tạo

chelat.

Ví dụ 8: Khả năng phản ứng của P10-2 trong mẫu mô ung thư bàng quang người

Để nghiên cứu khả năng phản ứng của P10-2 Fab trong ung thư bàng quang người, nghiên cứu được thực hiện bằng cách nhuộm miễn dịch bằng cách sử dụng dây mô ung thư bàng quang người (US Biomax, Inc., BC12011b). Khi P10-2 Fab được sử dụng làm kháng thể sơ cấp, kháng thể kháng người được sử dụng làm kháng thể thứ cấp phản ứng chéo với các mô của người. Vì thế, P10-2 IgG khảm của chuột (kháng thể trong đó miền VH và miền VL của P10-2 Fab được dung hợp với IgG2a CH1 chuột với miền CH3 và miền CL chuỗi  $\kappa$  của chuột, tương ứng) được tạo ra và được sử dụng làm kháng thể sơ cấp. Mẫu dây mô ung thư bàng quang người được phản ứng với dung dịch hydro peroxit 3% trong 5 phút và sau đó được rửa bằng nước muối đệm phosphat có độ pH=7,4. Sau đó, P10-2 IgG khảm của chuột (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) được phản ứng, và sau đó, kháng thể One-Step Polymer-HRP (BioGenex) được phản ứng thành kháng thể thứ cấp. DAB siêu nhạy (BioGenex) được bổ sung vào đó để hiện màu. Phản ứng dương tính của việc nhuộm mô ung thư được xác định là  $\pm$ : dương tính rất nhẹ, +: dương tính, ++: dương tính vừa phải, và +++: dương tính mạnh, và một trường hợp mà mô ung thư của nó không rõ ràng được loại trừ. Kết quả là, phản ứng dương tính được phát hiện trong 57 trong số 59 trường hợp nghiên cứu với 11 trường hợp là  $\pm$ , 24 trường hợp là +, 17 trường hợp là ++, và 5 trường hợp là +++ (tỷ lệ dương tính: 97%).

Ví dụ 9: Đánh dấu mảnh Fab được tạo chelat bằng  $^{89}\text{Zr}$

$^{89}\text{Zr}$  được sử dụng được hòa tan trong dung dịch nước axit oxalic 1 M và đã tạo ra  $^{89}\text{Zr}$ -Oxalat (Okayama University). 20  $\mu\text{L}$   $^{89}\text{Zr}$ -Oxalat (21,4 MBq) được trung hòa bằng 10  $\mu\text{L}$  dung dịch nước natri cacbonat 2 M. Sau đó, 70  $\mu\text{L}$  dung dịch axit gentisic 5 mg/mL được hòa tan trong dung dịch nước natri axetat 250 mM được bổ sung vào đó. Ngoài ra, 200  $\mu\text{L}$  dung dịch nước 500 mM HEPES (axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic) chứa 0,1% polysorbat 80 và 20% glyxerol được bổ sung vào đó. Bổ sung vào dung dịch chứa  $^{89}\text{Zr}$  này 100  $\mu\text{L}$  P10-2 Fab DFO 9,5 mg/mL và được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng thu được được tinh chế bằng cách sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra 10K-0,5 mL (Merck Millipore) và lọc thêm qua màng lọc (Millex-GV

0,22  $\mu$ m 13 mm; Merck Millipore) để thu được P10-2 Fab DFO được đánh dấu  $^{89}\text{Zr}$  (16,1 MBq) quan tâm. P10-2 Fab DFO được đánh dấu  $^{89}\text{Zr}$  được gọi là P10-2 Fab DFO  $^{89}\text{Zr}$ . Dung dịch P10-2 Fab DFO  $^{89}\text{Zr}$  thu được được phân tích bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (dòng 20AD; Shimadzu Corp.). Thời gian lưu (UV: 10,192 phút) của P10-2 Fab DFO được so sánh với thời gian lưu (UV: 10,178 phút, RI: 10,515 phút) của P10-2 Fab DFO  $^{89}\text{Zr}$ . Thời gian lưu tương ứng là tương đương, khẳng định rằng P10-2 Fab DFO được đánh dấu bằng  $^{89}\text{Zr}$ . Phân tích HPLC được thực hiện trong các điều kiện sau: cột: BioSep SEC s3000 300  $\times$  7,8 mm (Phenomenex Inc.), nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng, chiều dài bước sóng thiết bị phát hiện UV: 280 nm, pha động: dung dịch đệm phosphat (Gibco, 10010-023), lưu lượng: 1 mL/phút.

Ví dụ 10: Đánh dấu mảnh Fab bằng IRDye700DX

IRDye700DX NHS Este (LI-COR Bioscience, Inc.) được sử dụng để đánh dấu P10-2 Fab bằng IRDye700DX.

Cụ thể, dung dịch P10-2 Fab được điều chỉnh đến 1 mg/mL bằng nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4) được bổ sung lượng 1/10 dung dịch dikali hydro phosphat 1 M (độ pH=9). IRDye700DX NHS Este được bổ sung vào đó ở nồng độ cuối là 154  $\mu$ g/mL, và sản phẩm thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau khi phản ứng, P10-2 Fab được đánh dấu IRDye700DX được tinh chế bằng cách thu hồi qua thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra 10K-15 mL (Merck Millipore). P10-2 Fab được đánh dấu IRDye700DX này được gọi là P10-2 Fab IR700.

Ví dụ 11: Đánh giá hoạt tính gắn kết của mảnh Fab đối với dòng tế bào ung thư vú và dòng tế bào ung thư bàng quang

Hoạt tính gắn kết của P10-2 Fab trong ung thư vú và ung thư bàng quang ở người được nghiên cứu.

