



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0043261

(51)^{2020.01} A61K 47/68; C07K 16/18; A61P 35/00; (13) B
A61K 39/00

(21) 1-2021-08295

(22) 08/06/2020

(86) PCT/CN2020/094856 08/06/2020

(87) WO/2020/244657 10/12/2020

(30) 201910498993.2 06/06/2019 CN; 202010215322.3 24/03/2020 CN

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/03/2022 408

(73) 1. SHANGHAI HANSOH BIOMEDICAL CO., LTD. (CN)

Building 2, No.3728 Jinke Road, Zhangjiang Hi-Tech Park, Shanghai, 201203, China

2. JIANGSU HANSOH PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. (CN)

Economic and Technological Development Zone, Lianyungang, Jiangsu 222047,
P.R. China

(72) HUA, Haiqing (CN); LIU, Suxia (CN); BAO, Rudi (US).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ THỂ
TIẾP HỢP NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(21) 1-2021-08295

(57) Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp kháng thể kháng B7-H4-dược chất. Cụ thể là, sáng chế đề xuất kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng CDR của kháng thể kháng B7-H4, và thể tiếp hợp kháng thể-dược chất của chúng hoặc muối được dụng hoặc hợp chất dung môi của nó, và thể tiếp hợp kháng thể-dược chất nêu trên của nó hoặc dược phẩm chứa muối được dụng hoặc hợp chất dung môi của nó làm thuốc chống ung thư, cụ thể là để bào chế thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn có mức biểu hiện B7-H4 cao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh dược. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp được chất-kháng thể kháng B7-H4.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Liệu pháp miễn dịch điều trị khối u là một điểm nóng có từ rất lâu trong việc nghiên cứu và phát triển ở lĩnh vực liệu pháp điều trị khối u, và liệu pháp miễn dịch điều trị khối u dựa vào tế bào T là vị trí cốt lõi. Sự xâm lấn của khối u là một trở ngại lớn đối với liệu pháp miễn dịch điều trị khối u. Hầu hết các khối u biểu hiện các kháng nguyên mà có thể được nhận diện bởi hệ miễn dịch chủ với các mức độ khác nhau. Tuy nhiên, trong một vài trường hợp, việc hoạt hóa không hiệu quả các tế bào T hiệu ứng gây ra đáp ứng miễn dịch không đủ, và do đó các tế bào khối u thúc đẩy sự phát triển khối u nhờ các tác dụng ức chế của chúng đến hệ miễn dịch. Liệu pháp miễn dịch điều trị khối u là nhằm sử dụng triệt để và huy động các tế bào T giết và/hoặc các tế bào miễn dịch khác ở các bệnh nhân mang khối u để tiêu diệt khối u.

Nghiên cứu trên thụ thể CD28 và các phối tử của chúng đã xác định được các phân tử được gọi là siêu họ B7. Các thành viên của họ B7 là một nhóm các globulin miễn dịch với các miền V giống globulin miễn dịch (IgV) và các miền C giống globulin miễn dịch (IgC). Các thành viên của họ này bao gồm các yếu tố đồng kích thích B7.1 (CD80) và B7.2 (CD86), phối tử của yếu tố đồng kích thích dễ cảm ứng (ICOS-L/B7-H2), phối tử gây chết theo chương trình 1 (PD-L1/B7-H1), phối tử gây chết theo chương trình 2 (PD-L2/B7-DC), B7-H3 và B7-H4, và phân tử tương tự.

B7-H4 người là một protein xuyên màng typ I gồm có 282 axit amin. Gen mã hóa của nó nằm trong vùng p11.1 của nhiễm sắc thể 1 (Choi IH et al., J Immunol. 2003 Nov 1; 171(9): 4650-4). B7-H4 có tác dụng điều hòa âm tính trên đáp ứng miễn dịch của các tế bào T. B7-H4 đóng vai trò ức chế rộng trong quá trình biệt hóa và phát triển, sự tiến triển của chu kỳ tế bào và sự tổng hợp xytokin của các tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ (Sica GL et al., Immunity. 2003 Jun; 18(6): 849-61). Không phát hiện thấy các rối loạn tế bào miễn dịch hoặc hiện tượng tự miễn nào ở chuột được bất hoạt B7-H4 (Zhu G et al., Blood. 2009 Feb

19; 113(8): 1759-67; Suh WK et al., Blood. Mol Cell Biol. 2006 Sep; 26(17): 6403-11). Hiện nay, thụ thể B7-H4 và con đường dẫn truyền tín hiệu của nó là vẫn chưa rõ ràng.

Các nghiên cứu gần đây đã phát hiện ra rằng protein B7-H4 được biểu hiện nhiều ở nhiều mô khối u, cho phép tế bào khối u tránh khỏi sự tấn công của hệ miễn dịch của cơ thể. Việc coi phân tử B7-H4 làm đích của liệu pháp điều trị khối u tạo ra phương pháp mới cho liệu pháp miễn dịch điều trị khối u.

Hiện đã phát hiện thấy rằng B7-H4 người được biểu hiện trên các tế bào ung thư như ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi, ung thư cổ tử cung, ung thư thận, ung thư bàng quang, và ung thư gan. Sự biểu hiện của mRNA B7-H4 được phát hiện thấy ở lá lách, phổi, tuyến ức, gan, cơ xương, thận, tuyến tụy, tinh hoàn và buồng trứng. Ở cấp độ protein, phát hiện thấy sự biểu hiện của B7-H4 ở mức thấp trong các mô như vú (ống dẫn và tiểu thùy), biểu mô ống dẫn trứng, và tuyến nội mạc. Các nghiên cứu có liên quan cũng đã chỉ ra rằng B7-H4 được biểu hiện quá mức ở các đại thực bào có liên quan đến khối u (TAM) (Kryczek, I. et al., J. Exp. Med. 2006, 203(4): 871-881), và đại thực bào là một thành phần quan trọng của vi môi trường khối u và có thể chiếm đến 50% khối lượng khối u.

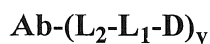
Một chiến lược để điều trị bệnh ung thư là sử dụng các kháng thể làm các chất mang để đưa các phân tử gây độc tế bào vào các tế bào ung thư, và sau đó tiêu diệt các tế bào ung thư bằng các phân tử nhỏ đã tách ra. Thuốc được sử dụng trong chiến lược này được gọi là các thể tiếp hợp kháng thể-dược chất. Adcetris và Kadcyla là các thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hiện được bán trên thị trường. Hiện nay, nhiều công ty dược đa quốc gia đang phát triển các kháng thể đơn dòng chống lại B7-H4 và/hoặc các thể tiếp hợp dược chất của chúng để cải thiện đáp ứng hệ miễn dịch riêng của bệnh nhân với các khối u và đạt được mục đích tiêu diệt trực tiếp các tế bào khối u. Các patent có liên quan là công bố đơn quốc tế số WO2013025779, patent Mỹ số US20140322129 và patent tương tự chẳng hạn. Các kháng thể đơn dòng kháng B7-H4 của Medimmune, FivePrime và các công ty khác hiện vẫn đang được phát triển tiền lâm sàng; thể tiếp hợp dược chất-kháng thể kháng B7-H4 của Genentech cũng đang trong giai đoạn phát triển tiền lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất thể tiếp hợp kháng thể kháng B7-H4-dược chất, có ái lực cao, độ chọn lọc cao, hiệu quả nhập bào cao, hoạt tính chống ung thư cao, độ ổn định cao, độ an toàn cao và các tác dụng phụ và gây độc thấp, đạt được nhờ các giải pháp kỹ

thuật sau:

Thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng,



(A)

trong đó:

D được chất gây độc tế bào;

L₁ và L₂ là các đơn vị liên kết;

y là số nằm trong khoảng từ 1 đến 20;

Ab là kháng thể B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể;

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm ít nhất một HCDR như được thể hiện trong trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5,

SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm ít nhất một LCDR như được thể hiện trong trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14.

Theo một phương án của sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể cũng có thể bao gồm ít nhất một HCDR như được thể hiện trong trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5,

SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11,

SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25,

SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, hoặc,

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể cũng có thể bao gồm ít nhất một HCDR như được thể hiện trong trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm ít nhất một LCDR như được thể hiện trong trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14,
SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28,
SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm:

HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:3, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:4 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:5;

hoặc,

HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:9, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:10 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:11.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm:

HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:23, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:24 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25;

hoặc,

HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:30 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm:

HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:43, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:44 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25;

hoặc,

HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:45 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó

vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể của Ab bao gồm các CDR của vùng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các mục từ (1) đến (4) sau đây:

(1) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:3, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:4 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:5;

(2) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:9, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:10 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:11;

(3) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:23, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:24 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25; hoặc,

(4) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:30 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31.

Vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể của Ab cũng có thể bao gồm các CDR được chọn từ nhóm bao gồm mục (5) đến (6) sau đây:

(5) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:43, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:44 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25;

hoặc,

(6) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:45 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm:

LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO:8, tương ứng;

hoặc LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 và SEQ ID NO:14, tương ứng.

Theo một vài phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm:

LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 và SEQ ID NO:28, tương ứng;

hoặc LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:32, SEQ ID

NO:33 và SEQ ID NO:34, tương ứng.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể của Ab bao gồm các CDR của vùng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các mục (1) đến (4) sau:

(1) LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:6, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:7 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:8;

(2) LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:12, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:13 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:14;

(3) LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:26, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:27 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:28; hoặc,

(4) LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:32, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:33 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:34.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm:

(1) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:3, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:4 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:5, tương ứng; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:6, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:7 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:8; hoặc,

(2) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:9, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:10 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:11, tương ứng; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:12, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:13 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:14.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm:

(3) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:23, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:24 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:26, LCDR2 như được thể hiện trong

SEQ ID NO:27 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:28; hoặc,

(4) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:30 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:32, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:33 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:34.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm:

(5) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:43, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:44 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25, tương ứng; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:26, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:27 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:28; hoặc,

(6) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:45 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31, tương ứng; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:32, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:33 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:34.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể của Ab bao gồm các CDR của vùng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các mục (1) đến (4) sau:

(1) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:3, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:4 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:5; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:6, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:7 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:8;

(2) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:9, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:10 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:11; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:12, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:13 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:14;

(3) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:23, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:24 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:26, LCDR2 như được thể hiện trong

SEQ ID NO:27 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:28; hoặc,

(4) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:30 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:32, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:33 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:34.

Vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể của Ab cũng có thể bao gồm các CDR được chọn từ nhóm bao gồm mục (5) hoặc (6) sau:

(5) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:43, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:44 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:25; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:26, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:27 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:28;

(6) HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:29, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:45 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:31; và

LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:32, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:33 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:34.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó Ab là kháng thể chuột hoặc một đoạn của nó, kháng thể khảm hoặc một đoạn của nó, kháng thể người hoặc một đoạn của nó, và kháng thể được làm tương thích với người hoặc một đoạn của nó.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab còn bao gồm các trình tự vùng khung chuỗi nhẹ và vùng khung chuỗi nặng, lần lượt có nguồn gốc từ các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng dòng mầm của người hoặc (các) trình tự đột biến của chúng;

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab còn bao gồm (các) vùng cố định chuỗi nặng, trong đó (các) vùng cố định chuỗi nặng bao gồm các vùng có nguồn gốc từ IgG1 của người hoặc biến thể của nó, IgG2 hoặc biến thể của nó, IgG3 hoặc biến thể của nó hoặc IgG4 hoặc biến thể của nó, tốt hơn là các vùng này có nguồn gốc từ IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người, tốt hơn nữa là vùng cố định chuỗi nặng IgG1 có khả năng gây độc ADCC được tăng cường sau khi gây đột biến axit amin, tốt

nhất là vùng cố định chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 54;

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ chuỗi κ , chuỗi λ của người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là có nguồn gốc từ chuỗi κ của người, tốt hơn nữa là vùng cố định chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO:55.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có các trình tự sau: SEQ ID NO:16 hoặc SEQ ID NO:18.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có các trình tự sau: SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, hoặc các vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có các trình tự sau: SEQ ID NO:15 hoặc SEQ ID NO:17.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có các trình tự sau: SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, hoặc các các vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của Ab là vùng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm vùng sau:

(1) vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16;

(2) vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của Ab là vùng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm vùng sau:

(1) vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16;

(2) vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18;

(3) vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 36; hoặc,

(4) vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 37 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 38.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm chuỗi nhẹ có các trình tự sau: SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm chuỗi nhẹ có các trình tự sau: SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, hoặc chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ với ít nhất 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm chuỗi nặng có các trình tự sau: SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm chuỗi nặng có các trình tự sau: SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, hoặc chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ với ít nhất 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức

chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm:

(1) chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 20 và chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 19; hoặc,

(2) chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 22 và chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 21.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, Ab bao gồm:

(1) chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 20 và chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 19; hoặc,

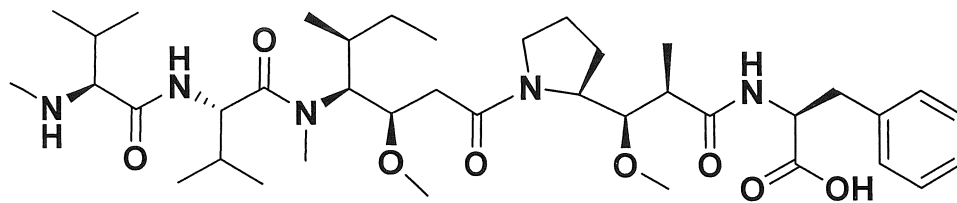
(2) chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 22 và chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 21; hoặc,

(3) chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 40 và chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 39; hoặc,

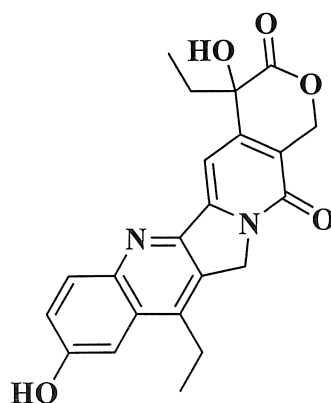
(4) chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 42 và chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 41.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, đoạn gắn kết với kháng nguyên của kháng thể kháng B7-H4 được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V được dime hóa (diabody), vùng V được làm ổn định liên kết disulfua (dsFv) và các đoạn gắn kết với kháng nguyên của peptit chứa các CDR.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, dược chất gây độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm độc tố, chất hóa trị liệu, kháng thể, đồng vị phóng xạ và enzym phân giải nhân; tốt hơn là chất ức chế tubulin hoặc chất ức chế ADN topoisomeraza mà ức chế sự phân chia tế bào; tốt hơn là DM1, DM3, DM4, SN-38, MMAF hoặc MMAE; tốt hơn nữa là chất ức chế tubulin SN-38, MMAE hoặc MMAF. Trong đó, cấu trúc của MMAF và SN-38 như được thể hiện trong công thức sau:

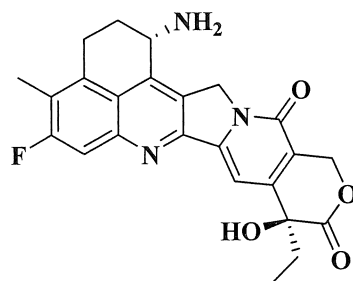


MMAF

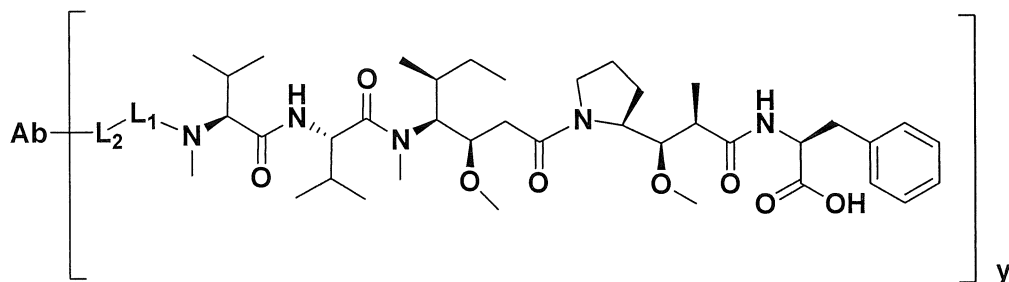


SN-38

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, dược chất gây độc tế bào được chọn từ các dẫn xuất camptothecin, tốt hơn là Exatecan,



Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, mà là hợp chất có công thức chung (I) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng,



(I)

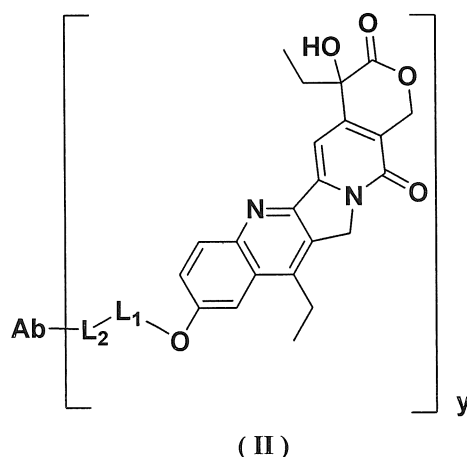
trong đó:

L_1 và L_2 là các đơn vị liên kết;

y là một số được chọn từ 1 đến 8, tốt hơn là số được chọn từ 2 đến 4;

Ab là kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, mà là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (II) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng:



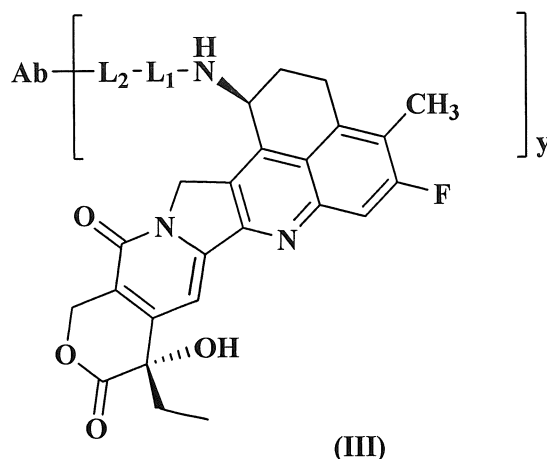
trong đó:

L_1 và L_2 là các đơn vị liên kết;

y là một số được chọn từ 1 đến 8, tốt hơn là số được chọn từ 2 đến 4;

Ab là kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, mà là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (III) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng,



trong đó:

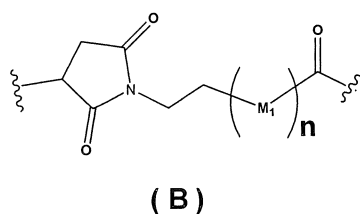
L_1 và L_2 là các đơn vị liên kết;

y là một số được chọn từ 1 đến 10, tốt hơn là một số được chọn từ 2 đến 8, tốt hơn nữa là một số được chọn từ 4 đến 8;

hoặc, y tốt hơn là một số được chọn từ 2 đến 10, tốt hơn nữa là một số được chọn từ 6 đến 10, tốt hơn nữa là một số nằm trong khoảng từ 7 đến 9, và tốt nhất là một số nguyên bằng 7, 8, 9;

Ab là kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, L_1 là như được thể hiện trong công thức chung (B) sau:



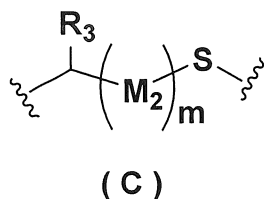
trong đó:

M_1 là $-CR_1R_2-$;

R_1 và R_2 là giống hoặc khác nhau, và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, halogen, hydroxyl và amino;

N là một số nguyên từ 0 đến 5, tốt hơn là 1, 2 hoặc 3.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, L_2 là như được thể hiện trong công thức (C) chung sau:



trong đó:

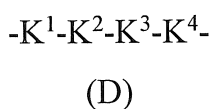
M_2 là $-CR_4R_5-$;

R_3 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, hydroxyl, amino, alkyl, alkoxy và xycloalkyl;

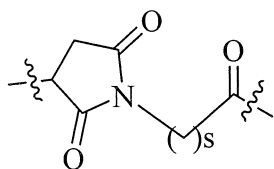
R_4 và R_5 là giống hoặc khác nhau, và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, halogen, hydroxyl và amino;

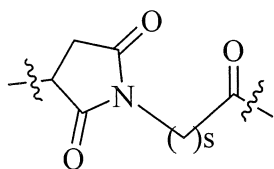
m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 5, tốt hơn là 1, 2 hoặc 3.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, L_2 là như được thể hiện trong công thức (D) chung sau:



trong đó:



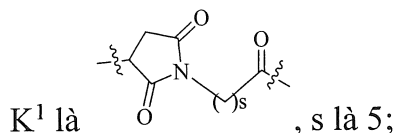
K^1 là , s là một số nguyên từ 2 đến 8, tốt hơn nữa là một số nguyên nằm trong khoảng từ 4 đến 8, tốt hơn nữa là một số nguyên nằm trong khoảng từ 4 đến 6;

K^2 là $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$, $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$, $-S(CH_2)_pC(O)-$ hoặc liên kết đơn, p là một số nguyên từ 1 đến 20, tốt hơn là từ 1 đến 6;

R_1 là được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đoteri, hydroxyl, amino, alkyl, halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl;

K^3 là gốc tetrapeptit, tốt hơn là, gốc tetrapeptit là gốc peptit được tạo thành bởi các axit amin được chọn từ nhóm bao gồm hai hoặc nhiều trong số phenylalanin, glyxin, valin, lysin, citrullin, serin, glutamat và aspartat; tốt hơn nữa là gốc tetrapeptit GGFG;

K^4 là $-NR^2(CR^3R^4)_t-$, mỗi R^2 , R^3 hoặc R^4 độc lập là hydro, đoteri, hydroxyl, amino, alkyl, halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl, và t là 1 hoặc 2, tốt hơn là, như đối với L_2 ,



K^2 là liên kết;

K^3 là gốc tetrapeptit GGFG;

K^4 là $-NR^2(CR^3R^4)_t-$, mỗi R^2 , R^3 hoặc R^4 độc lập là hydro, đoteri, hydroxyl, amino, C_{1-6} alkyl, halogen, C_{1-6} haloalkyl, C_{1-6} alkyl được đoteri hóa và C_{1-6} hydroxyalkyl, và t là 1 hoặc 2.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, đầu K^1 của đơn vị liên kết $-L_2-$ được liên kết với Ab, và đầu K^4 được liên kết với L_1 .

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, L_1 là $-O-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$, $-O-CR^5R^6-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^5R^6-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$ hoặc $-S-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$;

Mỗi R^a và R^b độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đoteri, halogen và alkyl;

R^5 là haloalkyl hoặc xycloalkyl;

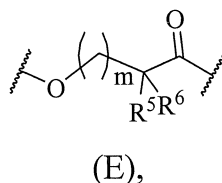
R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và xycloalkyl;

hoặc, R^5 và R^6 và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành xycloalkyl;

m là 0, 1, 2, 3 hoặc 4.

Tốt hơn là, nguyên tử cuối cùng O của L_1 được liên kết với đơn vị liên kết L_2 .

Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, L_1 là như được thể hiện trong công thức chung (E) sau:



R^5 là haloalkyl hoặc xycloalkyl,

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và xycloalkyl,

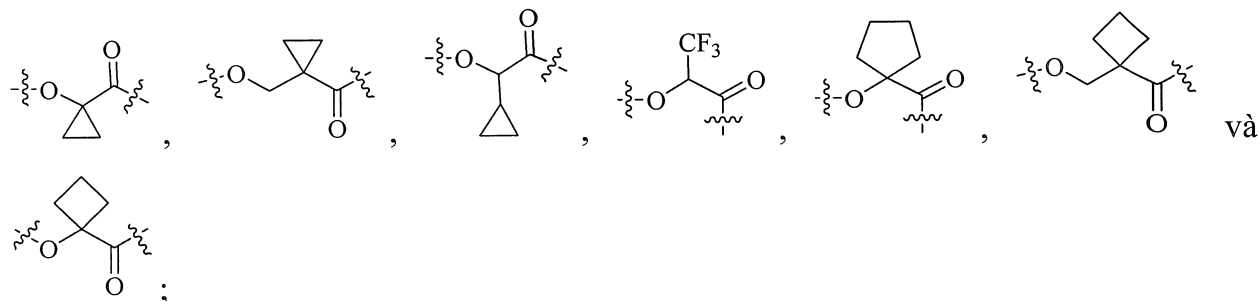
hoặc, R^5 và R^6 và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành xycloalkyl;

tốt hơn là,

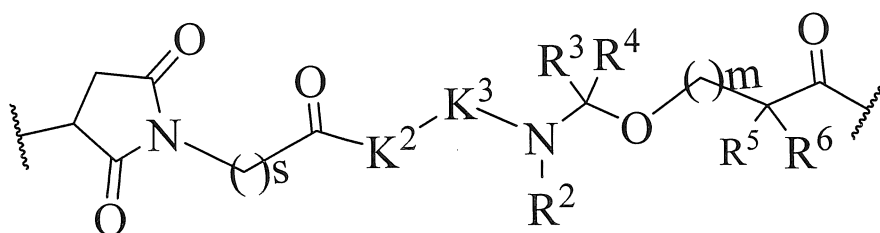
R^5 được chọn từ nhóm bao gồm C_{1-6} haloalkyl và C_{3-6} xycloalkyl,

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C_{1-6} haloalkyl và xycloalkyl, hoặc, R^5 và R^6 và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành C_{3-6} xycloalkyl; m là một số nguyên từ 0 đến 4;

tốt hơn nữa, công thức chung (E) được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm thể sau:



Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dựng của chúng như được mô tả trên đây, trong đó, $-L_2-L_1-$ là cấu trúc sau:



K^2 là liên kết;

K^3 là gốc tetrapeptit GGFG;

R^5 là haloalkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và C_{3-6} xycloalkyl;

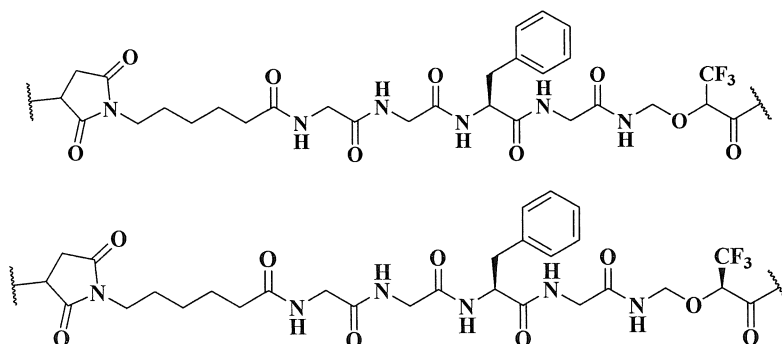
hoặc, R^5 và R^6 và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành C_{3-6} xycloalkyl;

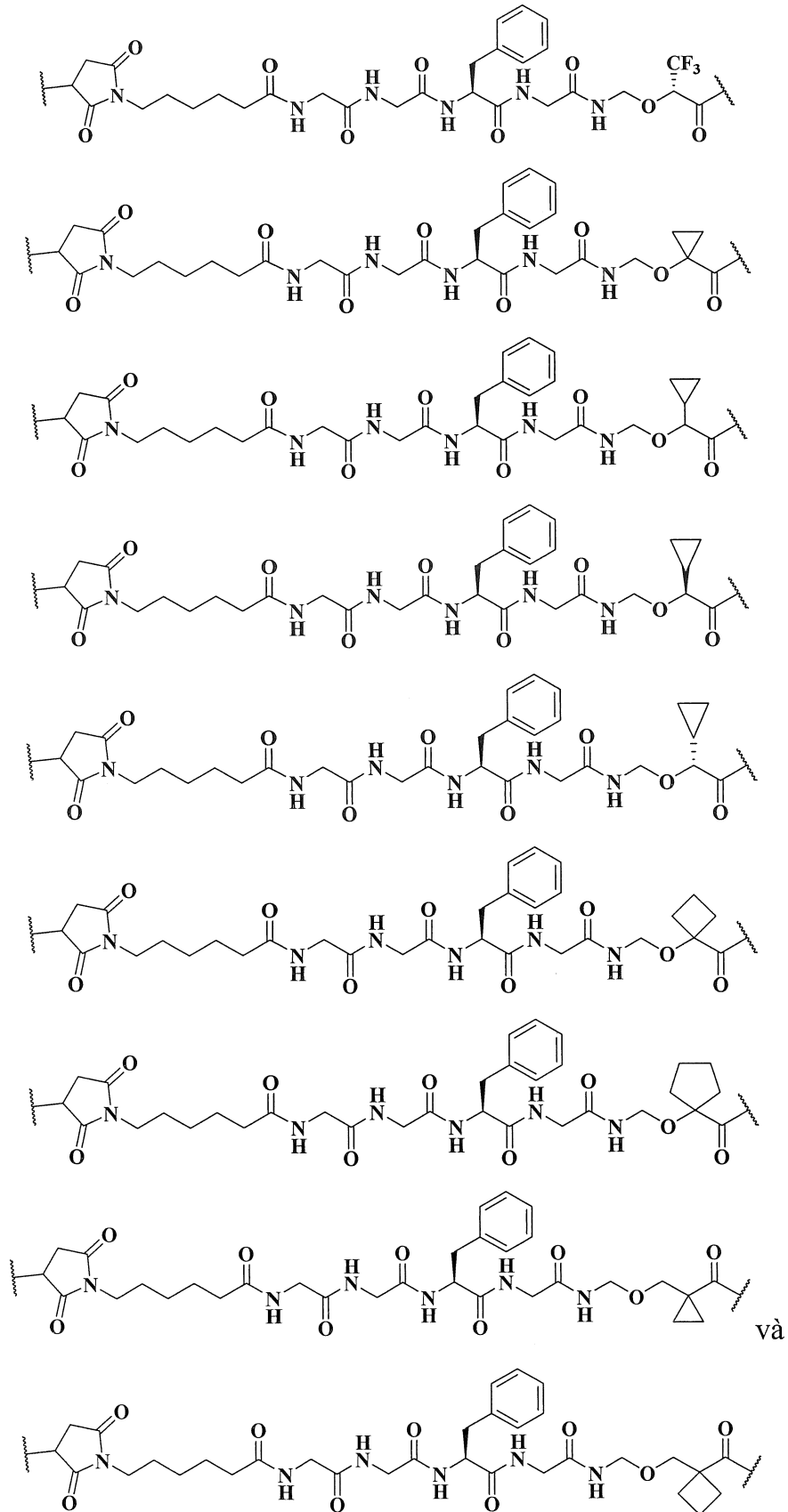
mỗi R^2 , R^3 hoặc R^4 độc lập là hydro hoặc alkyl;

s là một số nguyên từ 2 đến 8; tốt hơn là, s là 4, 5 hoặc 6;

m là một số nguyên từ 0 đến 4;

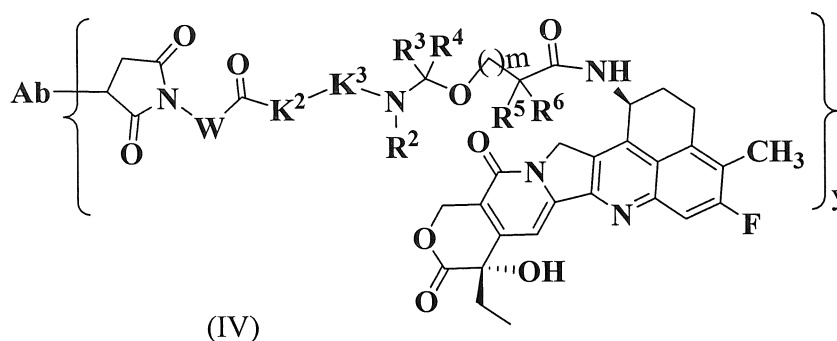
tốt hơn nữa là, $-L_2-L_1-$ được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc sau:





Theo một phương án được ưu tiên, thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, là thể tiếp hợp kháng thể-được chất

có công thức chung (IV) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng:



trong đó:

W được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₈ alkyl, C₁₋₈ alkyl-xycloalkyl hoặc heteroalkyl mạch thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử, heteroalkyl có từ 1 đến 3 dị nguyên tử được chọn từ nhóm bao gồm N, O hoặc S, trong đó mỗi C₁₋₈ alkyl, xycloalkyl hoặc heteroalkyl mạch thẳng còn độc lập tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxyl, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxyl và xycloalkyl;

K² được chọn từ nhóm bao gồm -NR¹(CH₂CH₂O)_{p₁}CH₂CH₂C(O)-, -NR¹(CH₂CH₂O)_{p₁}CH₂C(O)-, -S(CH₂)_{p₁}C(O)- hoặc liên kết, R¹ được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl, và p₁ là một số nguyên từ 1 đến 20;

K³ là gốc peptit có từ 2 đến 7 axit amin, các axit amin này có thể được thế hoặc không được thế. Nếu được thế, các nhóm thế có thể được thế ở vị trí gắn kết có sẵn bất kỳ, và các nhóm thế này là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxyl, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxyl và xycloalkyl;

R² độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl;

mỗi R³ và R⁴ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl;

R⁵ được chọn từ nhóm bao gồm halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa, xycloalkyl, heteroxyclylyclyl, aryl và heteroaryl;

R⁶ được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa, xycloalkyl, heteroxyclylyclyl, aryl và heteroaryl;

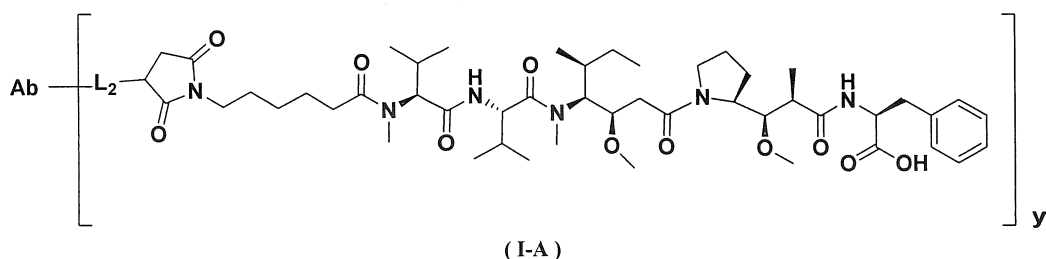
hoặc, R⁵ và R⁶ và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành xycloalkyl hoặc heteroxyclylyclyl;

m là một số nguyên từ 0 đến 4;

y là từ 1 đến 10 và y là một số thập phân hoặc một số nguyên, tốt hơn là, y là một số nằm trong khoảng từ 2 đến 10, tốt hơn nữa là y là một số nằm trong khoảng từ 4 đến 10, tốt hơn nữa là một số nằm trong khoảng từ 6 đến 9; và tốt nhất là một số nguyên bằng 7, 8 hoặc 9;

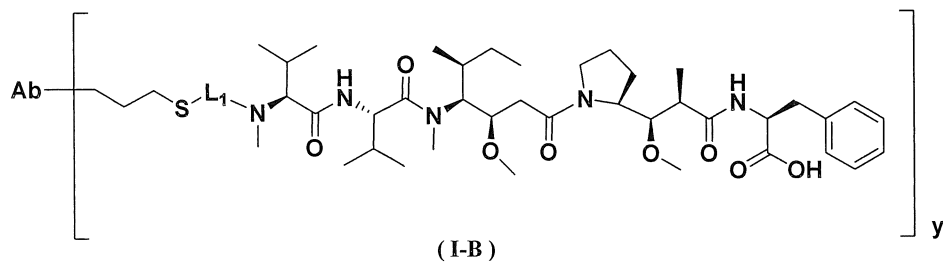
Ab là kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng như được mô tả trên đây, là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (I-A) hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng:



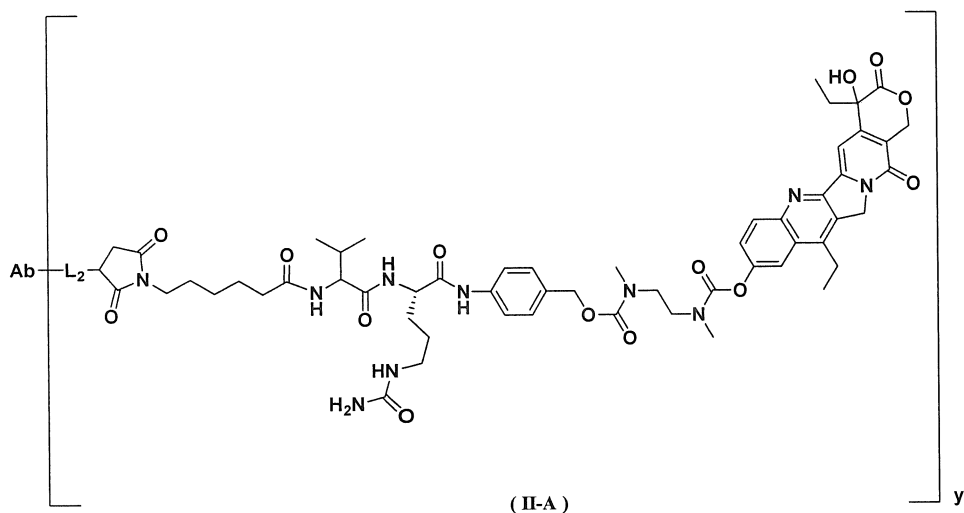
y là từ 1 đến 10, y là một số thập phân hoặc số nguyên.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng như được mô tả trên đây, là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (I-B) hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng:

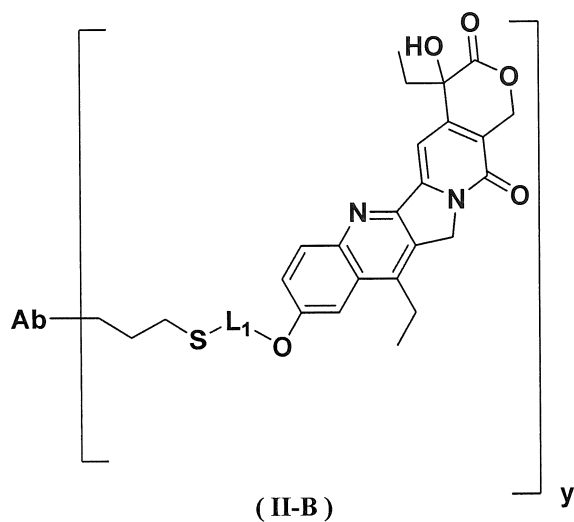


y là từ 1 đến 10, y là một số thập phân hoặc số nguyên.

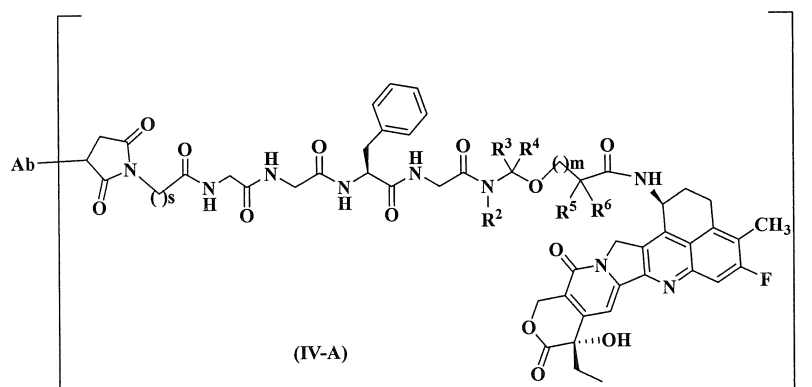
Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng như được mô tả trên đây, là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (II-A) hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng:



Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (II-B) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng:



Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (IV-A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng:

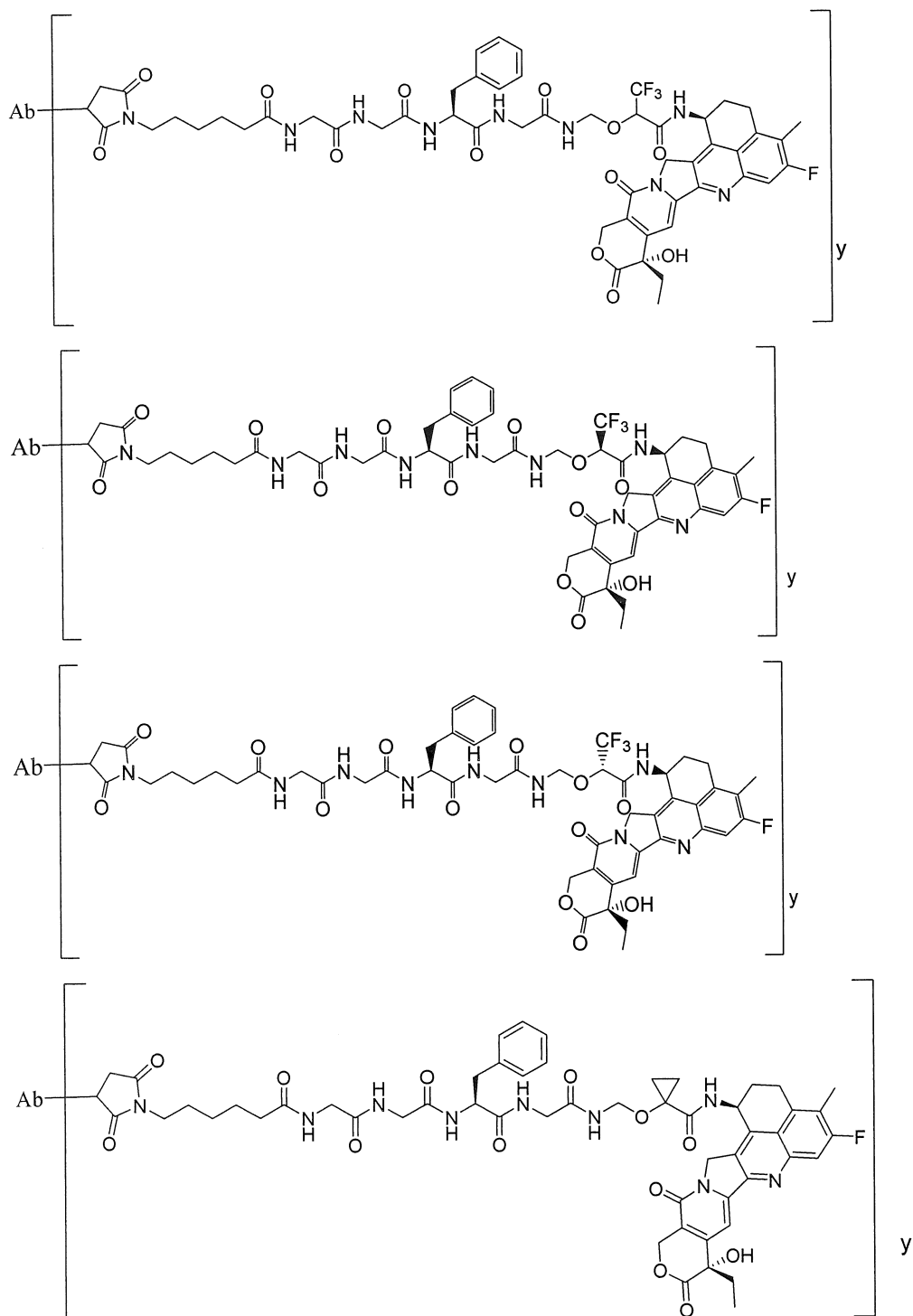


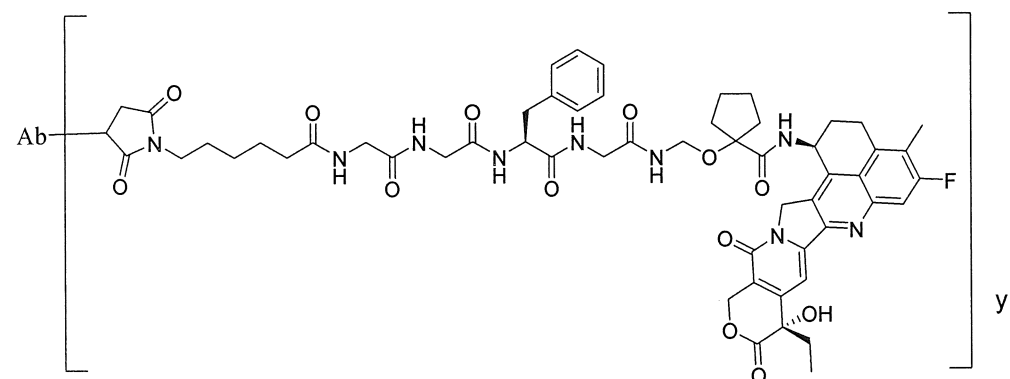
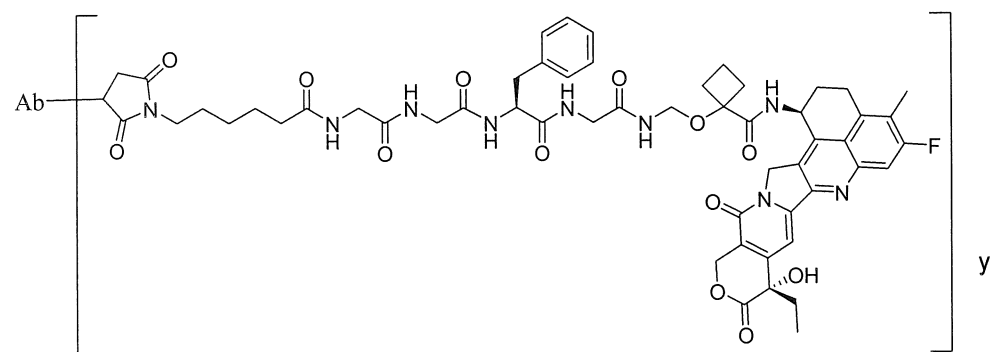
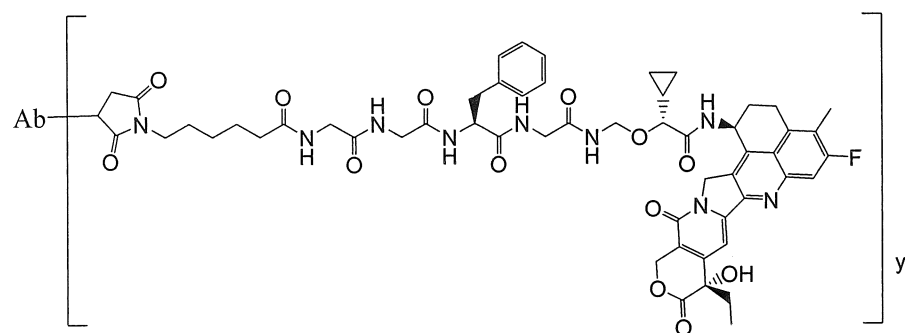
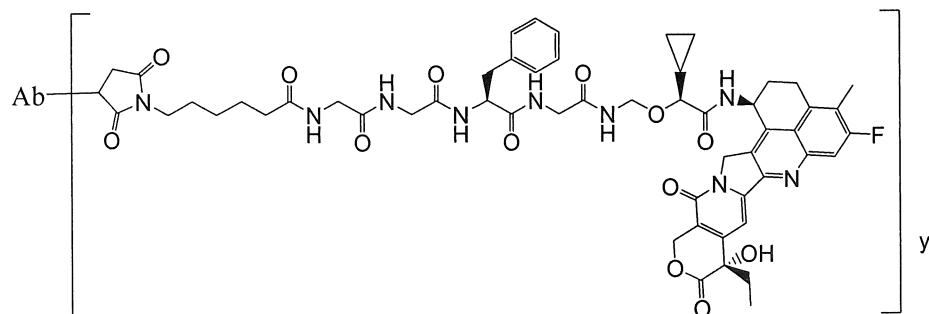
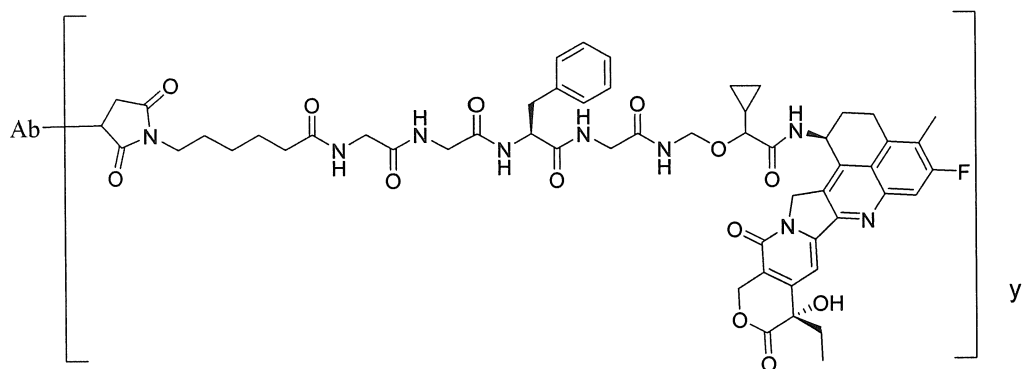
trong đó, s là một số nguyên từ 2 đến 8, R² đến R⁶, m và y là như được nêu trong công

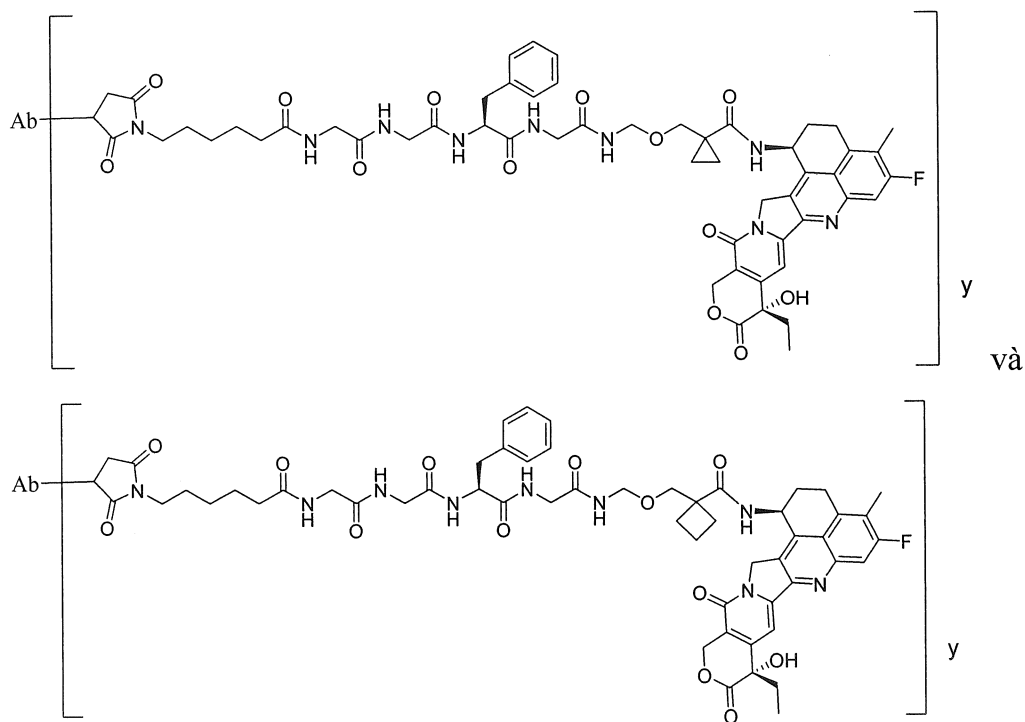
thức chung (IV) nêu trên;

tốt hơn là, s là một số nguyên bằng 4, 5 hoặc 6, y là một số nằm trong khoảng từ 4 đến 10, tốt hơn là một số nằm trong khoảng từ 6 đến 9, và tốt hơn nữa là 7 hoặc 8.