Cụ thể, dòng tế bào ung thư vú người tế bào MDA-MB-468 (được mua từ ATCC; HTB-132; dưới đây, được gọi là tế bào MM-468) hoặc dòng tế bào ung thư bàng quang người tế bào 647-V (được mua từ DSMZ; ACC 414) biểu hiện MUC1 đặc hiệu ung thư ở người được cấy ở  $1 \times 10^4$  tế bào cho mỗi lỗ vào đĩa ELISA 96 lỗ và được nuôi cấy qua đêm. Sau đó, P10-2 Fab được mô tả ở trên được phản ứng ở nồng độ từ 0,0000003 đến

0,001 mg/mL. Sau đó, kháng thể dê kháng IgG người được đánh dấu peroxidaza cây cải ngựa (HRP)(Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) được phản ứng là kháng thể thứ cấp. Dung dịch phát hiện ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Japan Corp.) được bổ sung vào đó để phát quang, và mức độ phát quang được kiểm tra. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 4, P10-2 Fab được phát hiện là có hoạt tính gắn kết đối với dòng tế bào ung thư vú người tế bào MM-468 và dòng tế bào ung thư bàng quang người tế bào 647-V.

Ví dụ 12: Đánh giá độ tương phản của mảnh Fab được đánh dấu huỳnh quang trong mô hình mang ung thư dưới da

$3 \times 10^6$  dòng tế bào ung thư vú người tế bào MM-468 được cấy ghép dưới da là tế bào dương tính với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người vào chân phải sau của chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột SCID; Charles River Laboratories Japan, Inc.). Chuột có sự hình thành khối u được chọn khoảng một tháng sau khi cấy ghép. P10-2 Fab thuốc nhuộm được hòa tan trong nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4) được dùng trong tĩnh mạch ở liều là 0,1, 0,3, 1 hoặc 3 mg/kg (N = 2 cho nhóm dùng 0,1 mg/kg, và N = 3 cho nhóm dùng 0,3, 1 và 3 mg/kg). Ảnh được chụp bằng máy ảnh thường và máy ảnh huỳnh quang cận hồng ngoại (Fluobeam (bộ lọc 800 nm); Fluoptics) 6 giờ và 24 giờ sau khi dùng P10-2 Fab thuốc nhuộm. Độ sáng huỳnh quang của vị trí khối u và vị trí nền xung quang khối u trong ảnh được chụp bằng máy ảnh huỳnh quang cận hồng ngoại được xác định. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 5A, P10-2 Fab thuốc nhuộm được phát hiện là tích tụ trong vị trí khối u MM-468 dương tính với MUC1 đặc hiệu ung thư ở người và có thể quan sát rõ ràng trên ảnh huỳnh quang 6 giờ sau khi dùng. Như được thể hiện trên Fig. 5B, tỷ lệ khối u/nền được phát hiện là tăng theo cách phụ thuộc liều lượng P10-2 Fab thuốc nhuộm trong khoảng từ 0,1 đến 3 mg/kg. Rõ ràng là hiệu quả này được duy trì ngay cả 24 giờ sau khi dùng. Kết quả này đã chứng minh rằng P10-2 Fab thuốc nhuộm cho phép phát hiện các tế bào ung thư dương tính với MUC1 từ 6 giờ đến 24 giờ sau khi dùng.

Ví dụ 13: Phát hiện khối u bằng mảnh Fab được đánh dấu IRDye700DX

$5 \times 10^6$  tế bào MM-468 được cấy ghép dưới da vào chân sau bên phải của mỗi chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột trụi lông; Charles River Laboratories Japan, Inc.). Thử

nghiệm này được thực hiện ở  $N = 2$ . P10-2 Fab IR700 (3 mg/kg) hoặc chất dẫn thuốc (nước muối đệm phosphat) được dùng trong tĩnh mạch 40 ngày sau khi cấy ghép. Chuột được chết nhân đạo 2 giờ sau khi dùng P10-2 Fab IR700. Khối u được cắt ra, và mức độ phát quang của các vị trí khối u được xác định bằng cách kích thích ở bước sóng 675 nm và phát hiện ở bước sóng 740 nm trong IVIS SPECTRUM (PerkinElmer, Inc.). Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 6, P10-2 Fab IR700 được phát hiện là tích lũy trong tế bào MM-468 2 giờ sau khi dùng.

Ví dụ 14: Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của mảnh Fab được đánh dấu IRDye700DX

Để nghiên cứu việc sử dụng P10-2 Fab IR700 trong điều trị bệnh ung thư, hoạt tính gây độc tế bào trong trị liệu quang miễn dịch được đánh giá.

Cụ thể, dòng tế bào ung thư vú người tế bào MM-468, dòng tế bào ung thư bàng quang người tế bào 647-V hoặc tế bào CHO-K1 của Ví dụ so sánh (được mua từ ATCC; CCL-61) được cấy ở  $5 \times 10^3$  tế bào mỗi lỗ vào đĩa trắng 384 lỗ và được nuôi cấy qua đêm. Sau đó, P10-2 Fab IR700 được phản ứng ở 0, 0,01, 0,1, hoặc 1  $\mu\text{g/mL}$  và sau đó được chiếu xạ bằng 0 đến 30  $\text{J/cm}^2$  ánh sáng có bước sóng là 680 nm. Sau khi chiếu ánh sáng, việc nuôi cấy qua đêm được thực hiện. CellTiter-Glo (Promega Corp.) được bổ sung vào đó để phát quang, và mức độ phát quang được đo để xác định tế bào sống. Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng 3 lỗ với mỗi điều kiện. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 7, rõ ràng là P10-2 Fab IR700 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào theo cách đặc hiệu đối với sự biểu hiện MUC1 đặc hiệu ung thư ở người bằng cách chiếu ánh sáng.

Ví dụ 15: Đánh giá hoạt tính kháng u của mảnh Fab được đánh dấu IRDye700DX

$5 \times 10^6$  tế bào MM-468 được cấy ghép dưới da vào chân sau bên phải của mỗi chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột trụi lông; Charles River Laboratories Japan, Inc.). Thử nghiệm này được thực hiện ở  $N = 4$ . Sau khi thể tích khối u đạt đến 300  $\text{mm}^3$ , P10-2 Fab IR700 (0,3, 1, hoặc 3 mg/kg) được dùng trong tĩnh mạch vào các ngày 1, 5, 8, 12 và 15. Nước muối đệm phosphat tương tự được dùng cho nhóm chất dẫn thuốc. Vào ngày sau khi dùng được chất, việc chiếu xạ bằng 0 hoặc 200  $\text{J/cm}^2$  ánh sáng có bước sóng là 680 nm được thực hiện, và thể tích khối u được đo theo thời gian. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 8, rõ ràng là P10-2 Fab IR700 thể hiện tác dụng kháng u theo cách phụ thuộc liều

lượng và việc chiếu ánh sáng.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo sáng chế được kỳ vọng là có thể sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc điều trị các bệnh ung thư như ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tụy, ung thư thận, ung thư buồng trứng hoặc ung thư cổ tử cung.