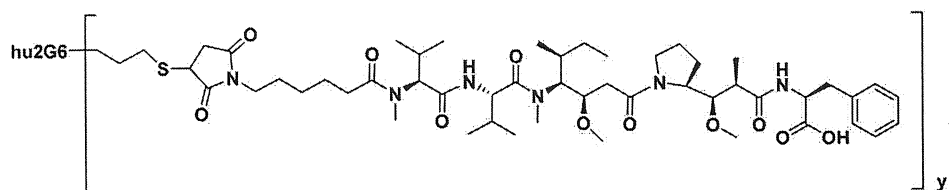
Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng như được mô tả trên đây, được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất sau:



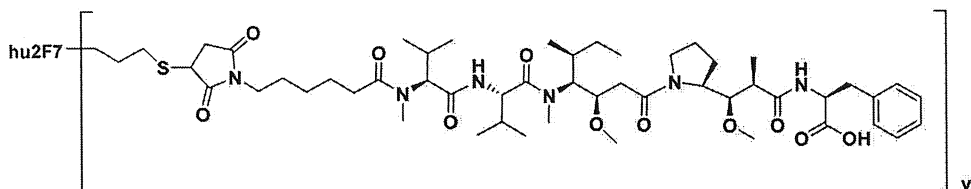




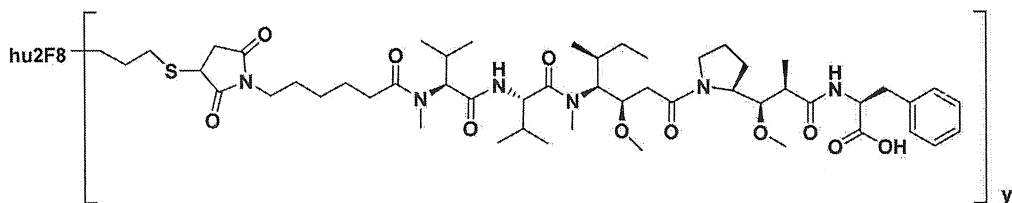
Theo phương án được ưu tiên nhất, thể tiếp hợp kháng thể-độc chất hoặc muối hoặc solvat được dùng của chúng như được mô tả trên đây, được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất sau:



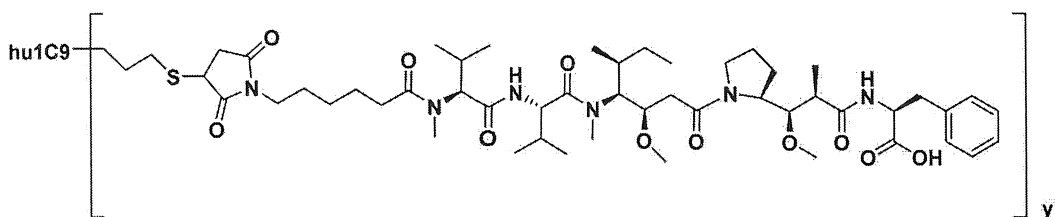
Hợp chất 1



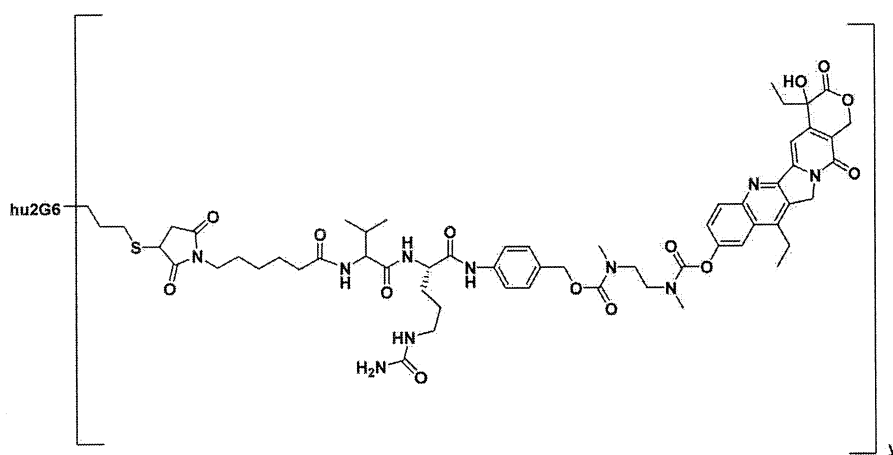
Hợp chất 2



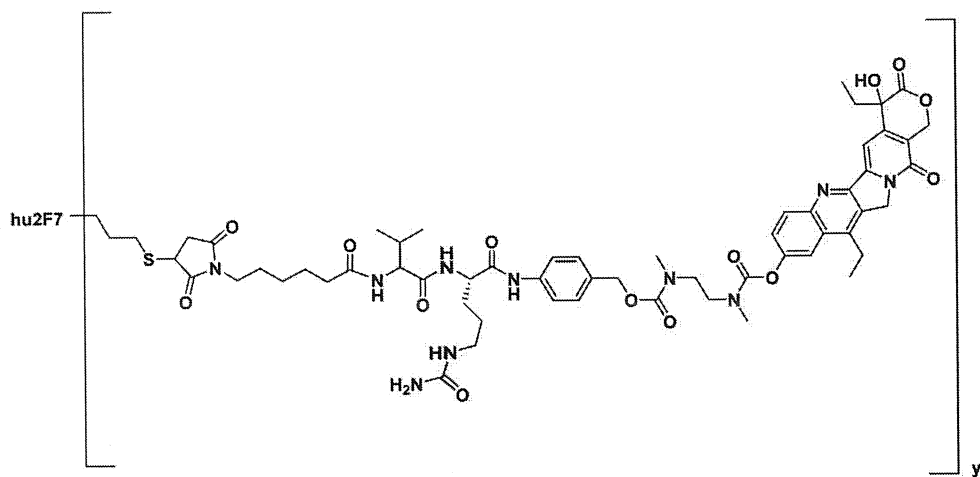
Hợp chất 3



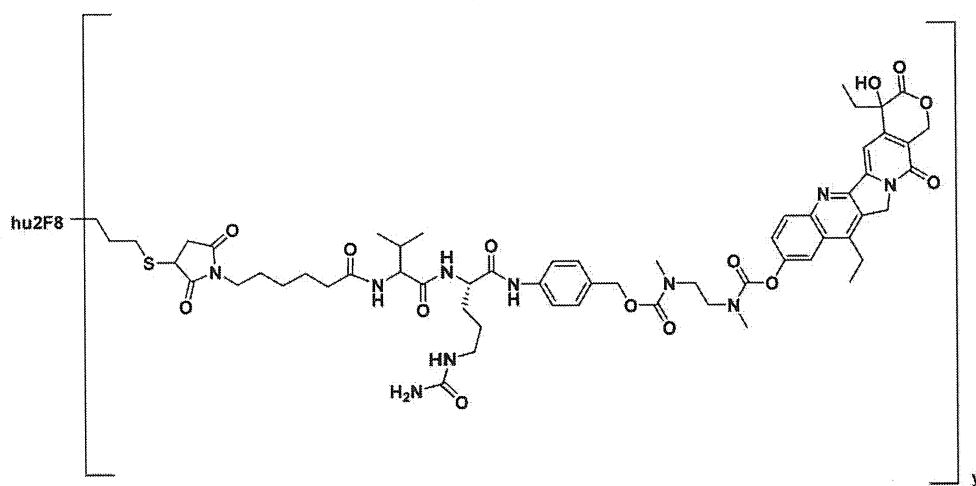
Hợp chất 4



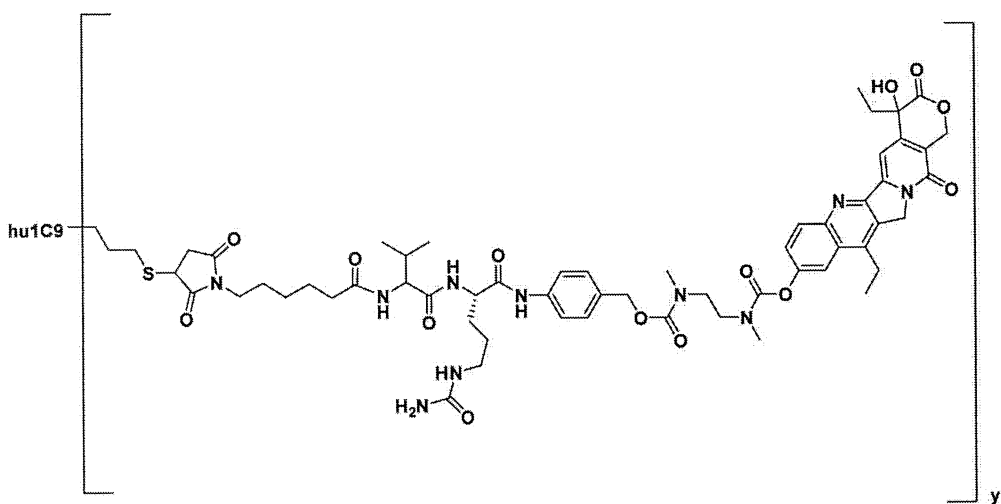
Hợp chất 5



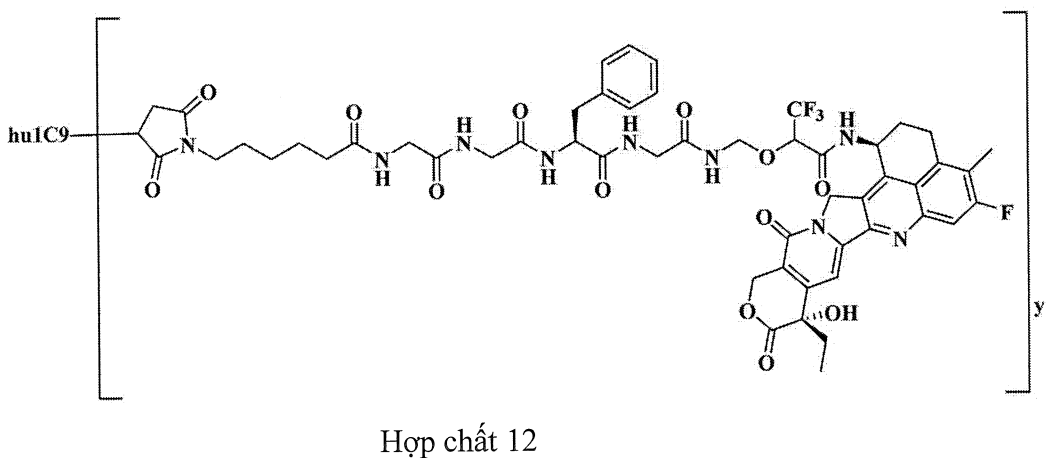
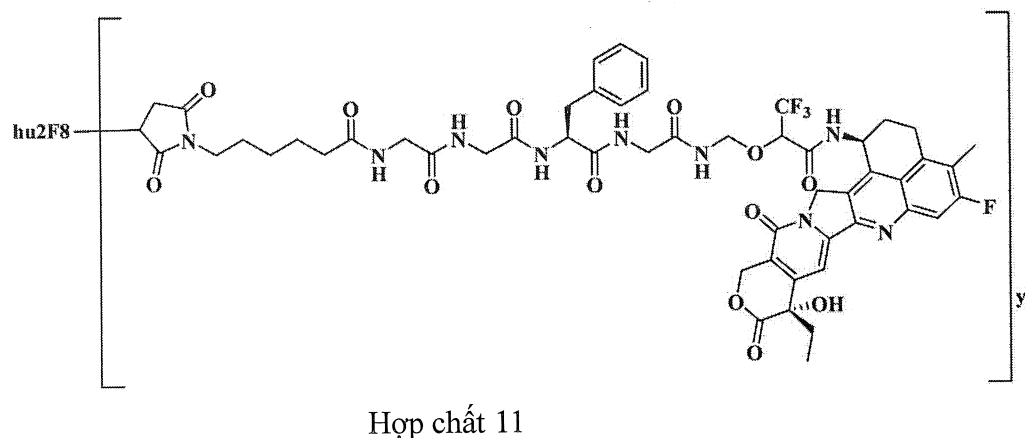
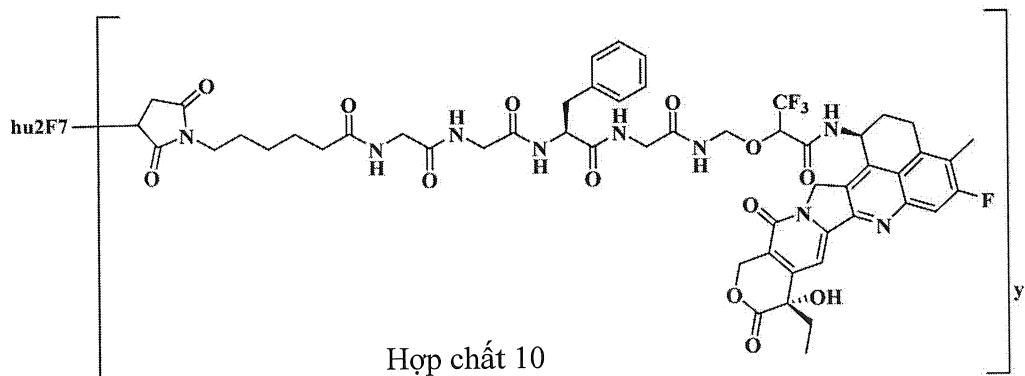
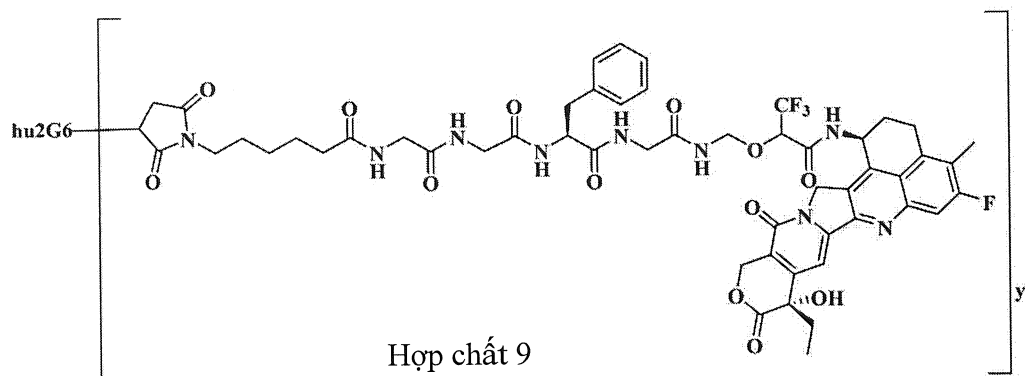
Hợp chất 6

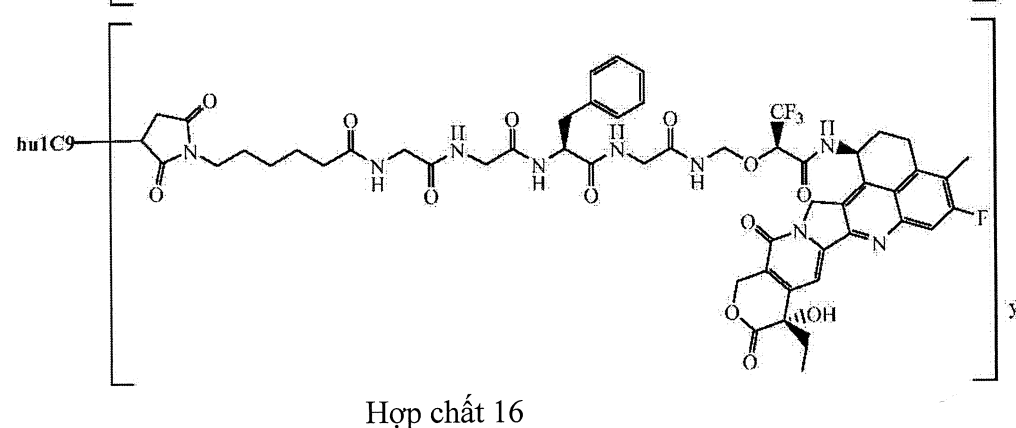
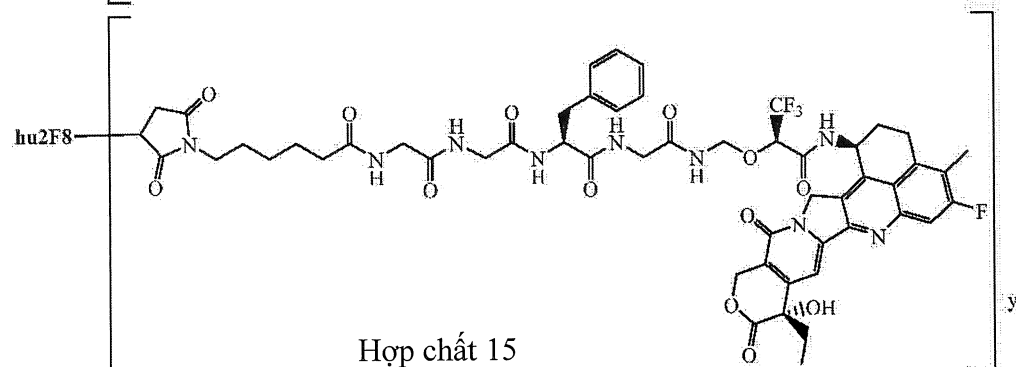
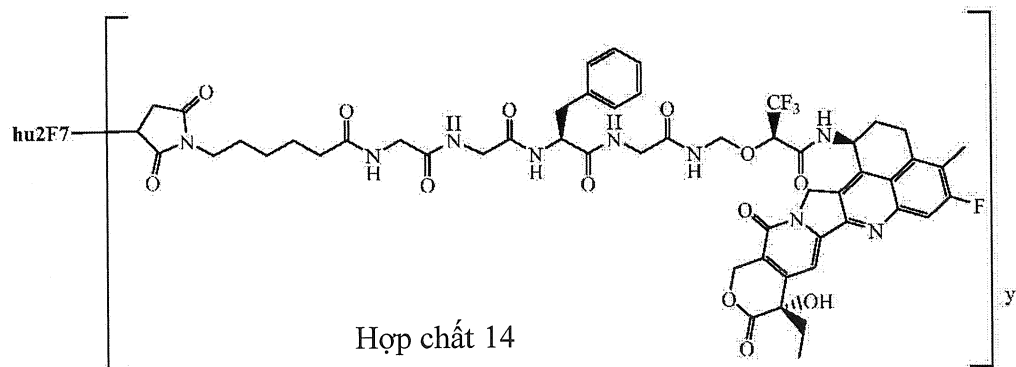
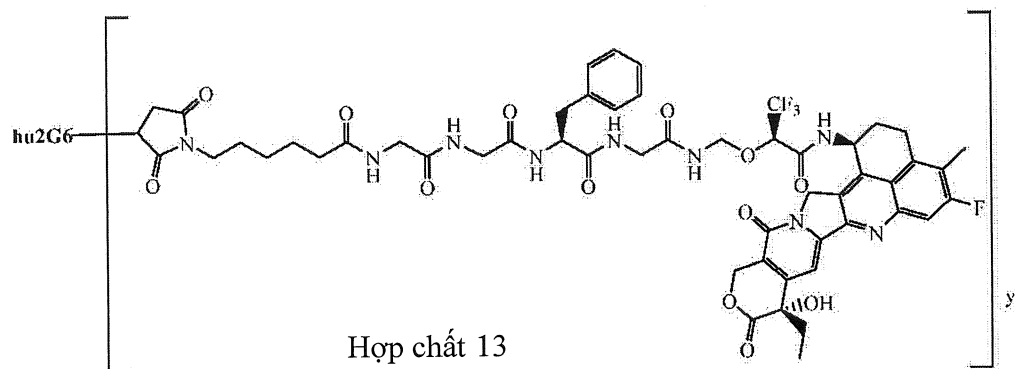


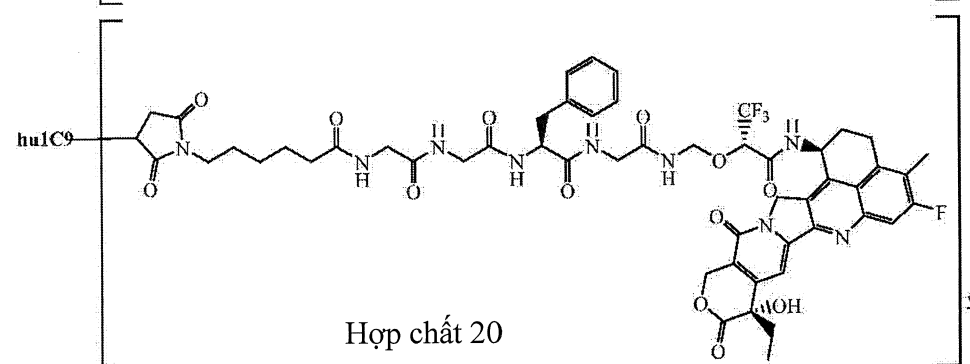
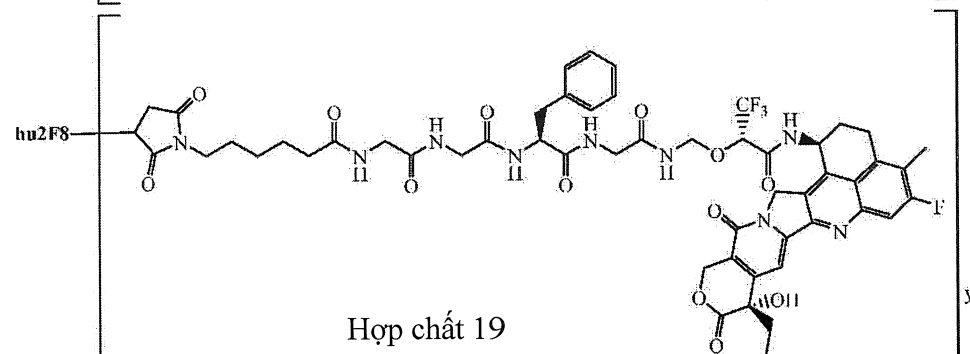
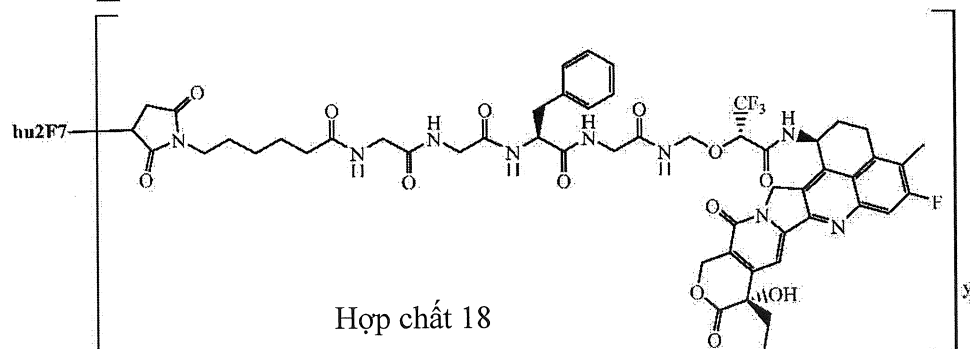
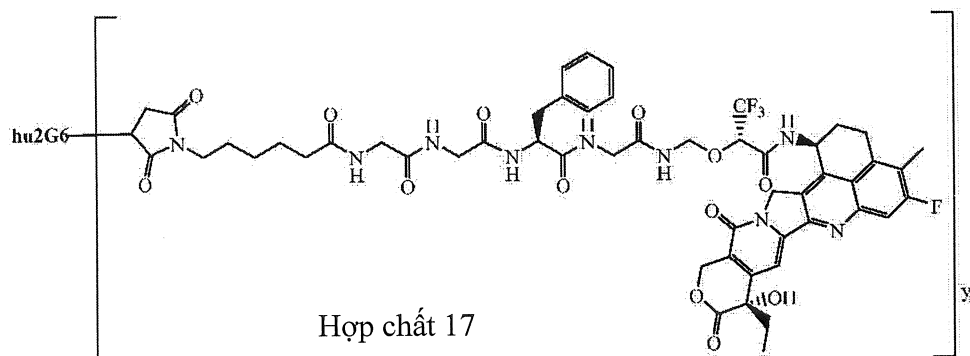
Hợp chất 7