Văn bản tự do lập danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: Trình tự nucleotit của ADN mã hóa mảnh chuỗi nặng P10-1 Fab

SEQ ID NO: 2: Trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng P10-1 Fab

SEQ ID NO: 3: Trình tự nucleotit của ADN mã hóa mảnh chuỗi nặng P10-2 Fab

SEQ ID NO: 4: Trình tự axit amin của mảnh chuỗi nặng P10-2 Fab

SEQ ID NO: 5: Trình tự nucleotit của ADN mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể

SEQ ID NO: 6: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể

SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của ADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng P10-1 Fab

SEQ ID NO: 8: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng P10-1 Fab

SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của ADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng P10-2 Fab

SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng P10-2 Fab

SEQ ID NO: 11: Trình tự nucleotit của ADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể

SEQ ID NO: 12: Trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể

SEQ ID NO: 13: Trình tự tín hiệu chuỗi nặng

SEQ ID NO: 14: Trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ

SEQ ID NO: 15: Trình tự lặp liên tiếp của miền ngoại bào của MUC1

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Mảnh Fab của kháng thể kháng Mucin 1 (MUC1) người được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

2. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1, được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

3. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1, được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi

SEQ ID NO: 12; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người gồm mảnh chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 10 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 10 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 12.

4. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 3, được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6; và

(b) mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

5. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 4 là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

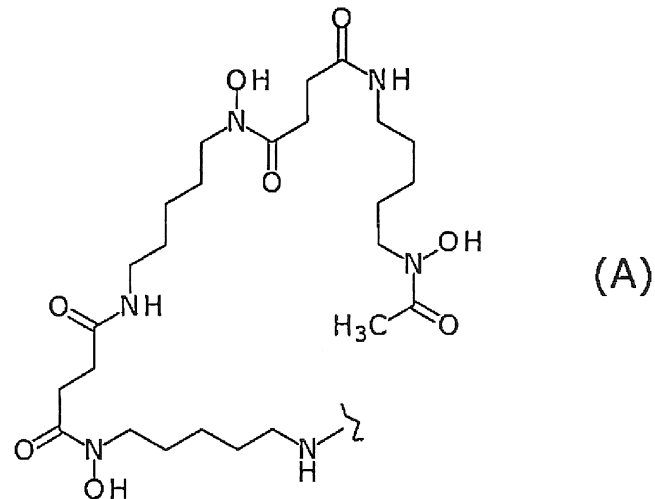
6. Mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 4 là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người chứa mảnh chuỗi nặng có nguồn gốc từ mảnh chuỗi nặng gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4 bằng cách cải biến glutamin ở vị trí axit amin số 1 của SEQ ID NO: 4 thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 6.

7. Thẻ liên hợp chứa một hoặc nhiều gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.

8. Thẻ liên hợp theo điểm 7, trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phần tử liên kết, (ii) phối tử, (iii) thuốc nhuộm huỳnh quang và phần tử liên kết, hoặc (iv) thuốc nhuộm huỳnh quang.

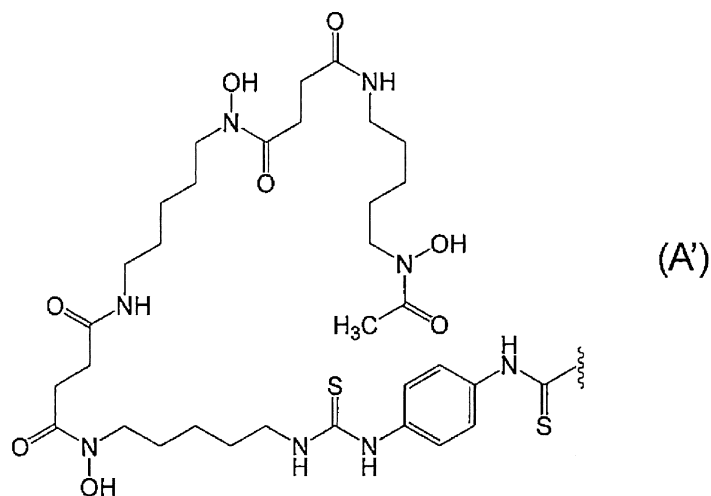
9. Thể liên hợp theo điểm 8, trong đó gốc đánh dấu là (i) phối tử và phân tử liên kết hoặc (ii) phối tử.

10. Thể liên hợp theo điểm 9, trong đó phối tử là phối tử được biểu diễn bởi công thức (A) dưới đây:



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người hoặc phân tử liên kết.

11. Thể liên hợp theo điểm 10, trong đó gốc đánh dấu là phối tử và phân tử liên kết được biểu diễn bởi công thức (A') dưới đây:



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người.

12. Thể liên hợp theo điểm 11, trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=S) đầu tận gốc đánh dấu.

13. Thể liên hợp được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) dưới đây:

(a) thể liên hợp theo điểm 12 trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5;

(b) thể liên hợp theo điểm 12 trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 6; và

(c) thể liên hợp mà là hỗn hợp của (a) và (b).

14. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 13, còn chứa kim loại.

15. Thể liên hợp theo điểm 14, trong đó kim loại là đồng vị phóng xạ kim loại.

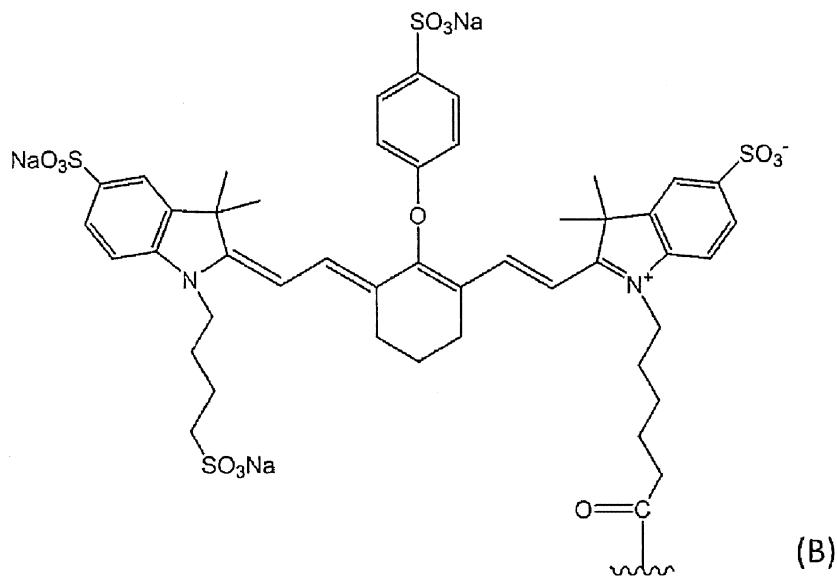
16. Thể liên hợp theo điểm 15, trong đó kim loại là  $^{89}\text{Zr}$ .

17. Thể liên hợp theo điểm 13, còn chứa  $^{89}\text{Zr}$ .

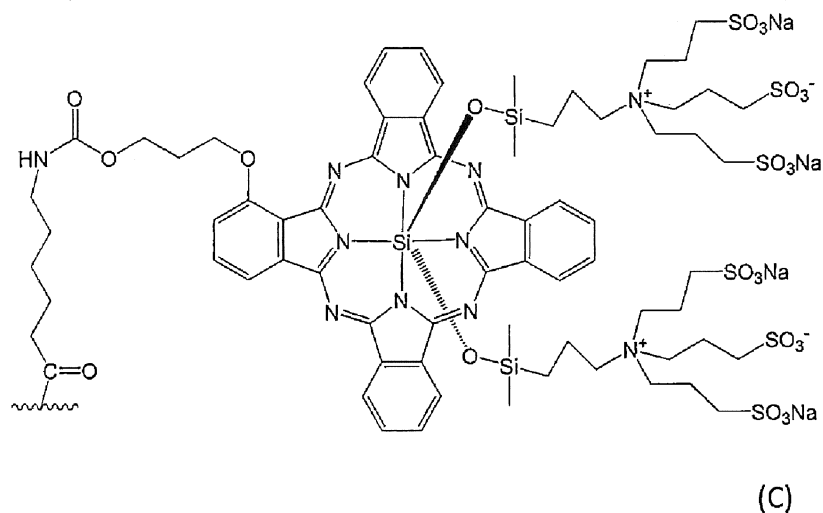
18. Thể liên hợp theo điểm 8, trong đó gốc đánh dấu là (i) thuốc nhuộm huỳnh quang và phân tử liên kết hoặc (ii) thuốc nhuộm huỳnh quang.

19. Thể liên hợp theo điểm 18, trong đó thuốc nhuộm huỳnh quang là thuốc nhuộm huỳnh quang được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất có công thức (B) dưới đây và hợp chất có công thức (C) dưới đây:

[Công thức hóa học 3]



[Công thức hóa học 4]



trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người này hoặc phân tử liên kết.

20. Thẻ liên hợp theo điểm 19, trong đó đường lượn sóng thể hiện việc gắn kết với mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người này được gắn kết qua nhóm amino của nó với nguyên tử cacbon của nhóm C(=O) đầu tận gốc đánh dấu.

21. Thẻ liên hợp theo điểm 20, trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (B).

22. Thể liên hợp được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) dưới đây:

- (a) thể liên hợp theo điểm 21 trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5;
- (b) thể liên hợp theo điểm 21 trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 6; và
- (c) thể liên hợp mà là hỗn hợp của (a) và (b).

23. Thể liên hợp theo điểm 20, trong đó gốc đánh dấu là thuốc nhuộm huỳnh quang được biểu diễn bởi công thức (C).

24. Thể liên hợp được chọn từ nhóm bao gồm từ (a) đến (c) dưới đây:

- (a) thể liên hợp theo điểm 23 trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5;
- (b) thể liên hợp theo điểm 23 trong đó mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người là mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 6; và
- (c) thể liên hợp mà là hỗn hợp của (a) và (b).

25. Polynucleotit bao gồm (a) và (b) dưới đây:

- (a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1; và
- (b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1.

26. Polynucleotit bao gồm (a) và (b) dưới đây:

- (a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5; và
- (b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5.

27. Vector biểu hiện bao gồm (a) và (b) dưới đây:

- (a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng

thể kháng MUC1 người theo điểm 1; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1.

28. Vector biểu hiện bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5; và

(b) polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5.

29. Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1 và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1; và;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1.

30. Tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) dưới đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5; và polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5; và

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5.

31. Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm bước nuôi

cây tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 1.

32. Phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây để biểu hiện mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5 và polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5 và vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm trình

tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người theo điểm 5.

33. Phương pháp tạo ra thể liên hợp chứa gốc đánh dấu và mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người, bao gồm bước: tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người bằng phương pháp theo điểm 31 hoặc 32; và liên kết cộng hóa trị mảnh Fab này với gốc đánh dấu.

34. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo điểm 33, trong đó bước liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu là bước i) gắn kết mảnh Fab thông qua phân tử liên kết với phối tử hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với phối tử.

35. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo điểm 34, còn chứa bước đánh dấu phối tử của thể liên hợp bằng đồng vị phóng xạ kim loại.

36. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo điểm 33, trong đó bước liên kết cộng hóa trị mảnh Fab với gốc đánh dấu là bước i) gắn kết mảnh Fab thông qua phân tử liên kết với thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc ii) liên kết cộng hóa trị mảnh Fab trực tiếp với thuốc nhuộm huỳnh quang.