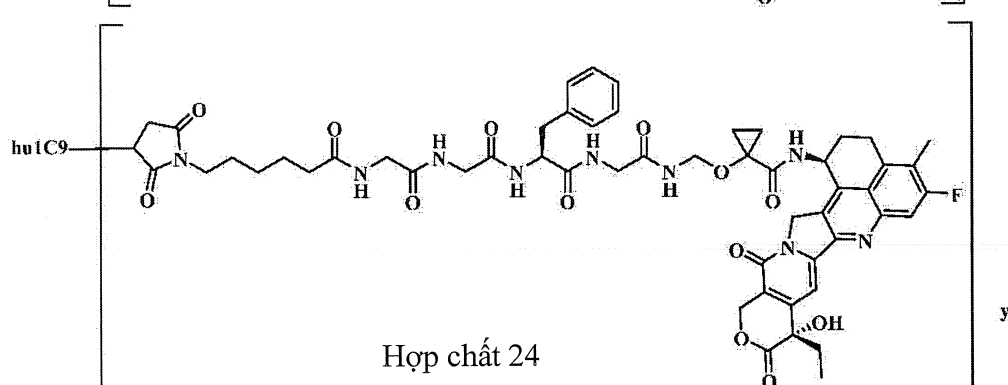
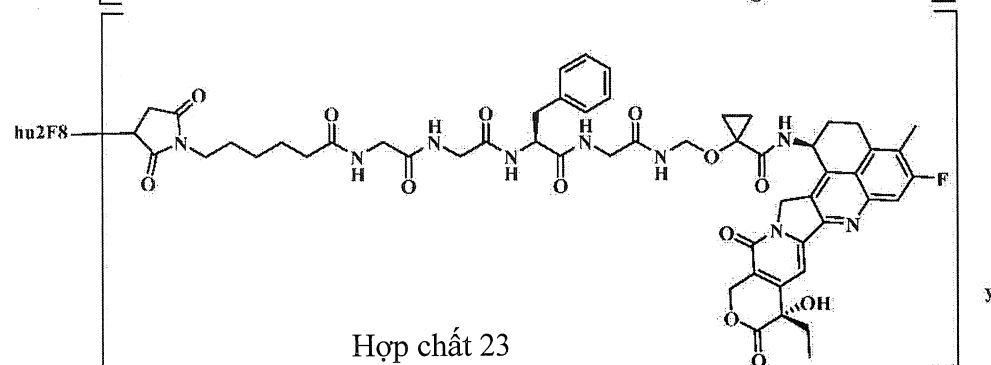
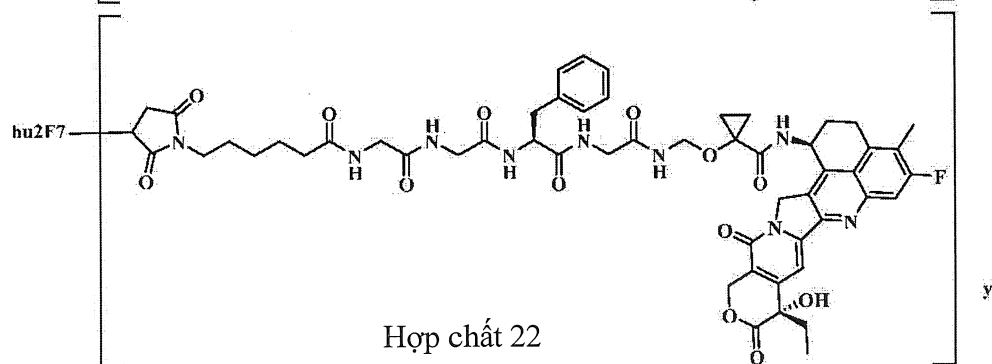
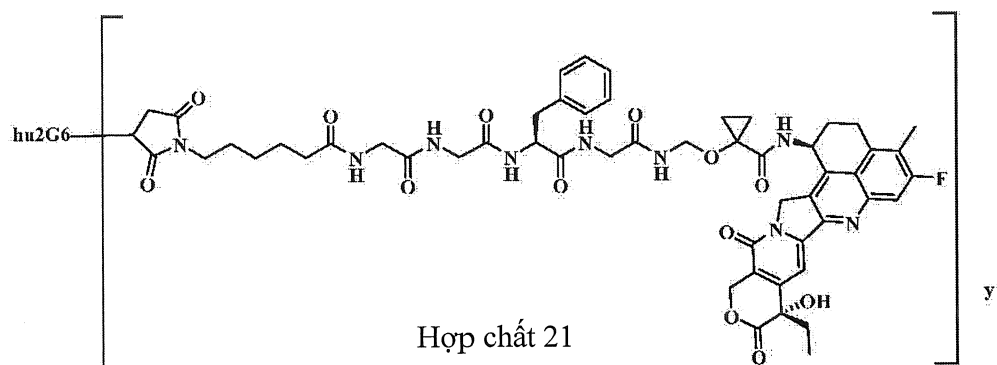


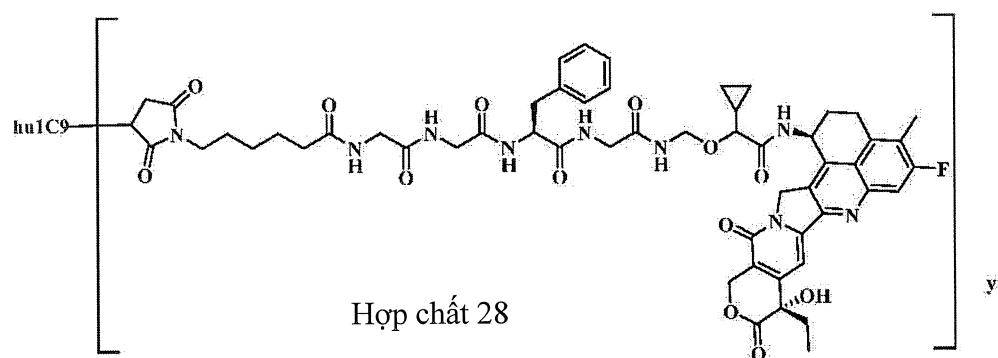
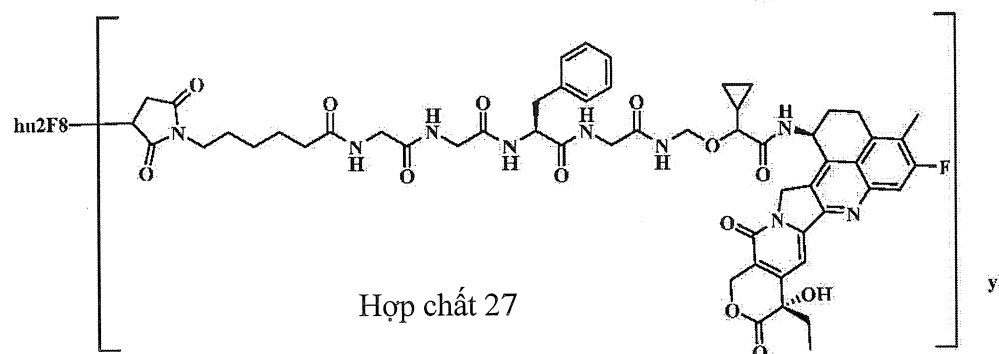
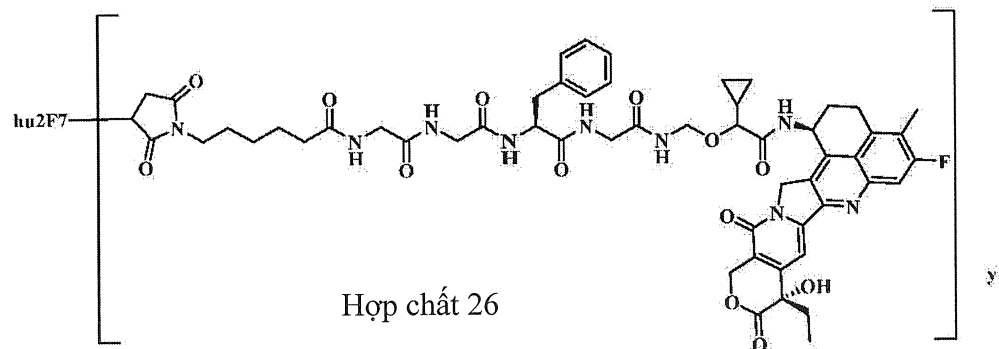
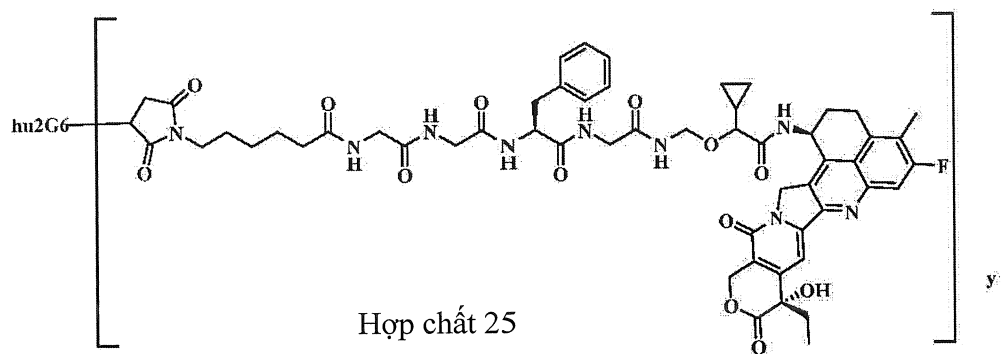
Hợp chất 8

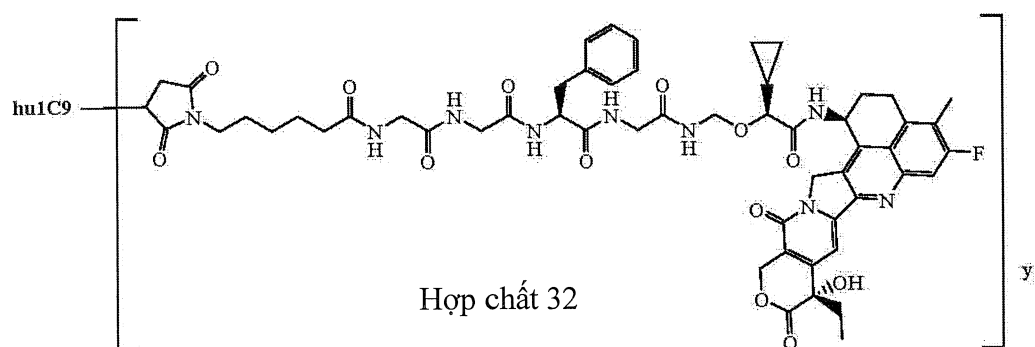
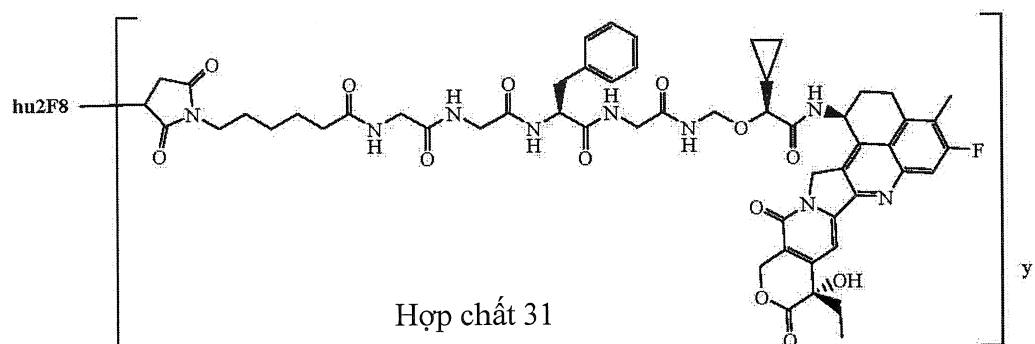
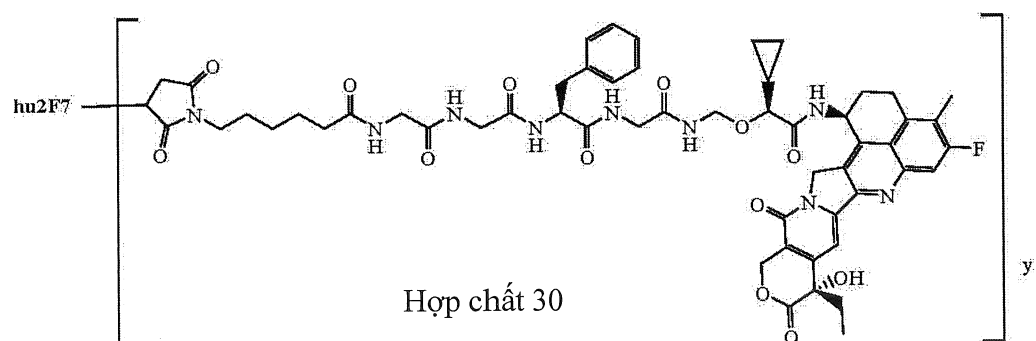
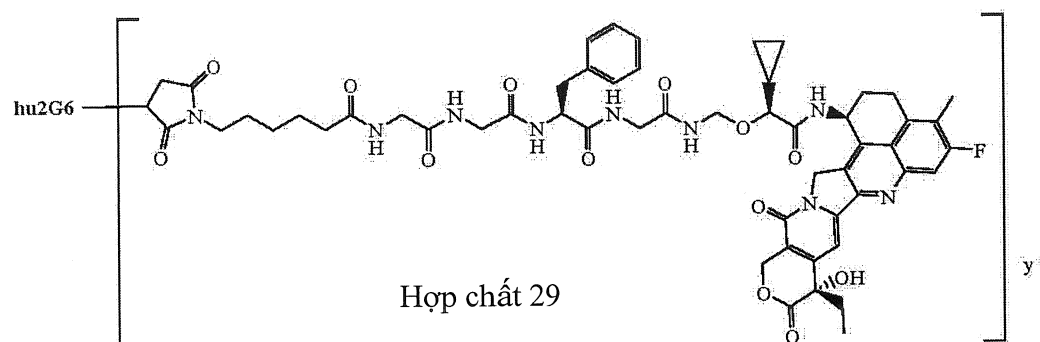


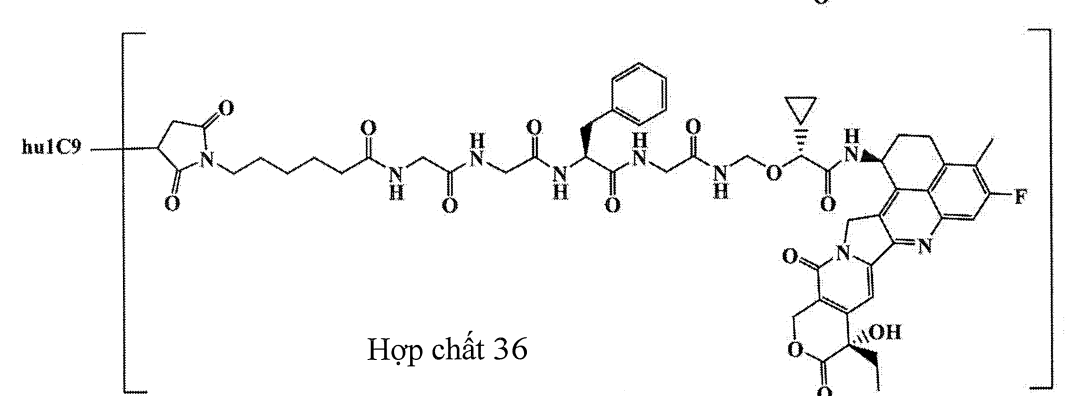
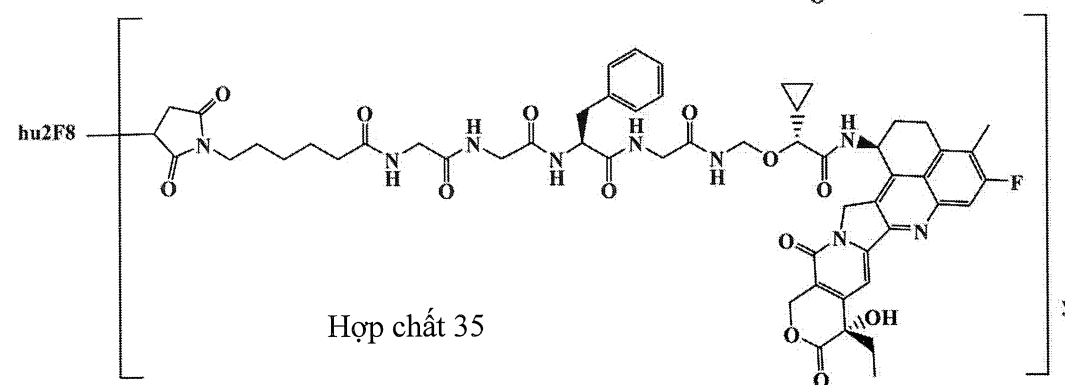
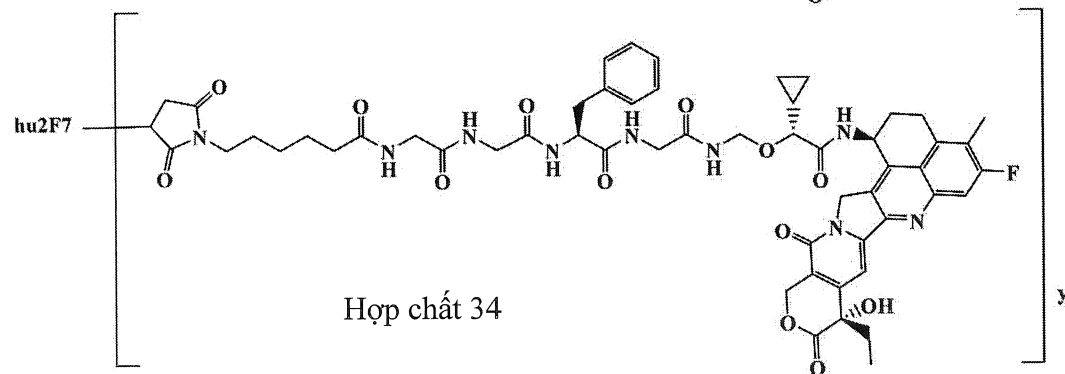
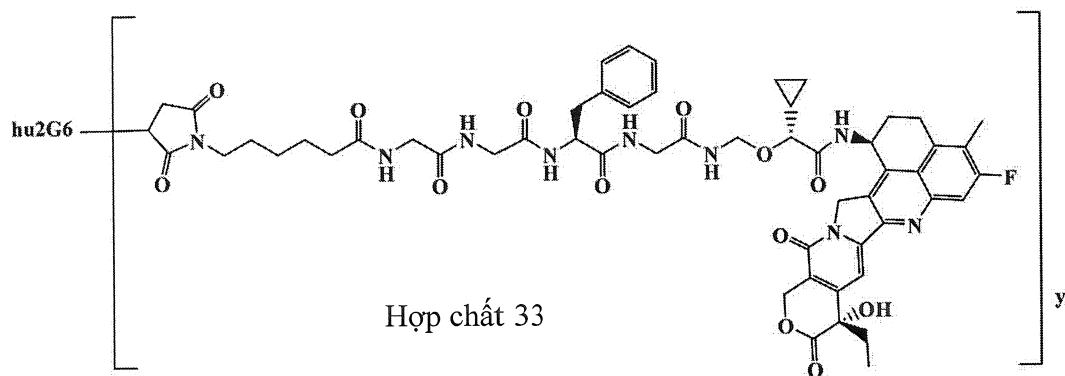


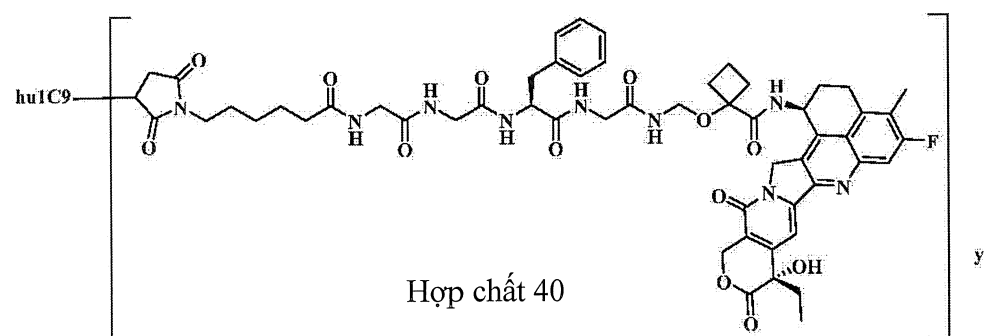
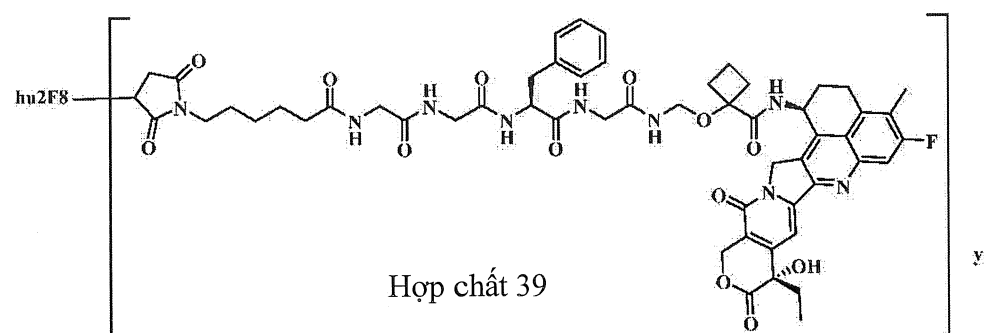
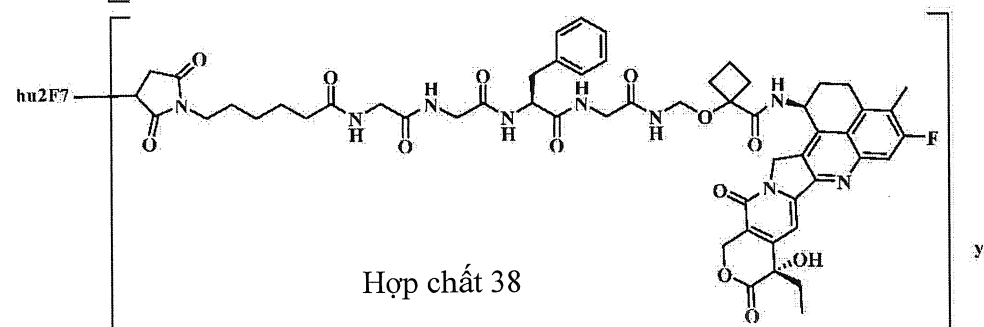
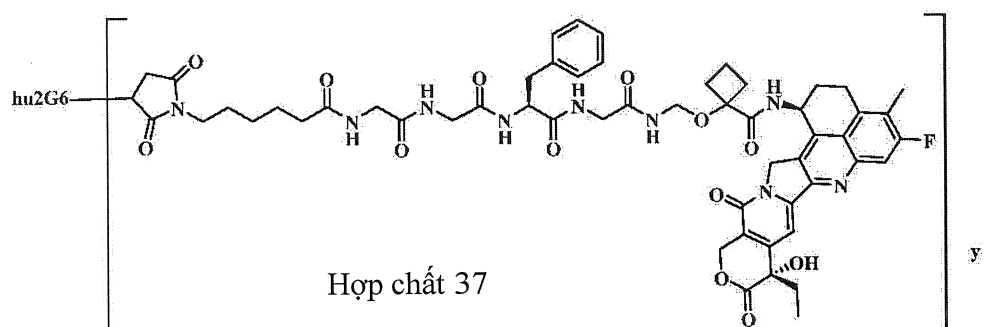