37. Chế phẩm chẩn đoán chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 24, và chất mang được dụng.

38. Chế phẩm chẩn đoán theo điểm 37, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 17, 22 và 24.

39. Chế phẩm chẩn đoán theo điểm 38, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo điểm 17.

40. Chế phẩm chẩn đoán theo điểm 38, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo điểm 22.

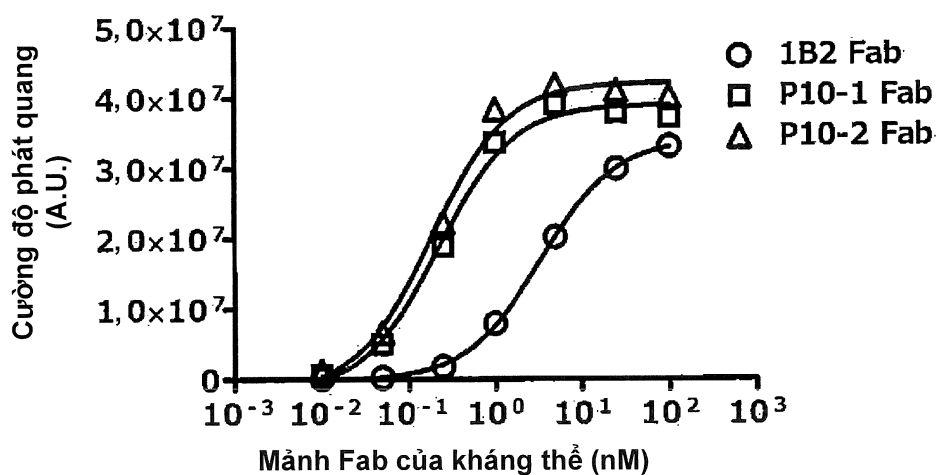
41. Chế phẩm chẩn đoán theo điểm 38, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo điểm 24.

42. Được phẩm chứa một hoặc nhiều thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 24, và chất mang được dụng.

43. Được phẩm theo điểm 42, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 17, 22 và 24.

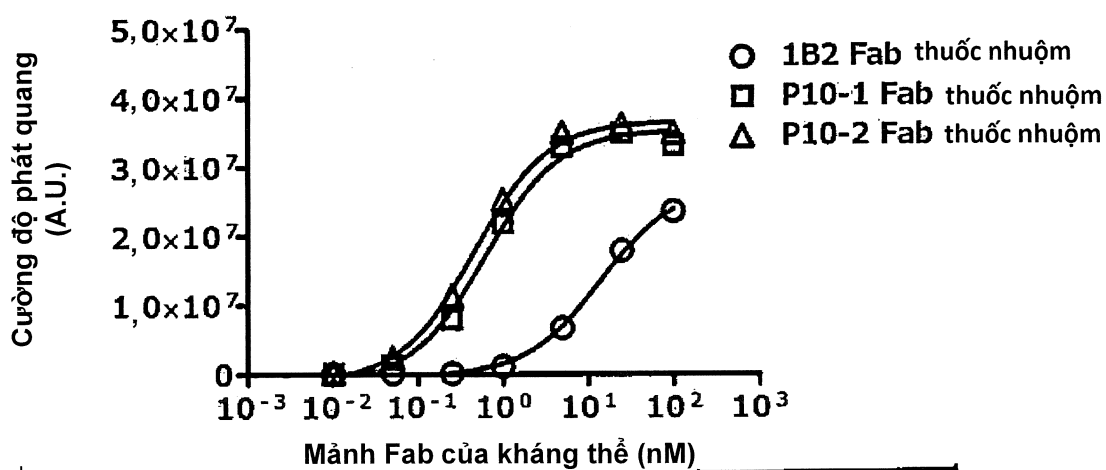
44. Được phẩm theo điểm 43, trong đó thể liên hợp là thể liên hợp theo điểm 24.

Fig. 1



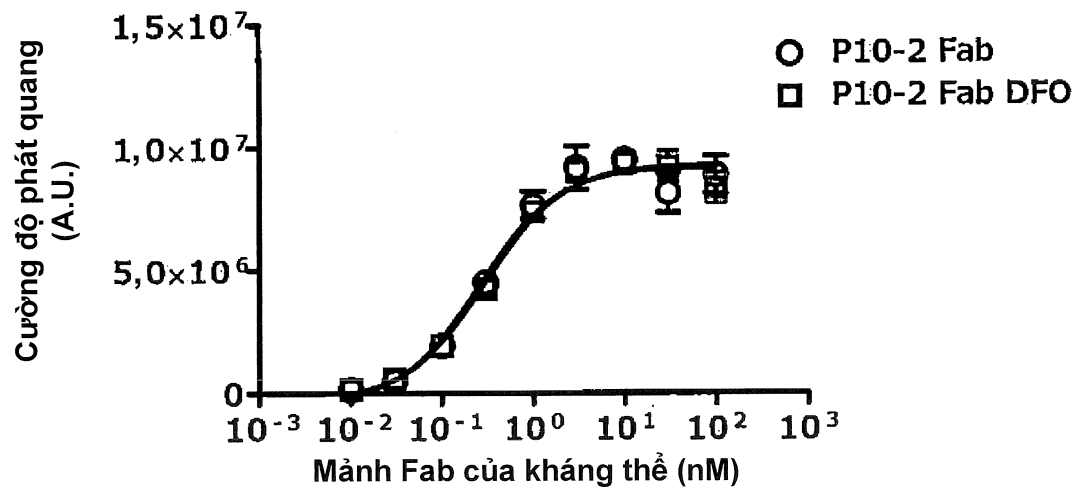
| Tên kháng thể | 1B2 Fab     | P10-1 Fab   | P10-2 Fab   |
|---------------|-------------|-------------|-------------|
| Kd (nM)       | 3,19        | 0,35        | 0,29        |
| <95% CI>      | <2,89-3,51> | <0,19-0,63> | <0,15-0,56> |

Fig. 2



| Tên kháng thể | 1B2 Fab thuốc nhuộm | P10-1 Fab thuốc nhuộm | P10-2 Fab thuốc nhuộm |
|---------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Kd (nM)       | 17,9                | 0,66                  | 0,49                  |
| <95% CI>      | <13,2-24,2>         | <0,35-1,25>           | <0,20-1,21>           |

Fig. 3



| Tên kháng thể       | P10-2 Fab   | P10-2 Fab DFO |
|---------------------|-------------|---------------|
| K <sub>d</sub> (nM) | 0.37        | 0.36          |
| <95% CI>            | <0,07-2,06> | <0,05-2,36>   |

Fig. 4

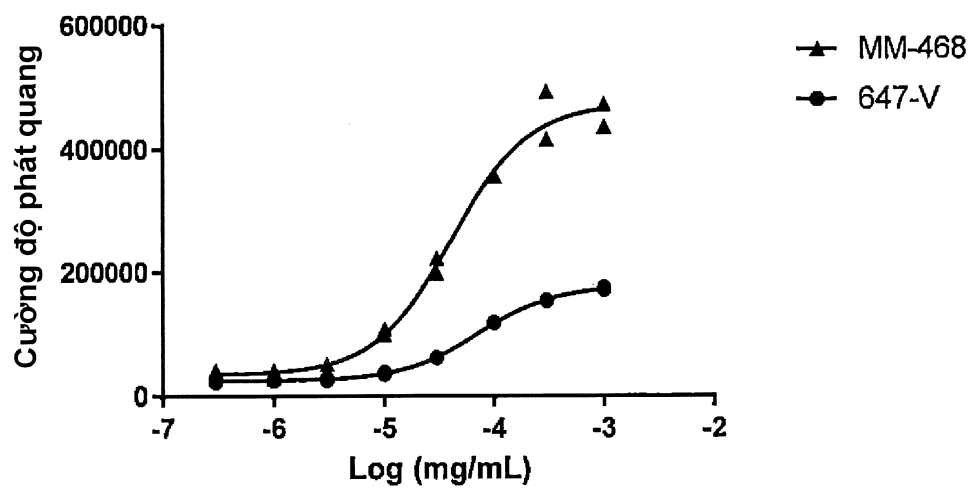