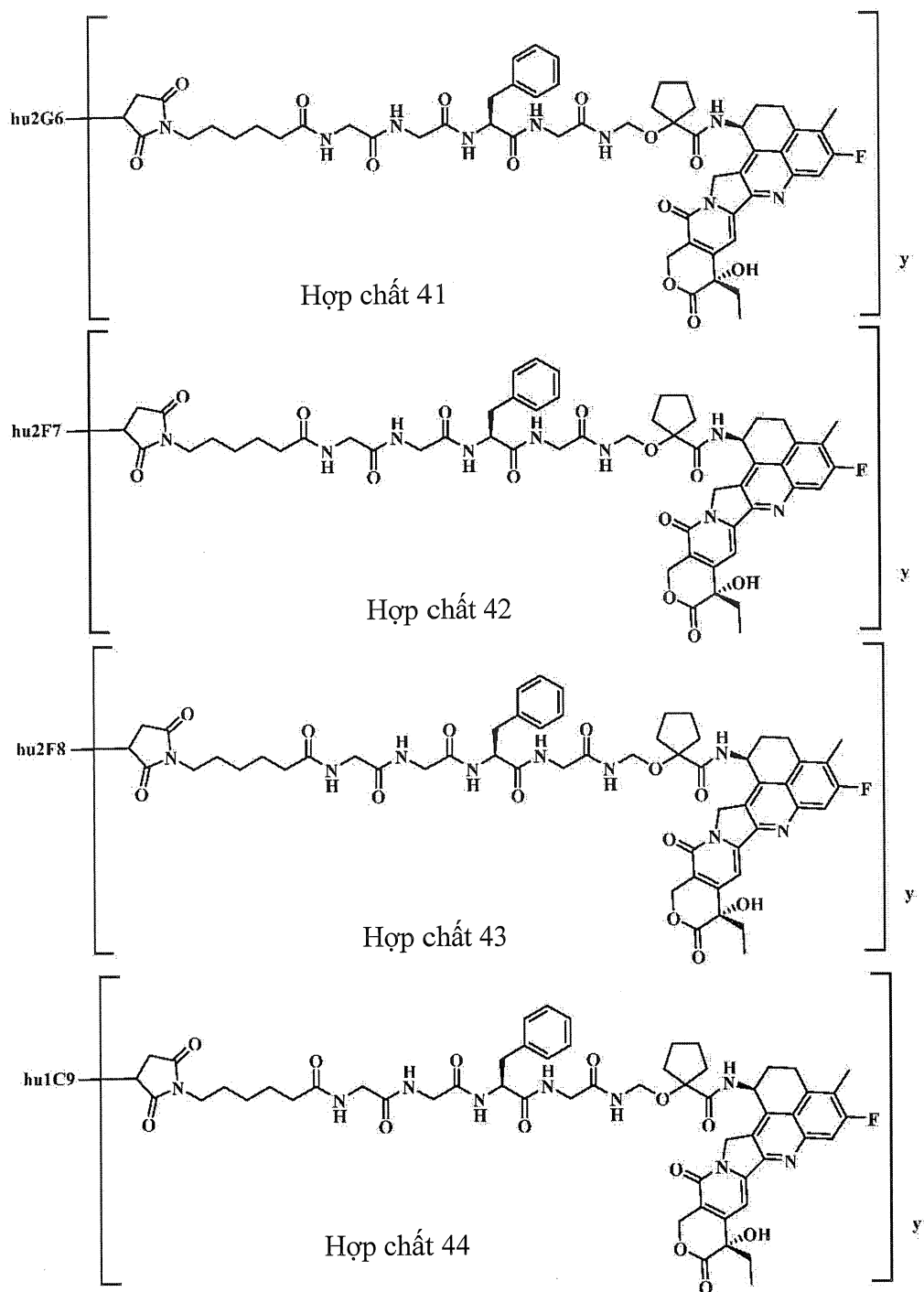


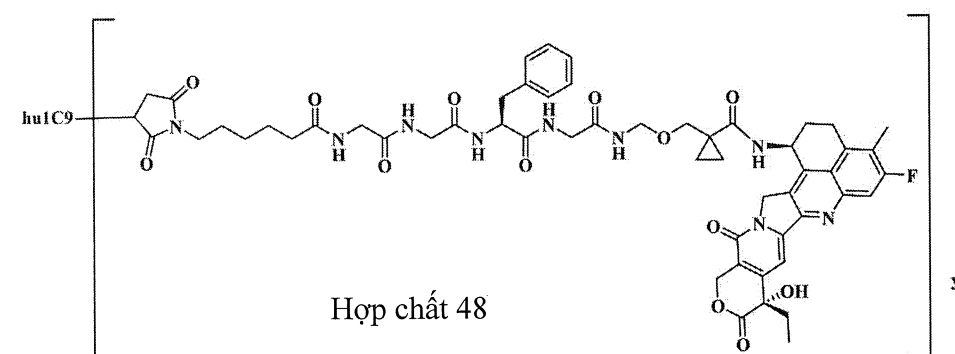
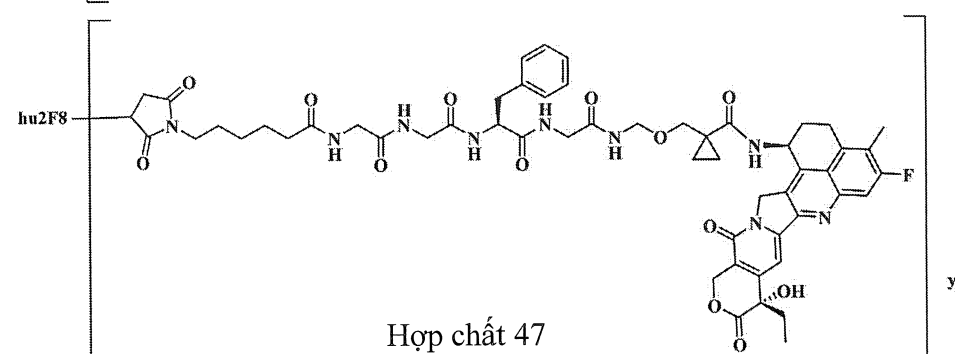
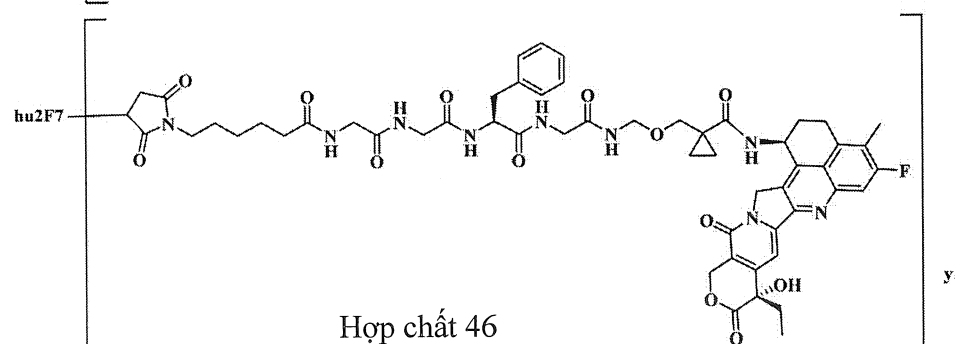
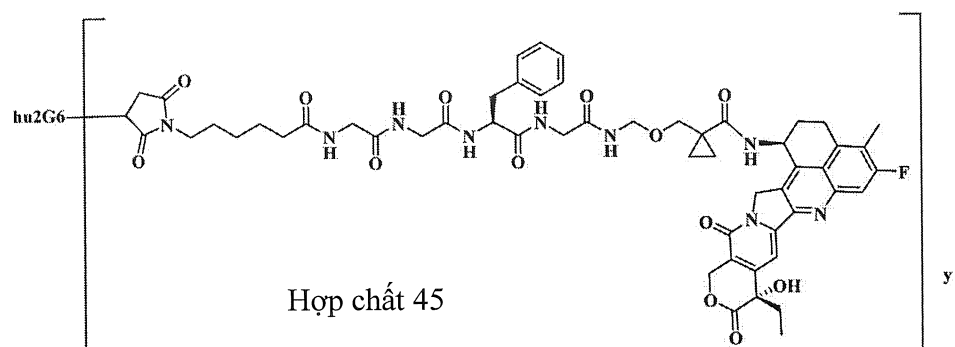


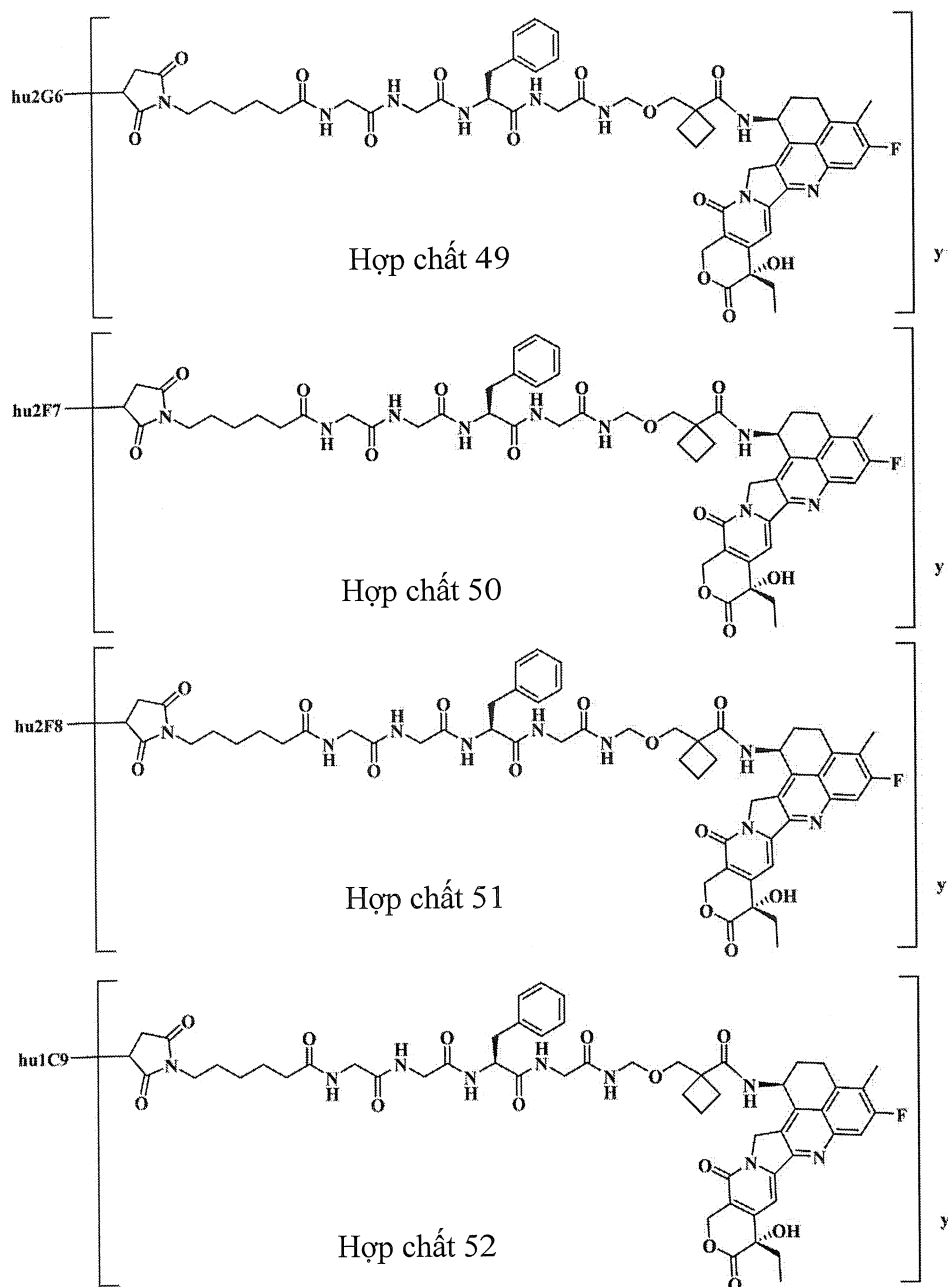


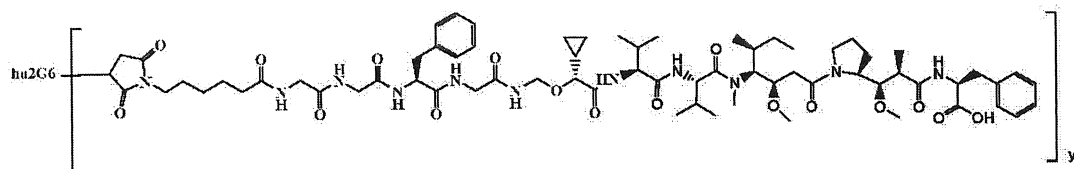




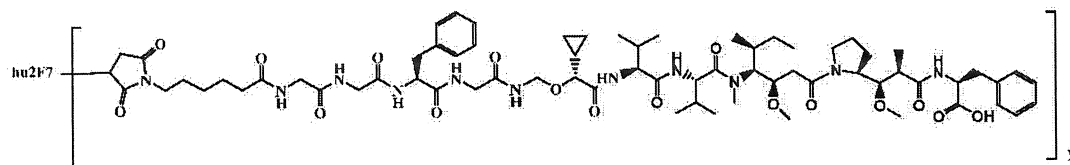




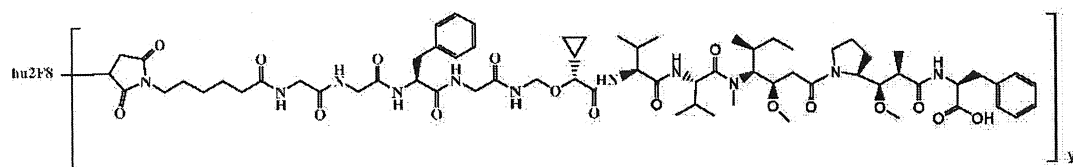




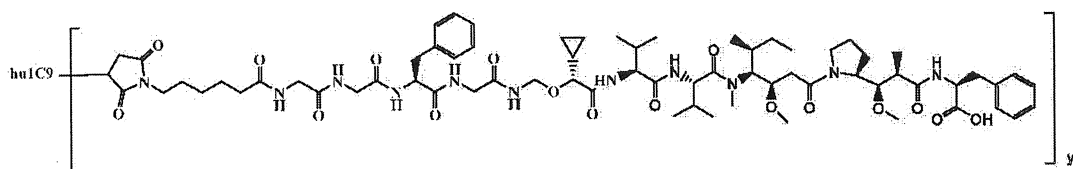
Hợp chất 53



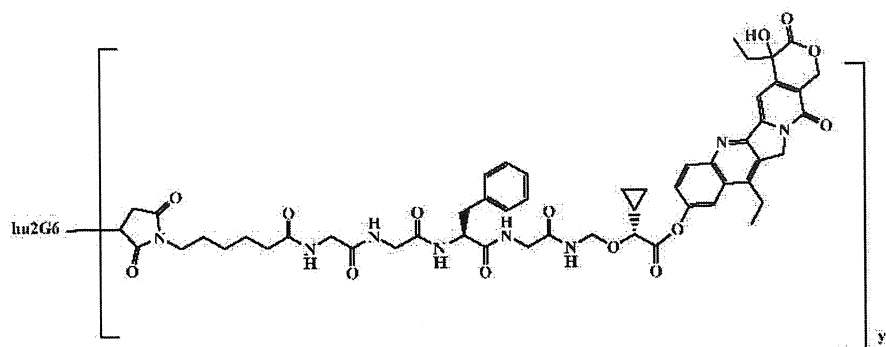
Hợp chất 54



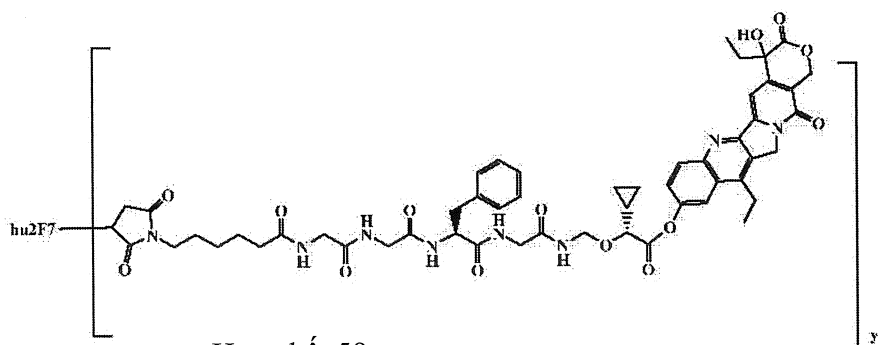
Hợp chất 55



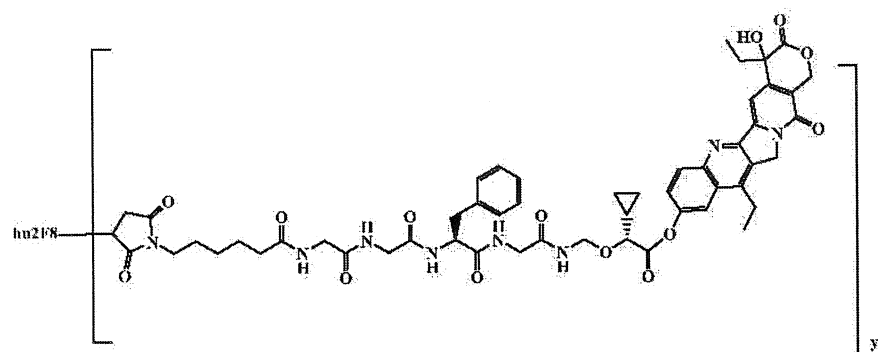
Hợp chất 56



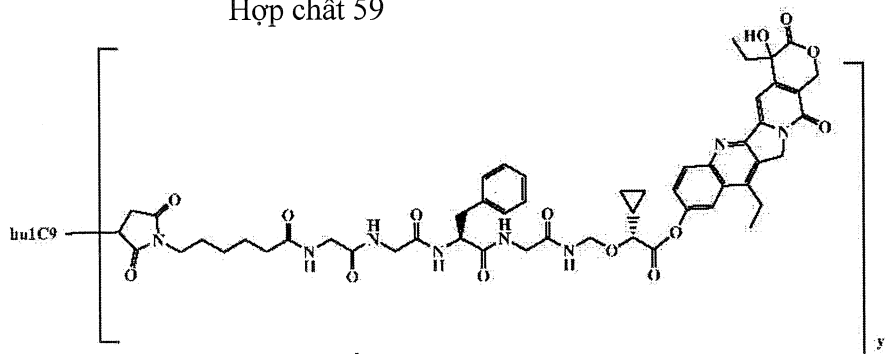
Hợp chất 57



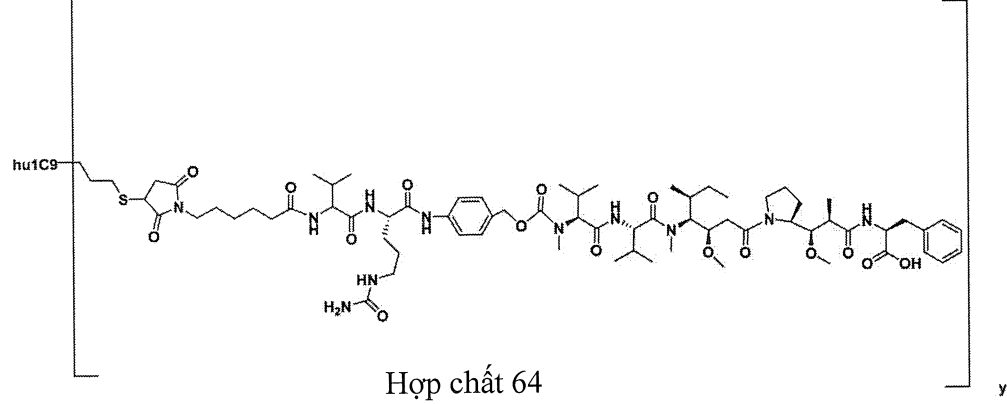
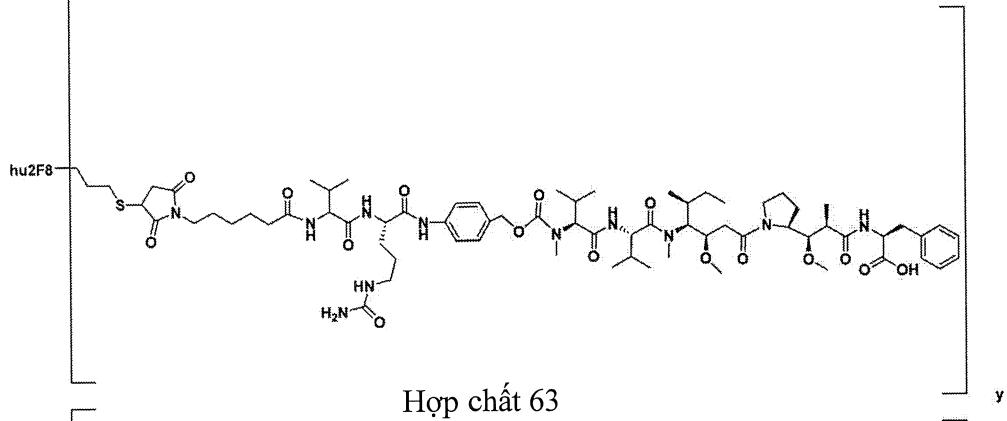
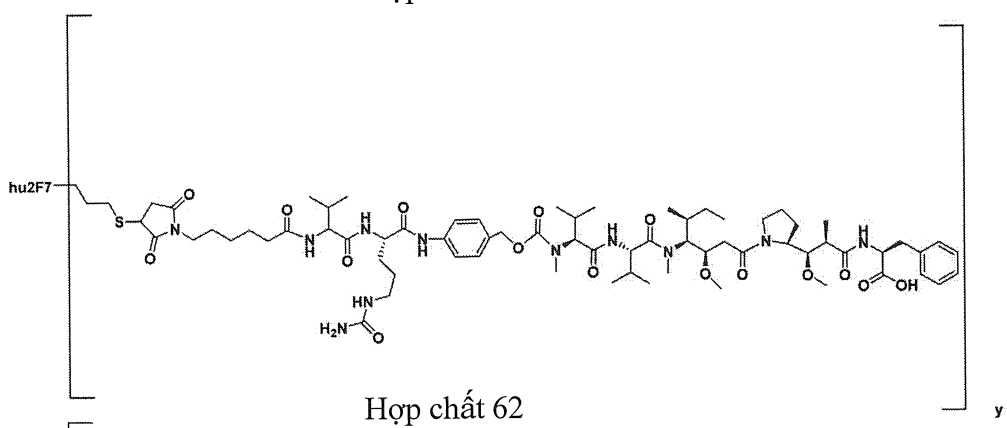
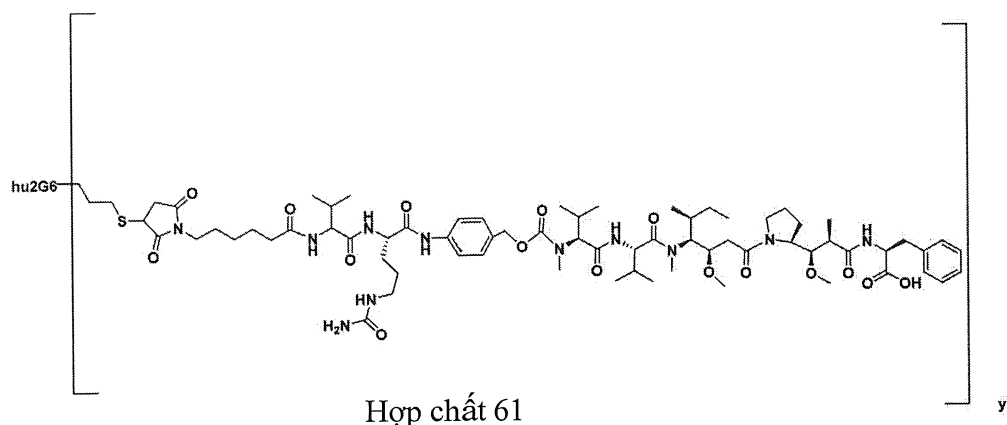
Hợp chất 58