Fig. 5A

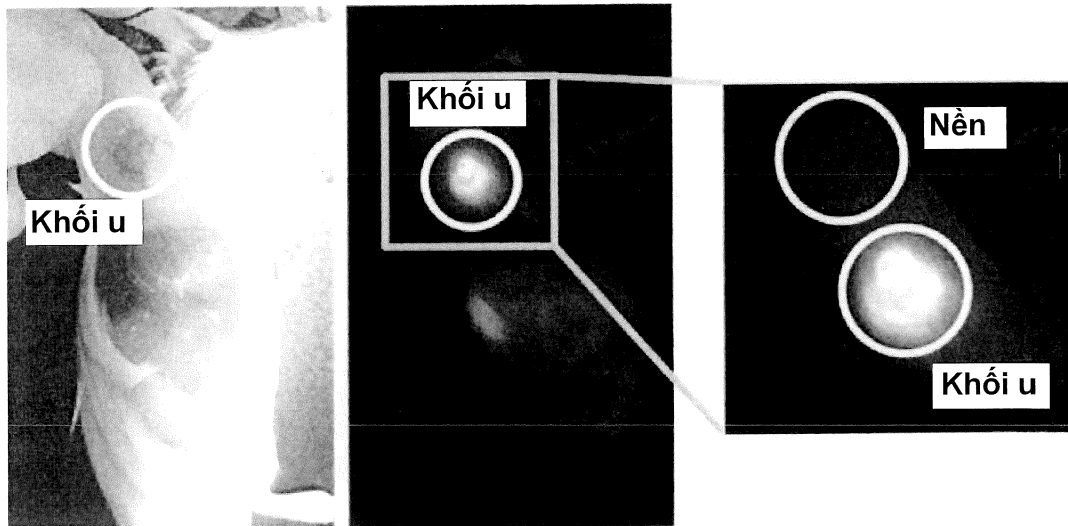


Fig. 5B

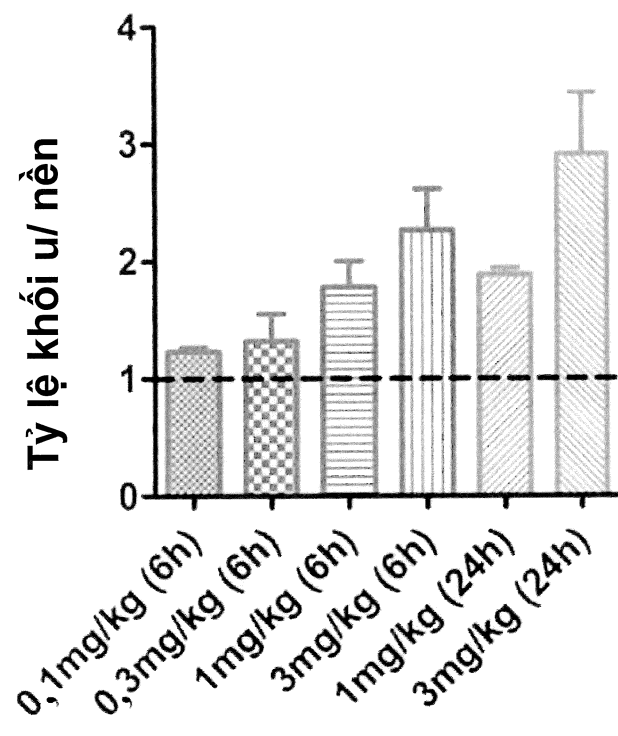


Fig. 6

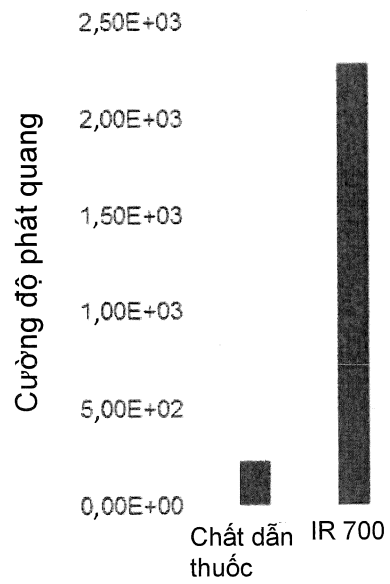


Fig. 7

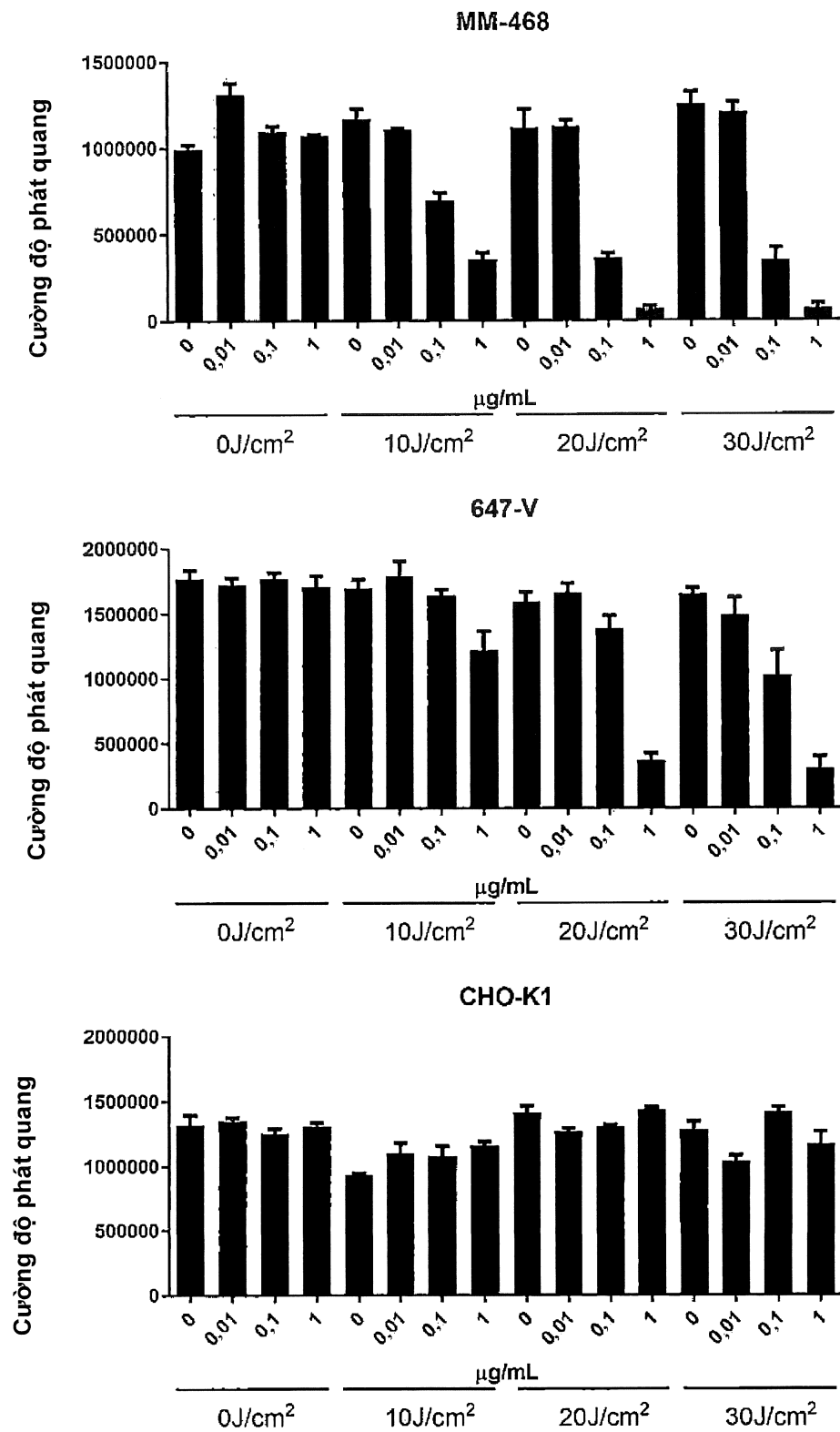
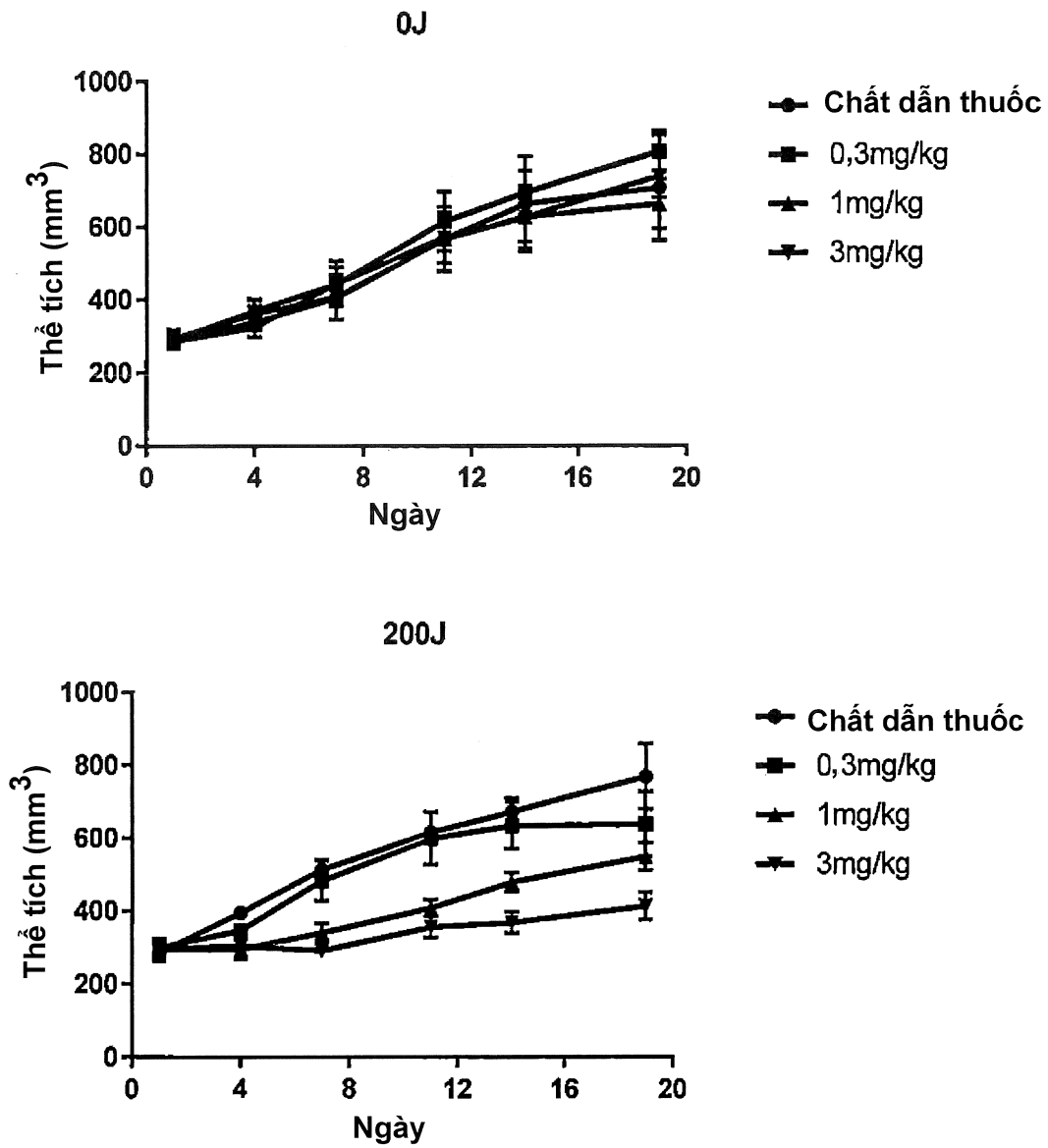


Fig. 8



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> Mảnh Fab của kháng thể kháng MUCIN 1 (MUC1) người, thể liên hợp chứa mảnh Fab này, dược phẩm chứa thể liên hợp này và phương pháp tạo ra mảnh Fab của kháng thể kháng MUC1 người này hoặc thể liên hợp này

<130> A17011A00

<150> JP2016-224811

<151> 2016-11-18

<160> 15

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 669

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa mảnh chuỗi nặng P10-1 Fab

<400> 1

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg  
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccagggt  
120

cctggacagg gactggaatg gatgggagcag aaccaccctg gcagcggcat catctaccac  
180

aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac  
240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc  
300

ggcaccagag gctttgccta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctcagcctcc  
360

accaagggcc catcgggtctt ccccttgga ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca  
420

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac  
480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc  
540

tactccctta gtagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc  
600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaattct  
660

tgtgactga  
669

<210> 2

<211> 222

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mảnh chuỗi nặng P10-1 Fab

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 <210> 3  
 <211> 669  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> ADN mã hóa mảnh chuỗi nặng P10-2 Fab  
 <400> 3  
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg  
 60  
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccaggct  
 120  
 cctggacagg gactggaatg gatgggagag aaccaccctg gcagcggcat catctaccac  
 180  
 aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac  
 240  
 atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc  
 300  
 ggcaccagag gctttgacta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctcagcctcc  
 360  
 accaagggcc catcgggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca  
 420  
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac  
 480  
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc  
 540  
 tactccctta gtagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc  
 600  
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaattc  
 660  
 tgtgactga  
 669  
 <210> 4  
 <211> 222

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; mảnh chuỗi nặng P10-2 Fab

&lt;400&gt; 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 660

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ADN mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể

&lt;400&gt; 5

gacgtcgtga tgacccagac ccctctgagc ctgagcgtga cacctggaca gcctgccagc  
60

atcagctgca gatccagcca gagcatcgtg cacagcaacg gcaacaccta cctggaatgg  
120

tatctgcaga agcccgcca gagccccag ctgctgatct acaggggtgc caaccgggtc  
180

agcggcgtgc ccgacagatt ttctggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc  
240

tcccggttg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgtt ttcaaggcag ccacggcccc  
300

tggacctttg gccagggaac aaagctggaa atcaagcgta cggcggctgc accatctgtc  
360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg  
420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa  
480

tccgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg  
540

agcagcagcc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgccctgcgaa  
600

gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag  
660

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Chuỗi nhẹ kháng thể

&lt;400&gt; 6

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Gly Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 7

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng P10-1 Fab

<400> 7

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg  
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccagggt  
120

cctggacagg gactggaatg gatgggagcag aaccaccctg gcagcggcat catctaccac  
180

aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac  
240

atggaactga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc  
300

ggcaccagag gctttgccta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctca  
354

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng thay đổi chuỗi nặng P10-1 Fab

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng P10-2 Fab

<400> 9

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg  
60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggcc tgagctgggt gcgccaggct  
120

cctggacagg gactggaatg gatgggagcag aaccaccctg gcagcggcat catctaccac  
180

aacgagaagt tccggggcag agtgaccctg accgccgacc ggagcaccag caccgcctac  
240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcagc  
300

ggcaccagag gctttgacta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctca  
354

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng thay đổi chuỗi nặng P10-2 Fab

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Asn His Pro Gly Ser Gly Ile Ile Tyr His Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95  
 Ala Arg Ser Ser Gly Thr Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 11  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> ADN mã hóa vùng thay đổi chuỗi nhẹ kháng thể  
 <400> 11  
 gacgtcgtga tgaccagac ccctctgagc ctgagcgtga cacctggaca gcctgccagc  
 60  
 atcagctgca gatccagcca gagcatcgtg cacagcaacg gcaacaccta cctggaatgg  
 120  
 tatctgcaga agcccggcca gagccccag ctgctgatct acaggggtgtc caaccgggtc  
 180  
 agcggcgtgc ccgacagatt ttctggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc  
 240  
 tcccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgtt ttcaaggcag ccacggcccc  
 300  
 tggacctttg gccagggaac aaagctggaa atcaagcgt  
 339  
 <210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Vùng thay đổi chuỗi nhẹ kháng thể  
 <400> 12  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Gly Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu chuỗi nặng

<400> 13

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ

<400> 14

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213>    Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Trình tự lặp lại liên tục của miền ngoại bào của MUC1

<400> 15

His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr

1                      5                      10                      15

Ala Pro Pro Ala

20