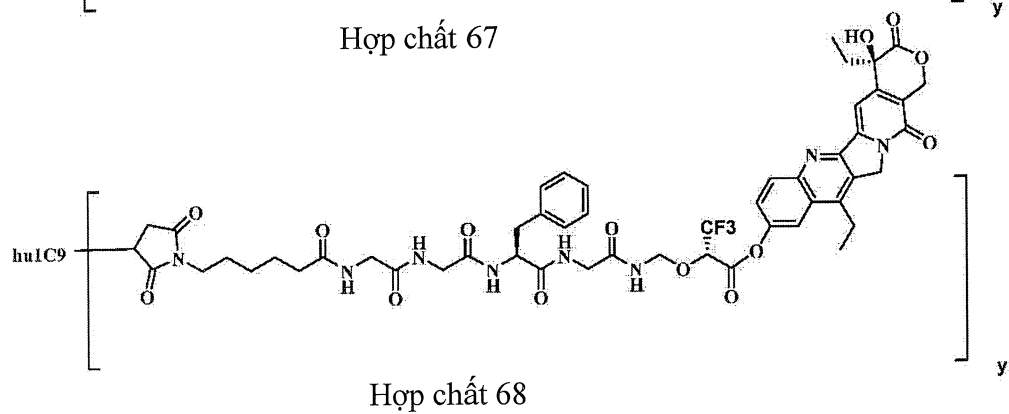
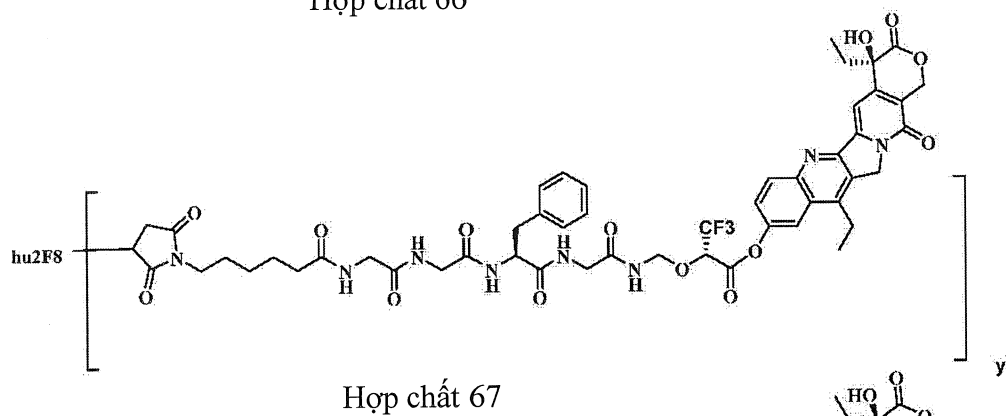
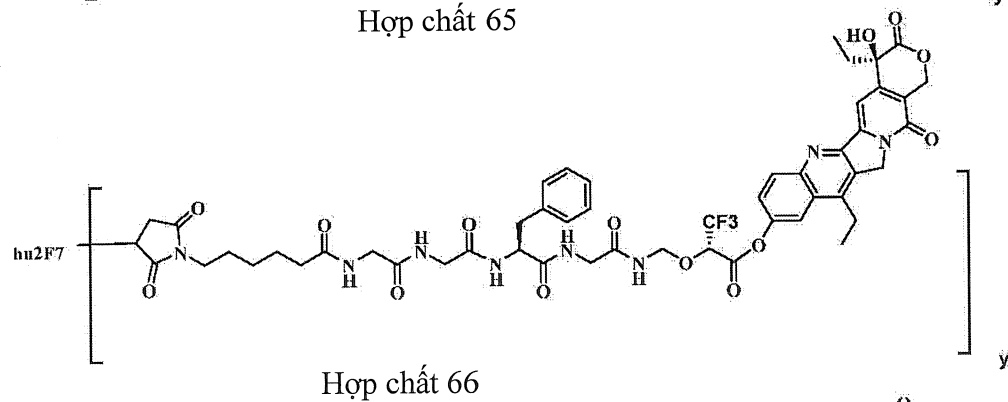
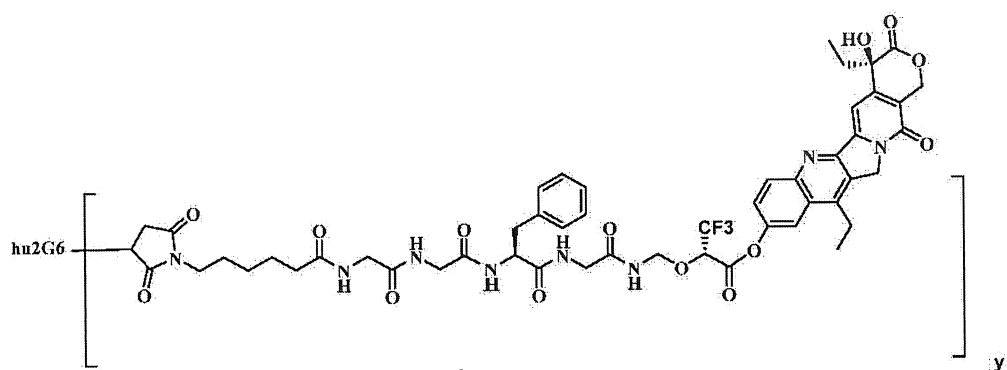


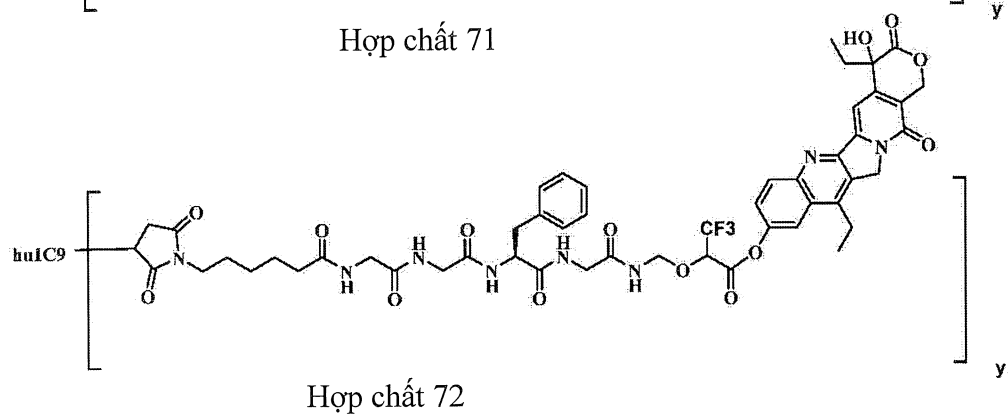
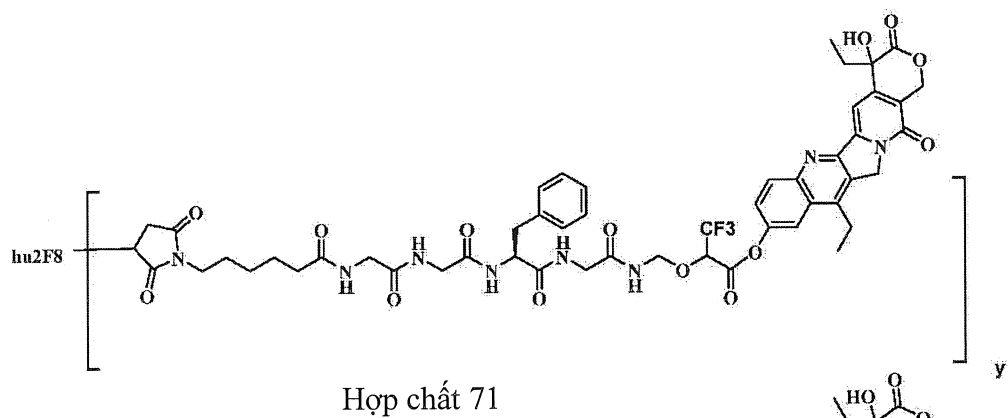
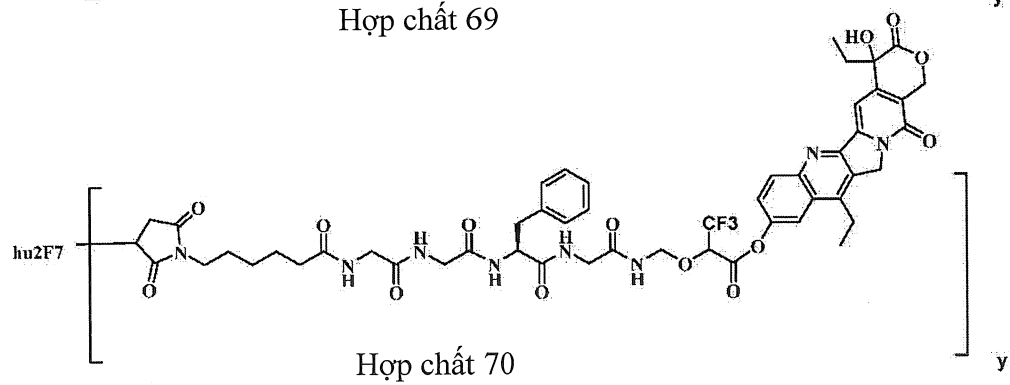
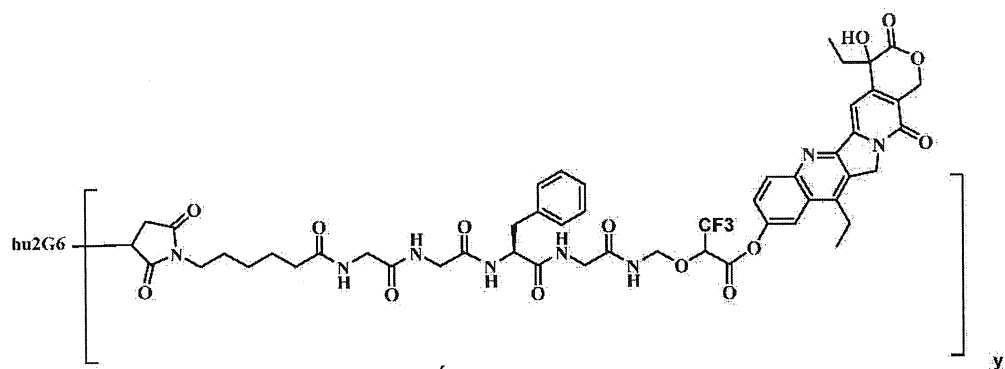
Hợp chất 59

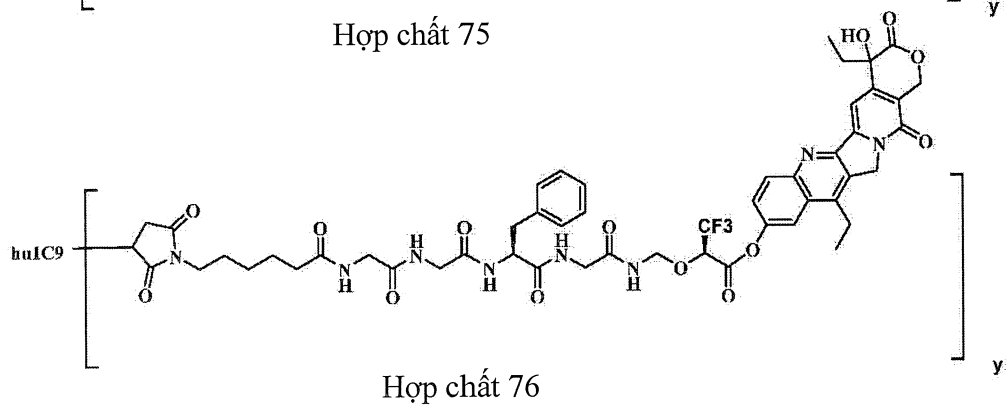
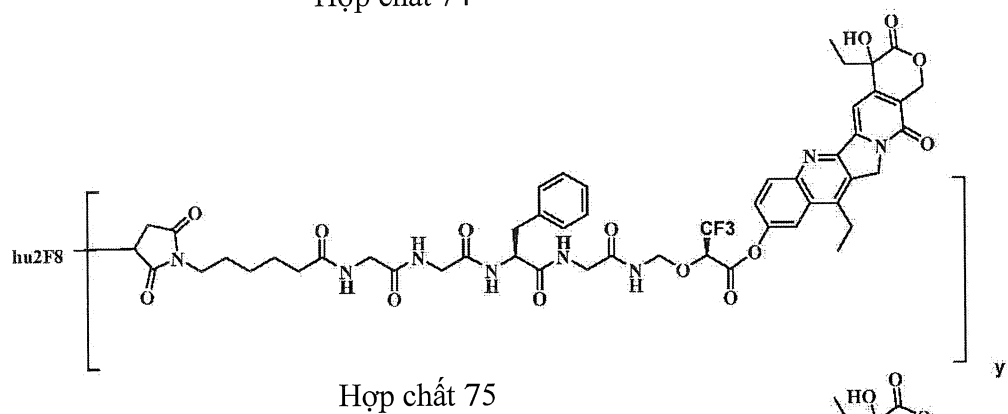
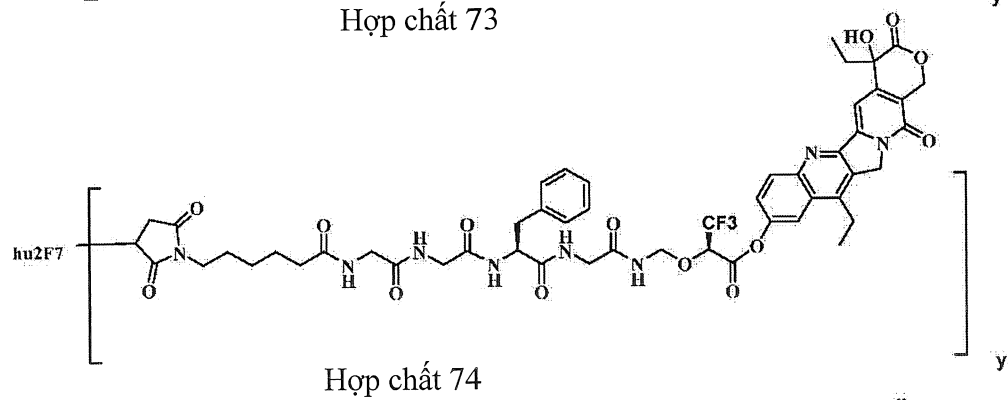
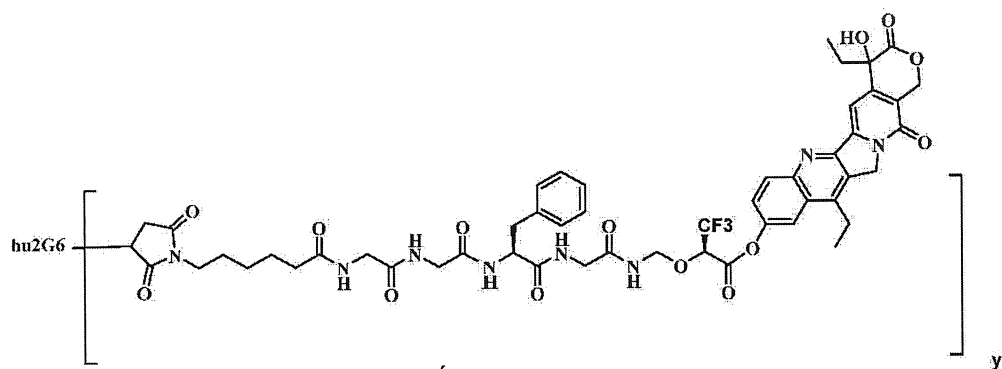


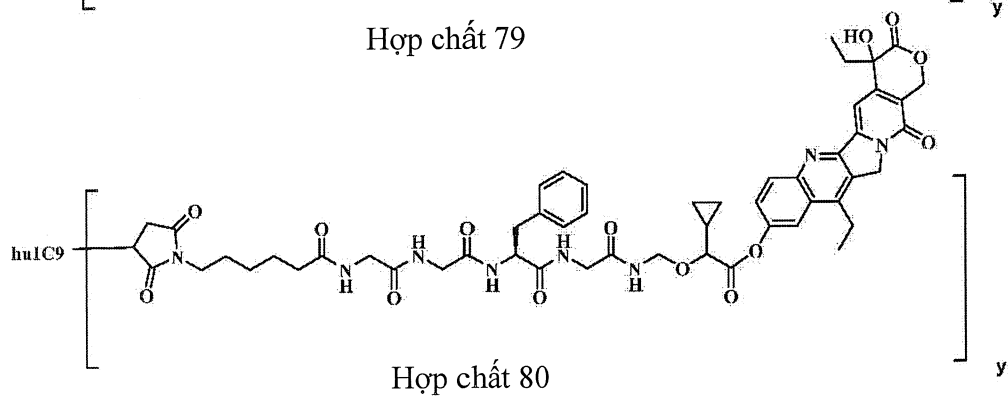
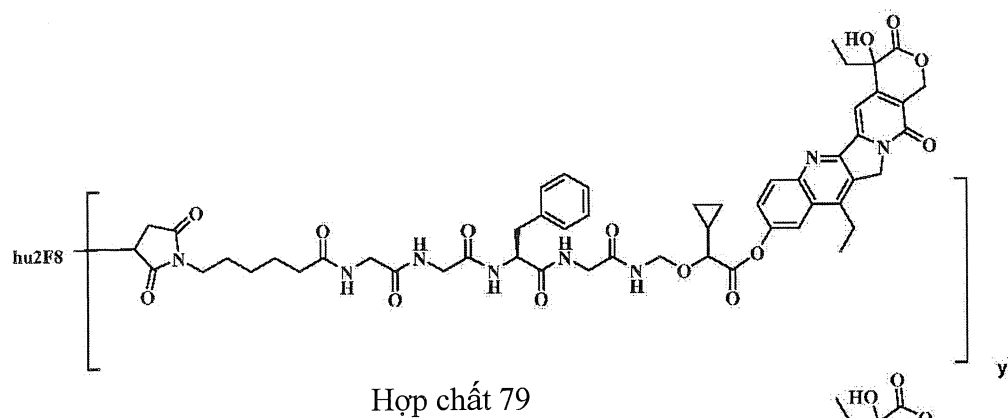
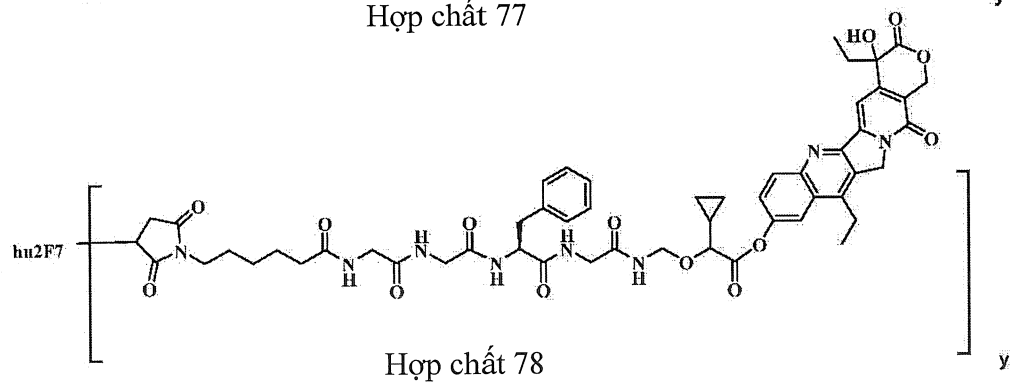
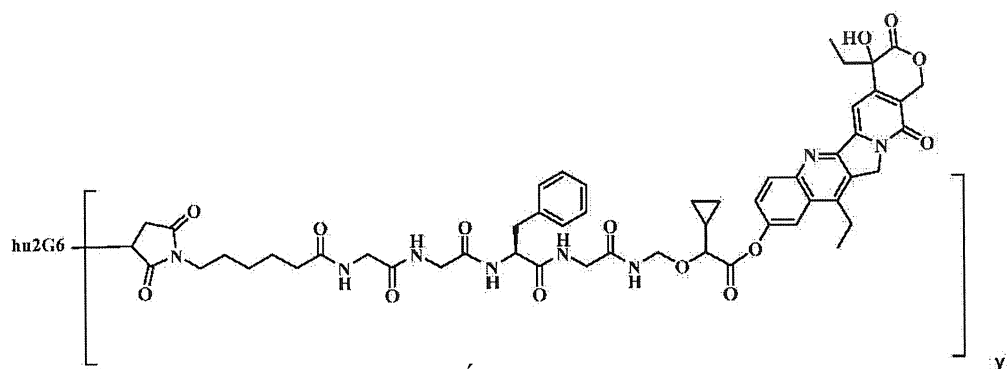
Hợp chất 60

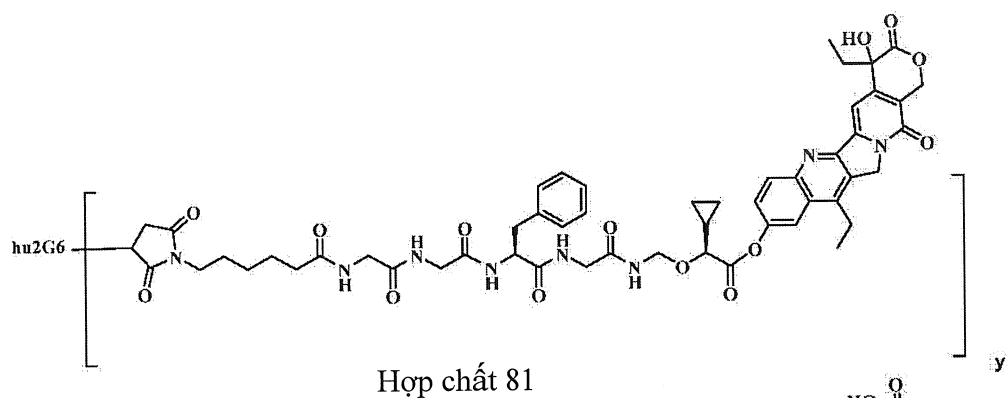




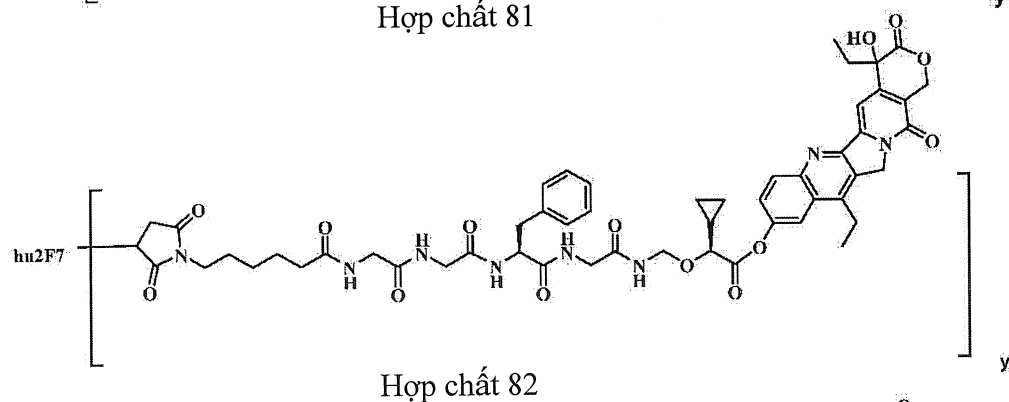




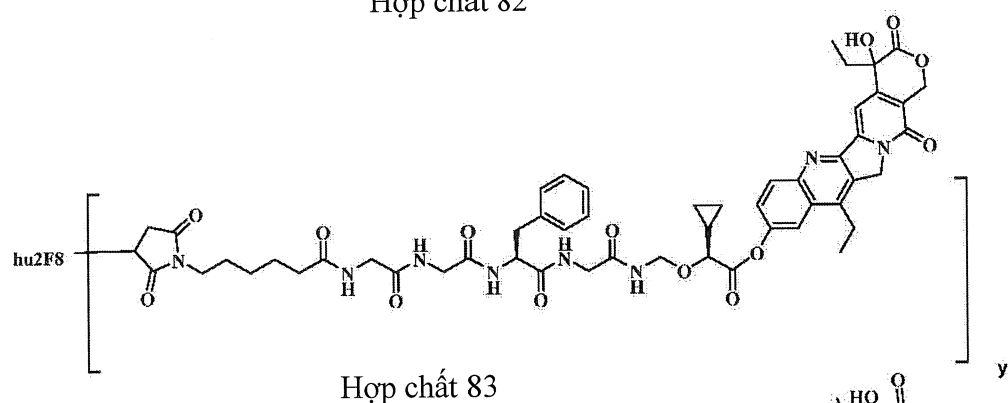




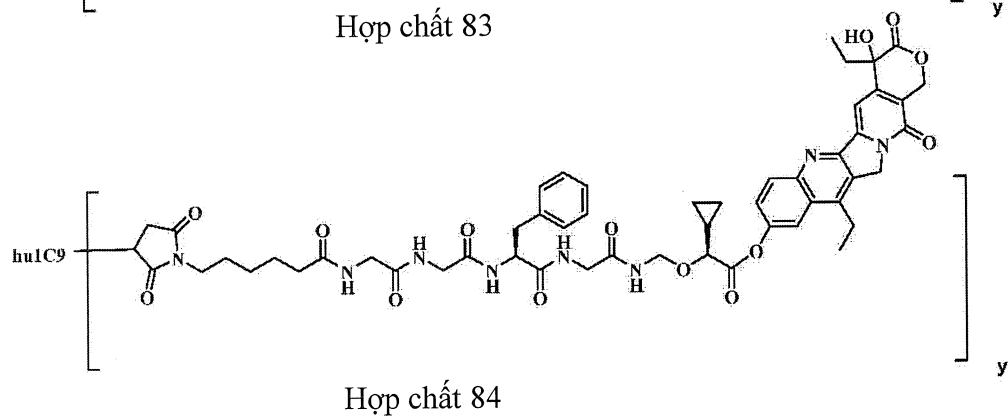
Hợp chất 81



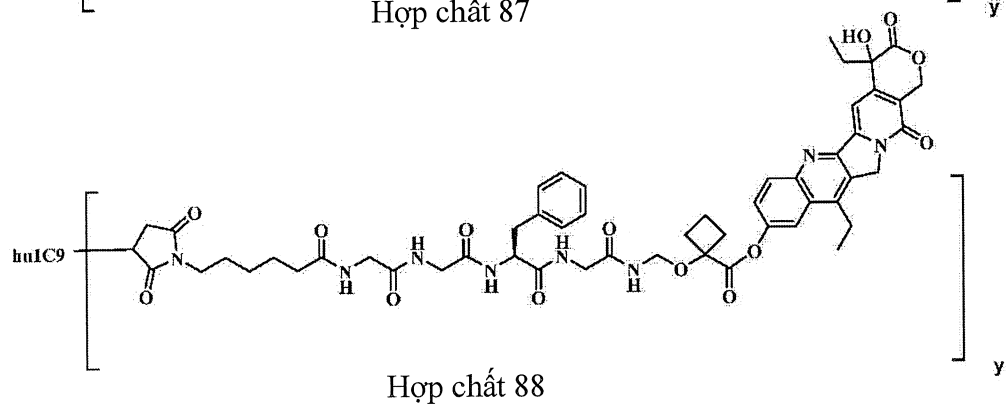
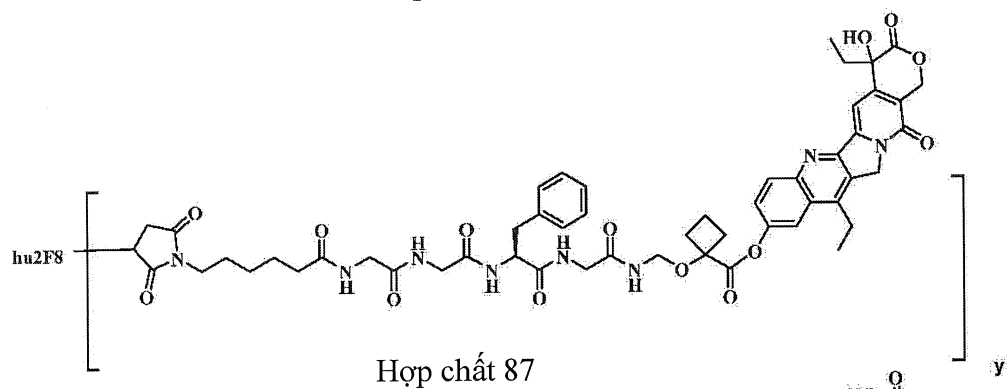
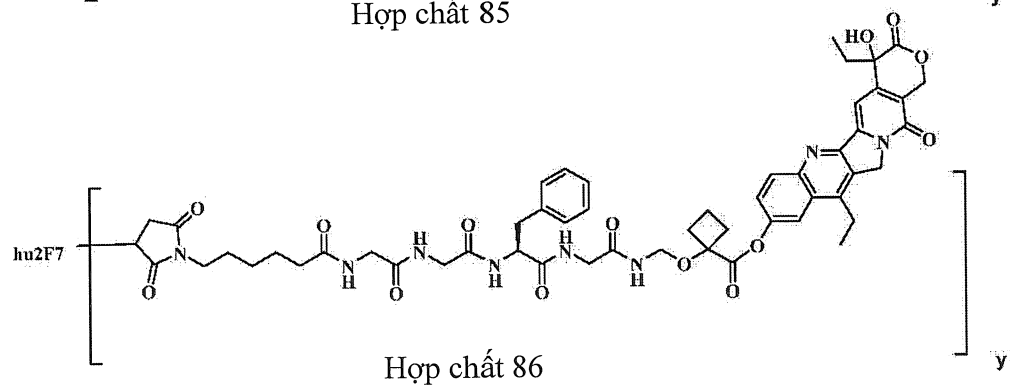
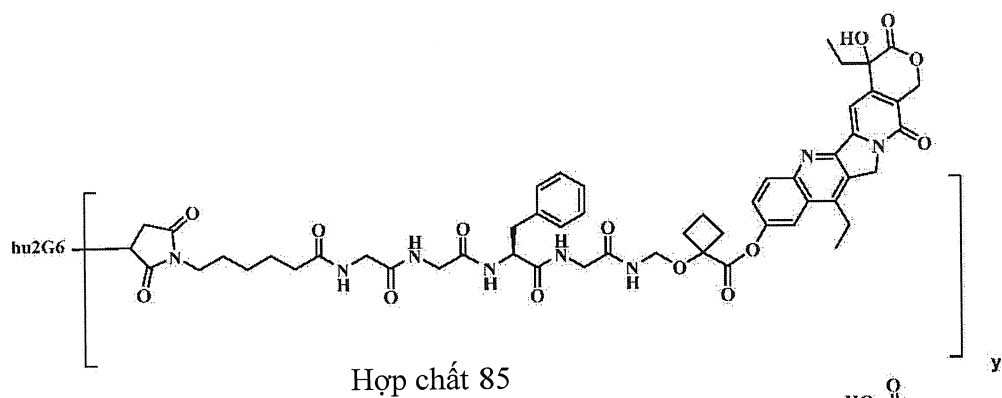
Hợp chất 82

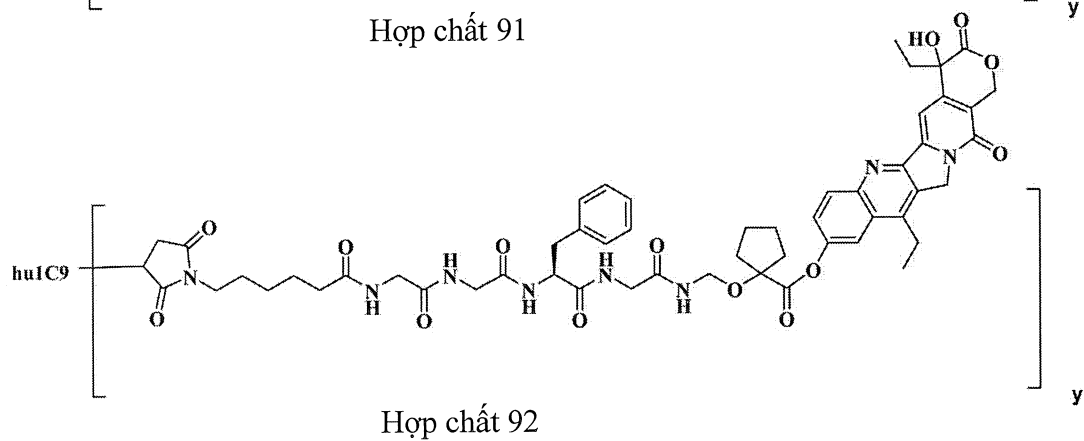
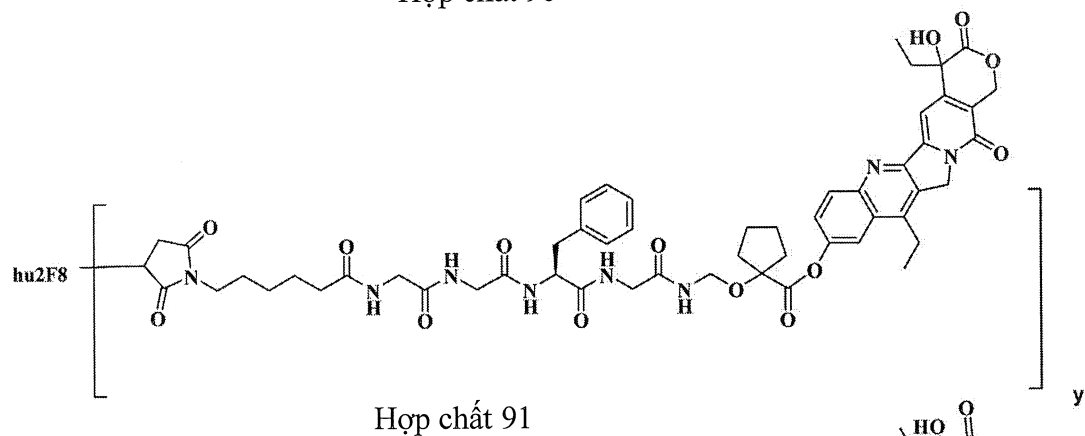
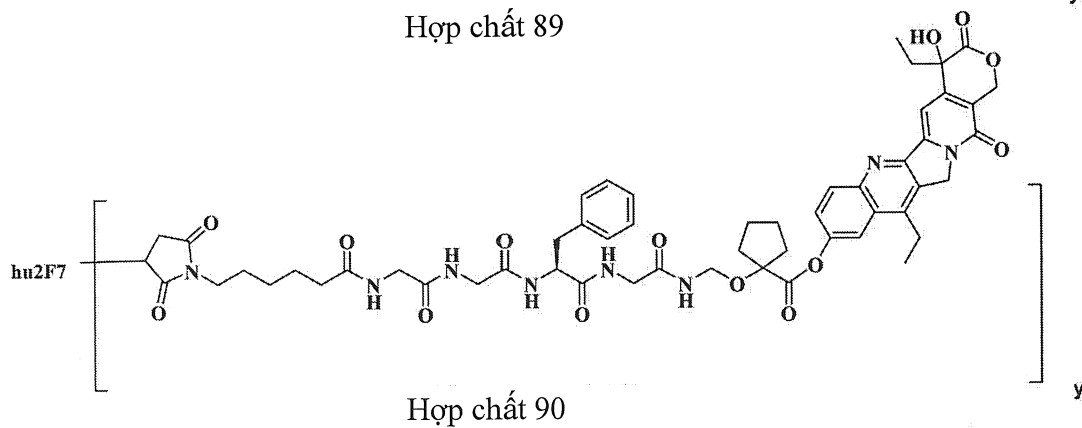
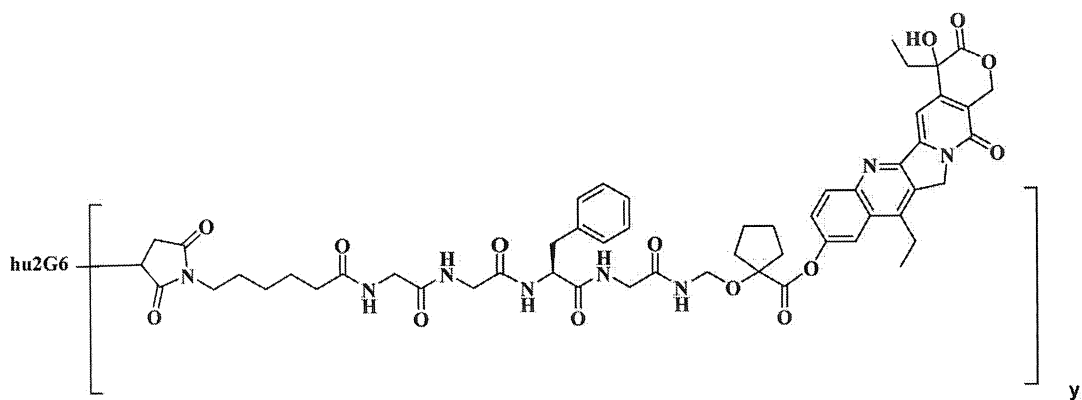


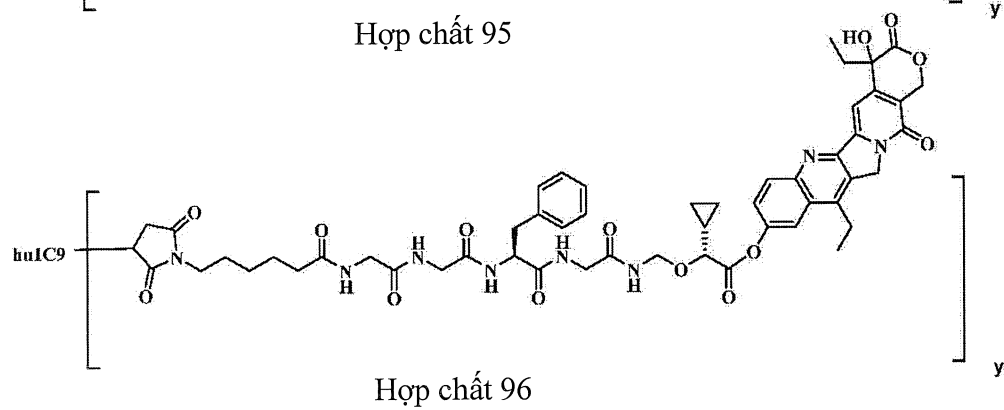
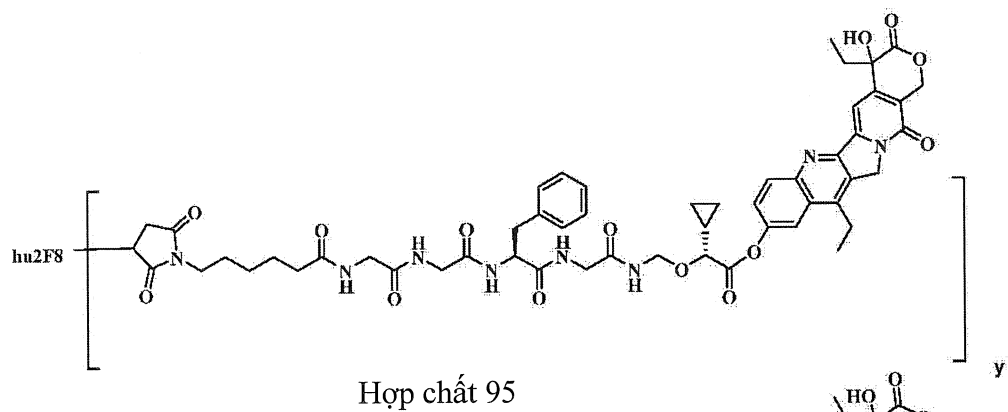
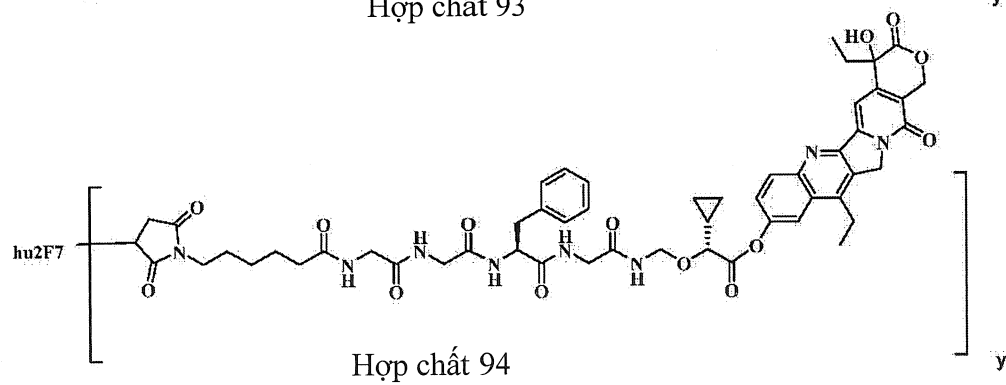
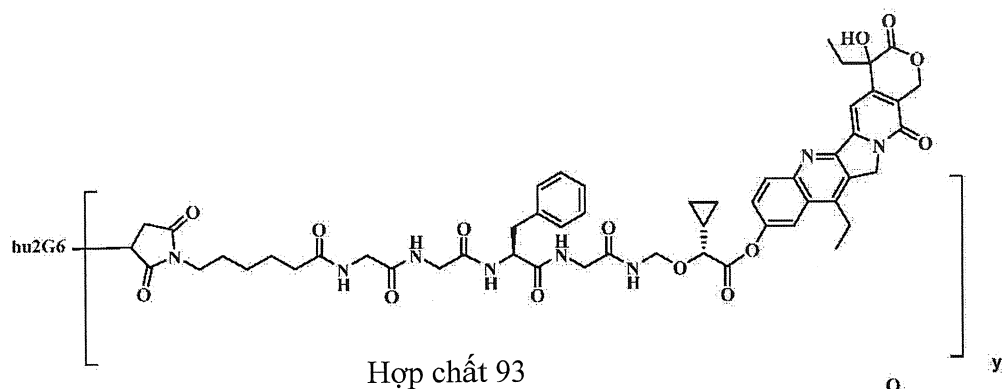
Hợp chất 83

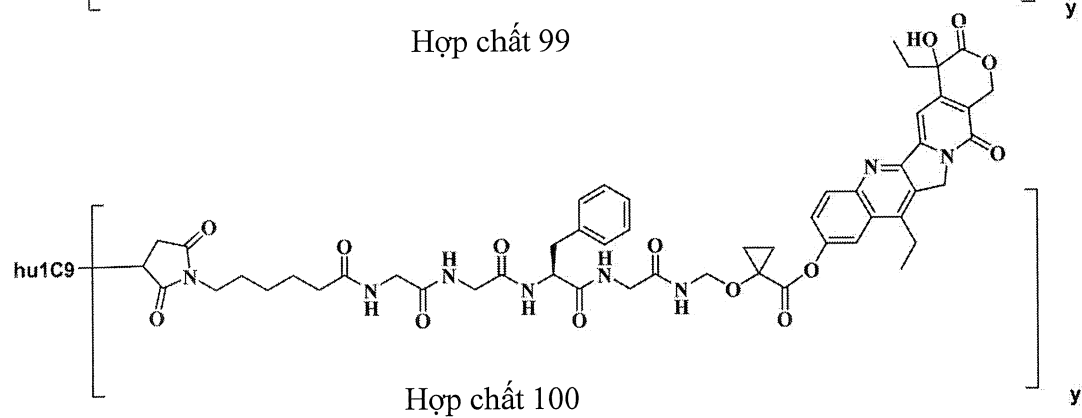
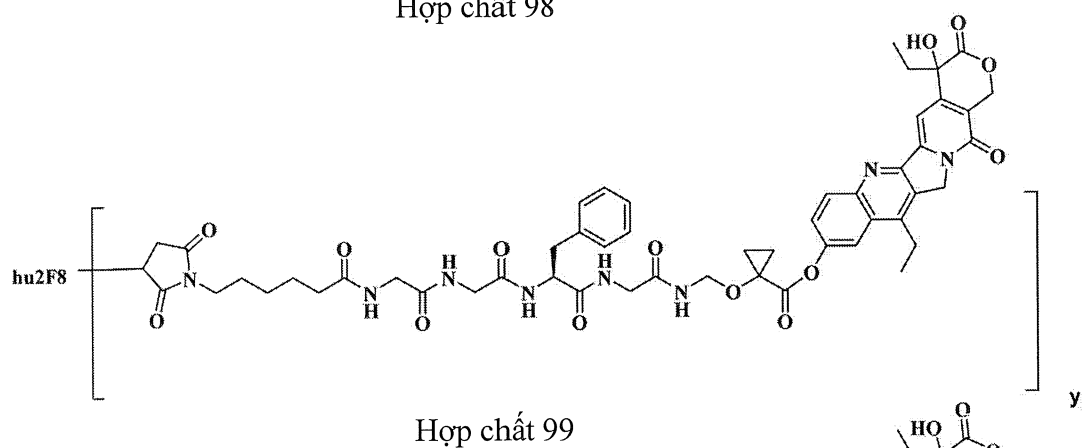
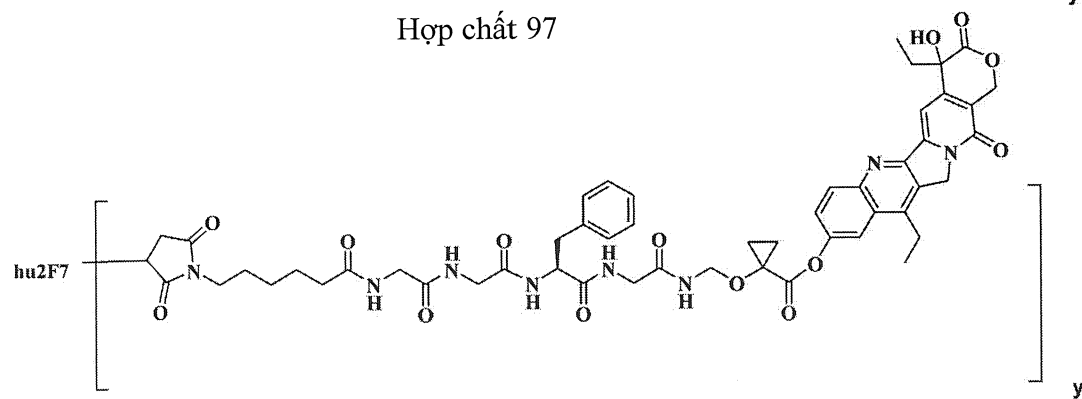
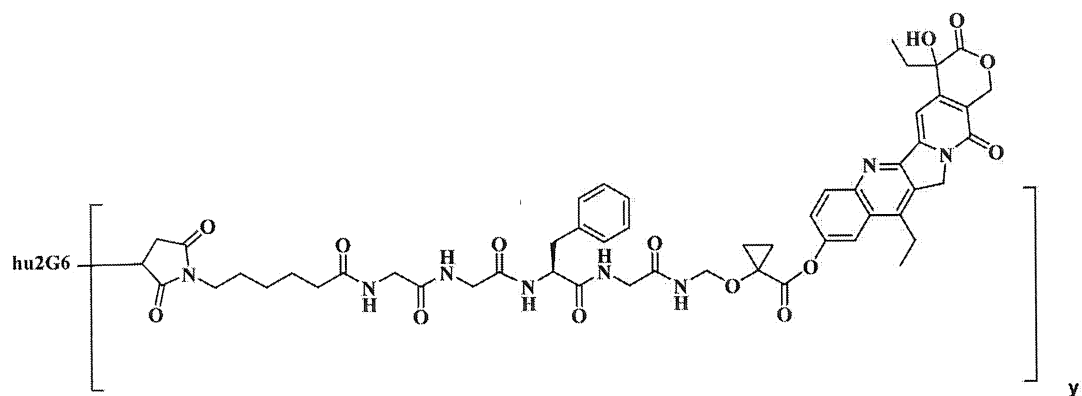


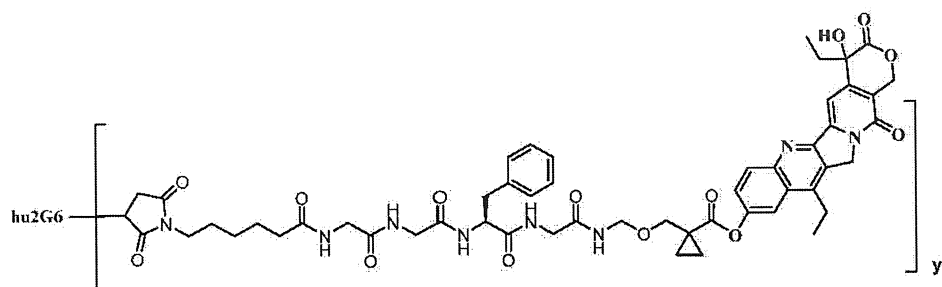
Hợp chất 84



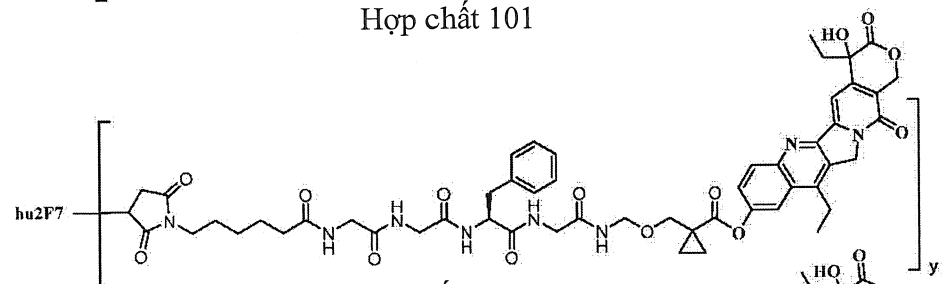




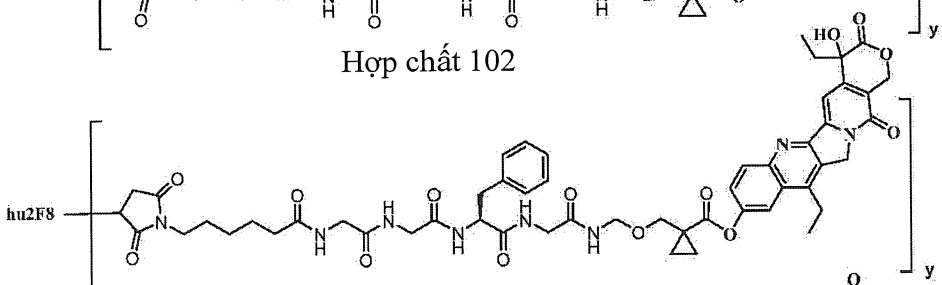




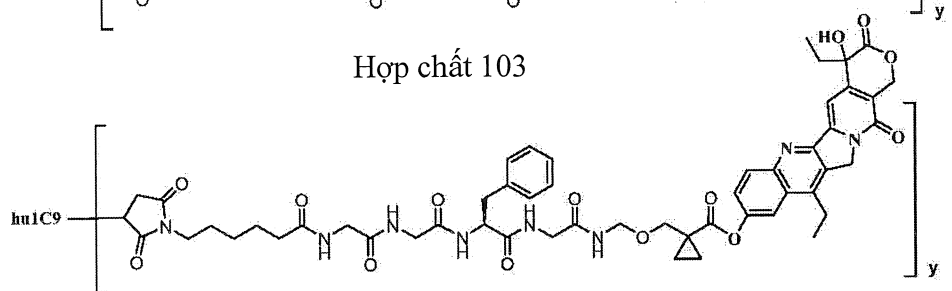
Hợp chất 101



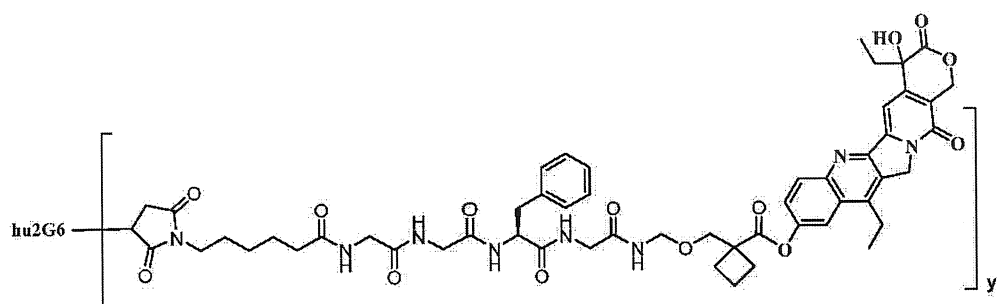
Hợp chất 102



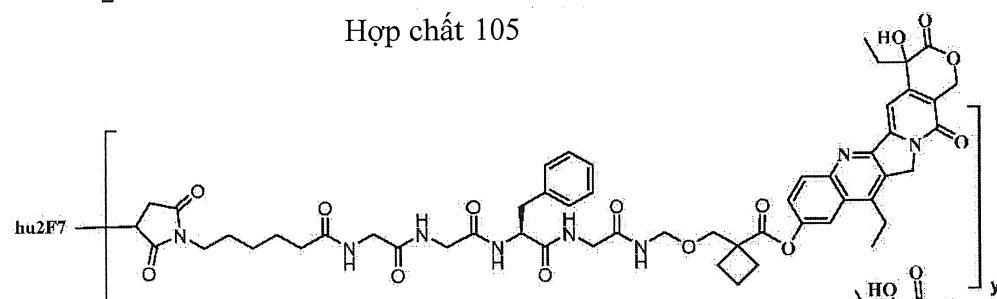
Hợp chất 103



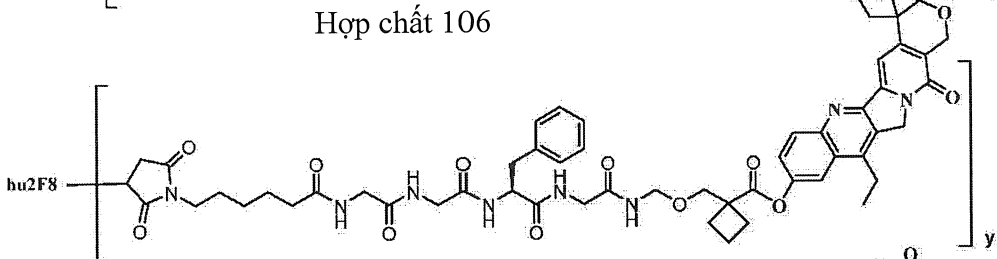
Hợp chất 104



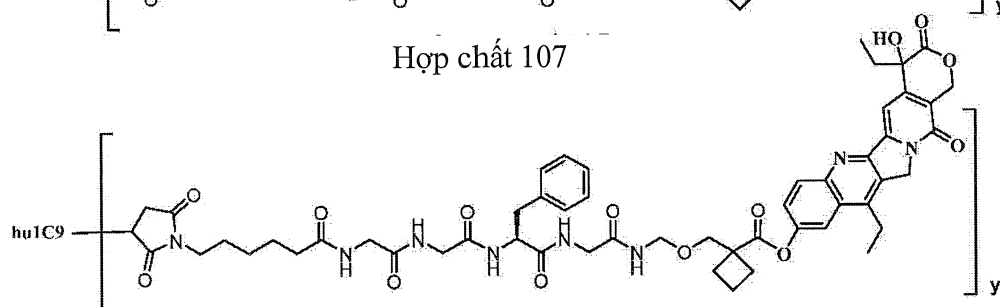
Hợp chất 105



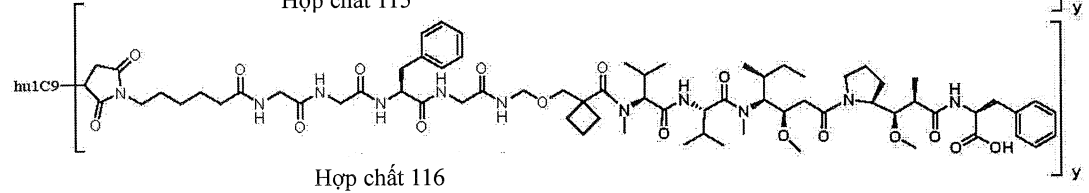
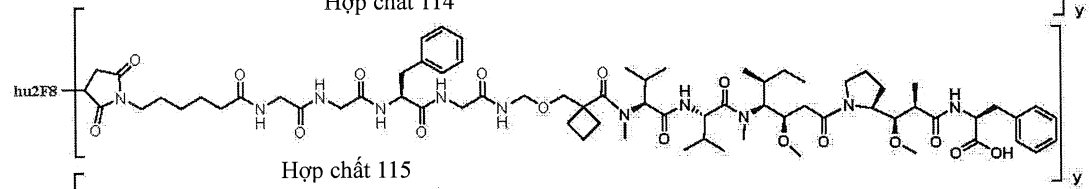
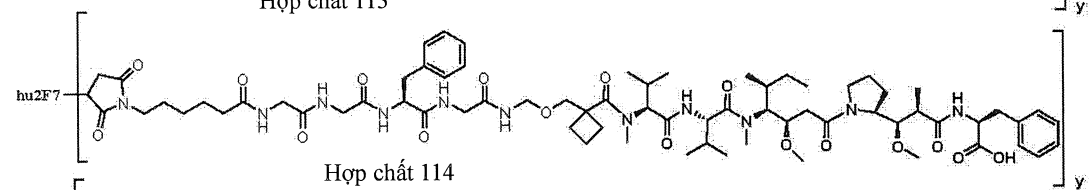
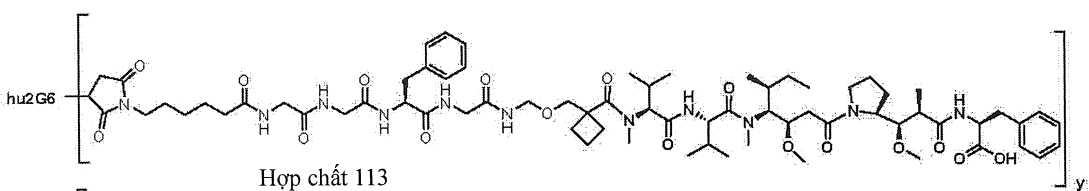
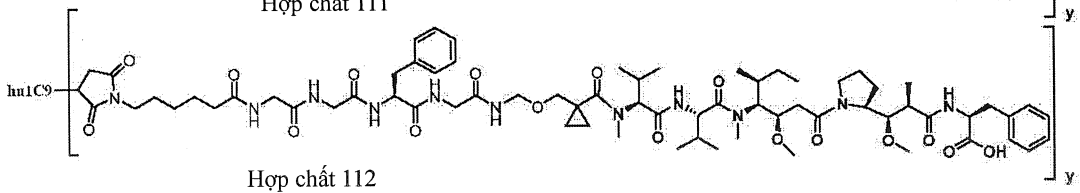
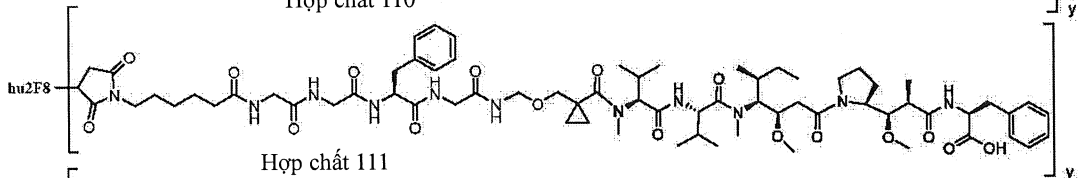
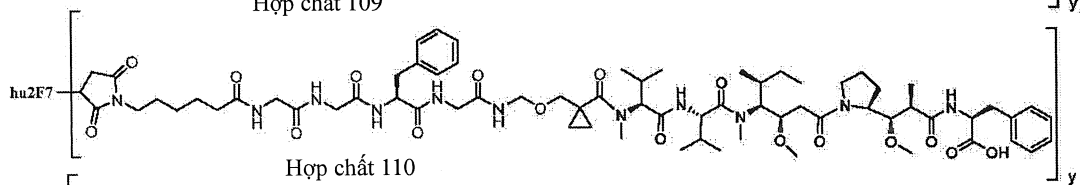
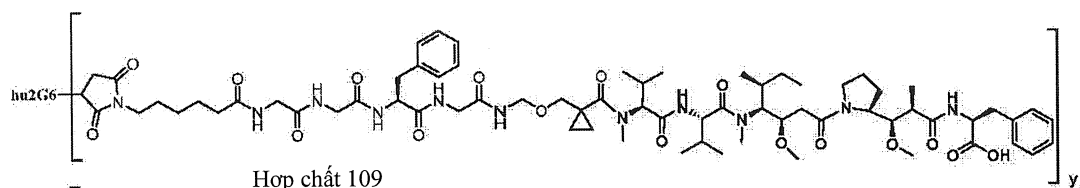
Hợp chất 106

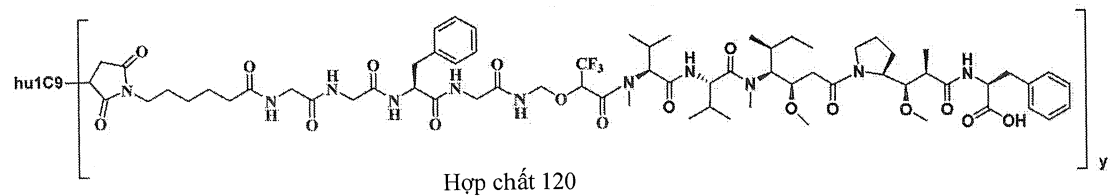
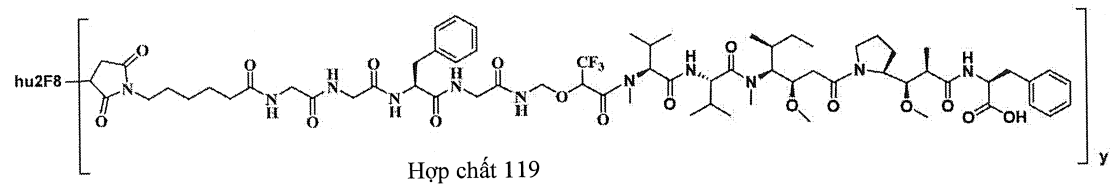
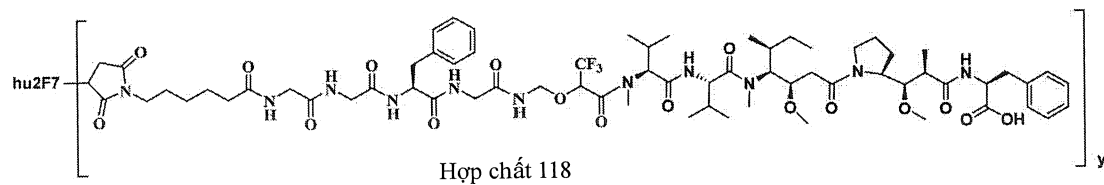
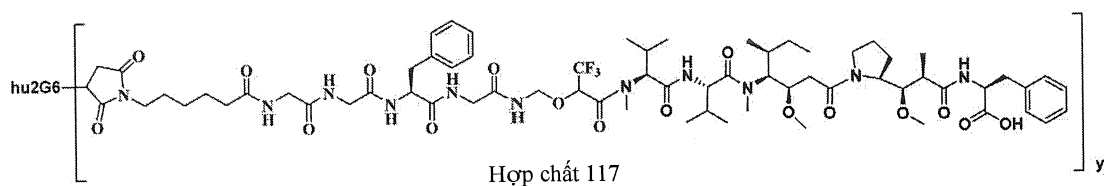


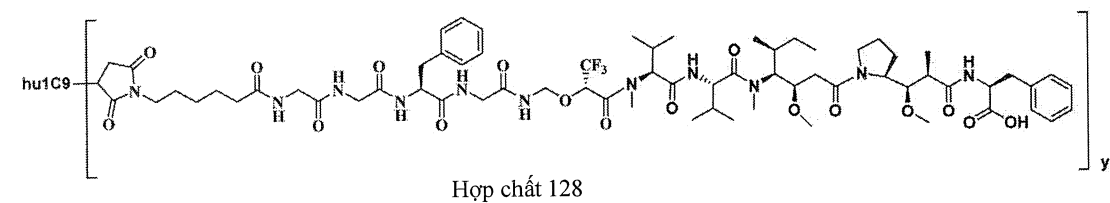
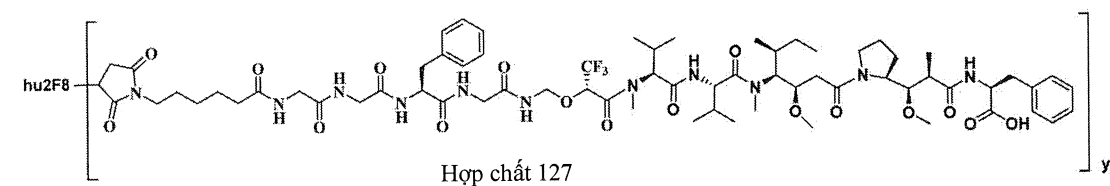
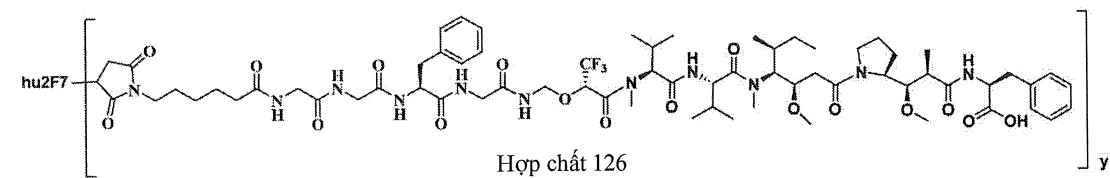
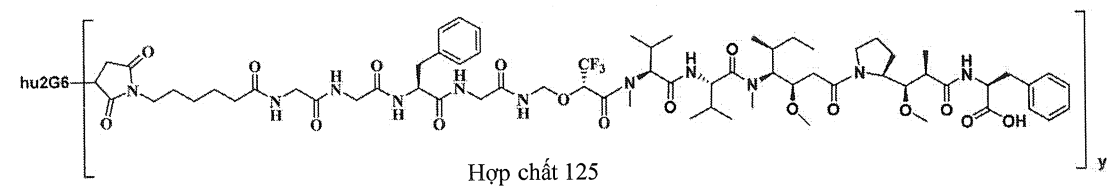
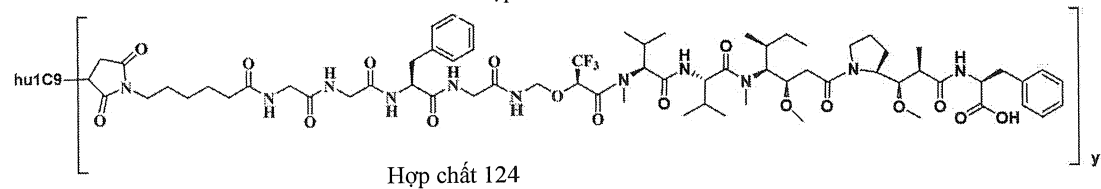
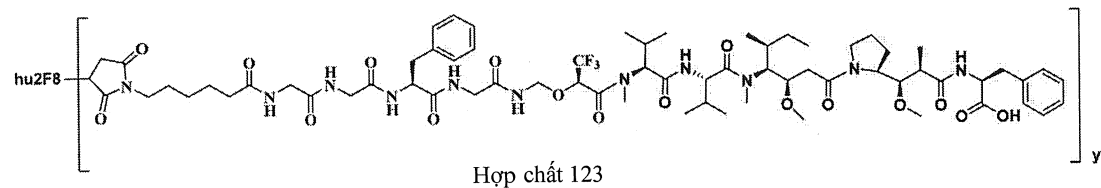
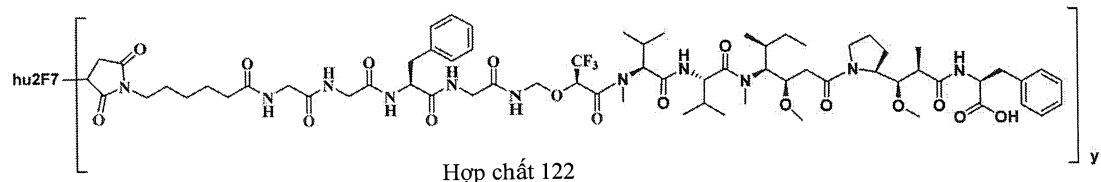
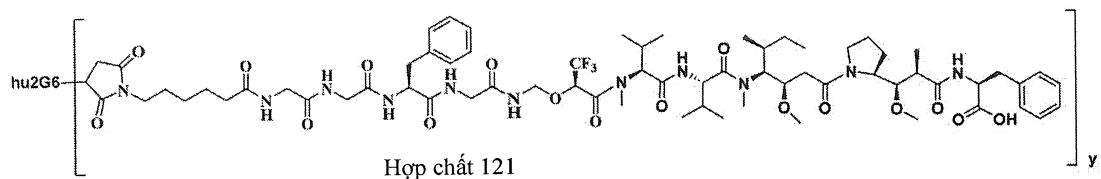
Hợp chất 107

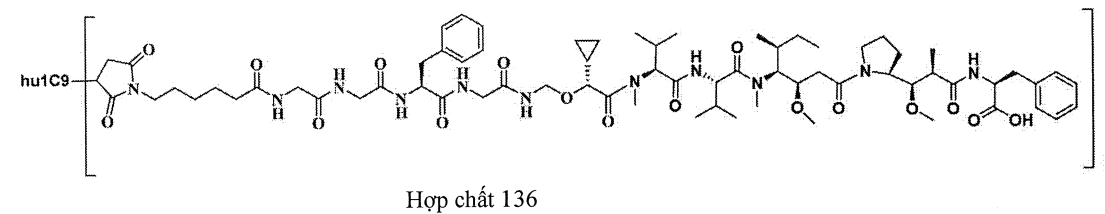
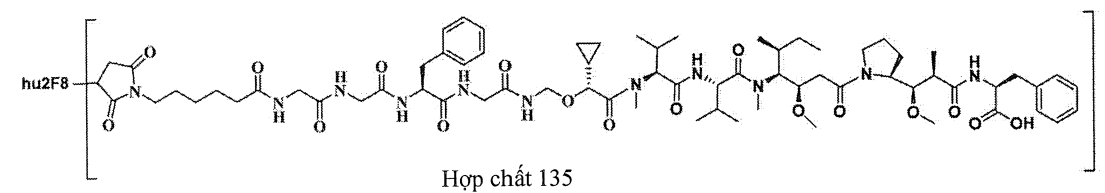
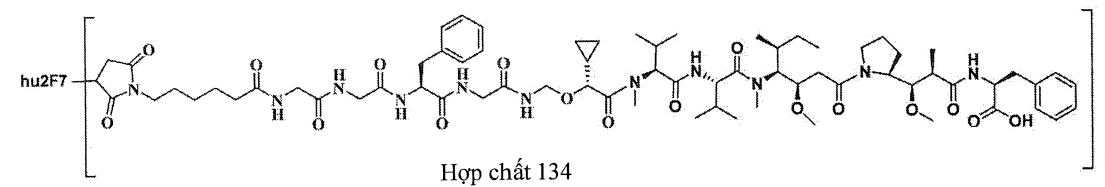
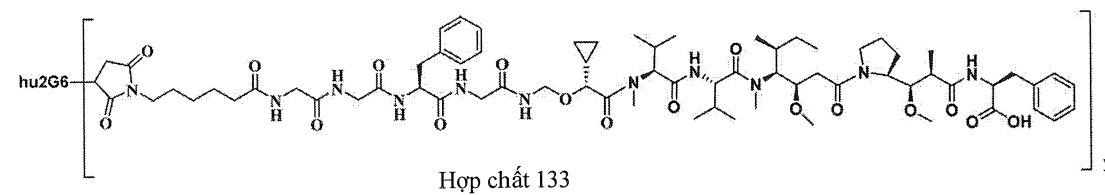
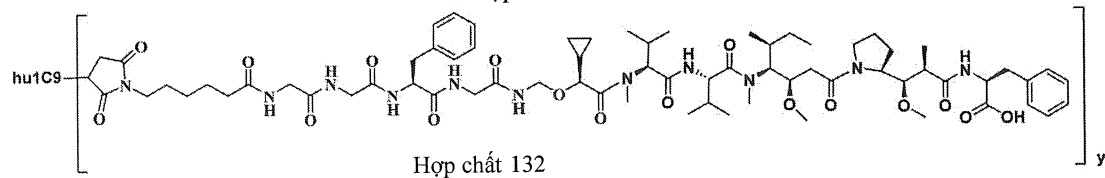
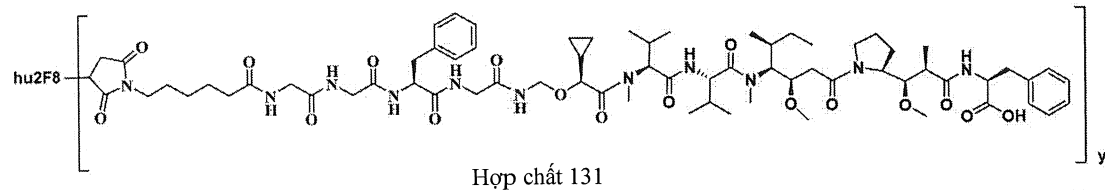
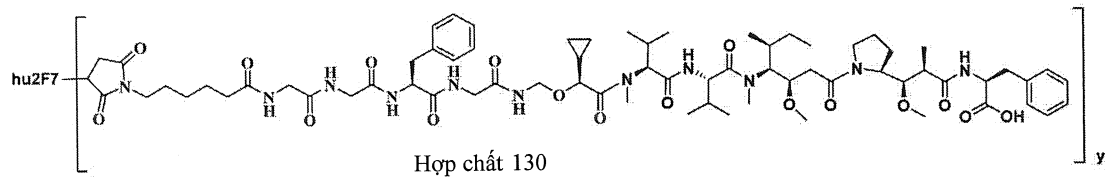
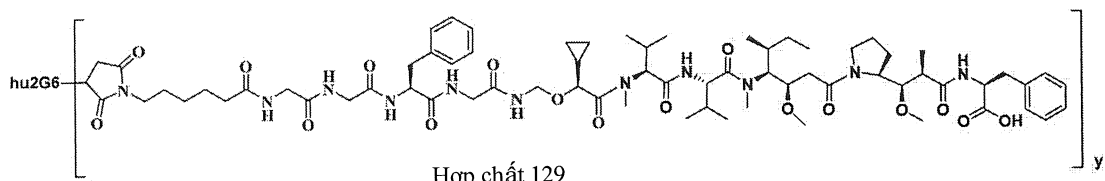


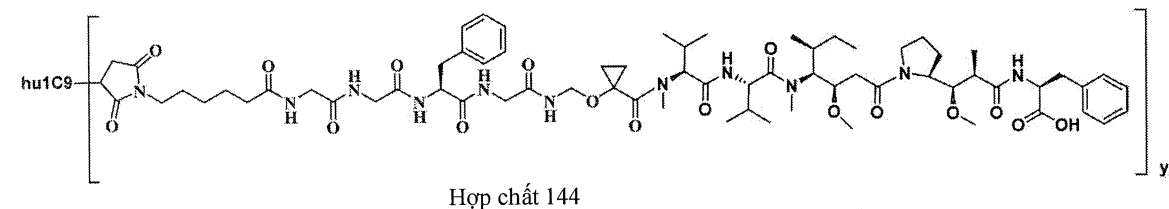
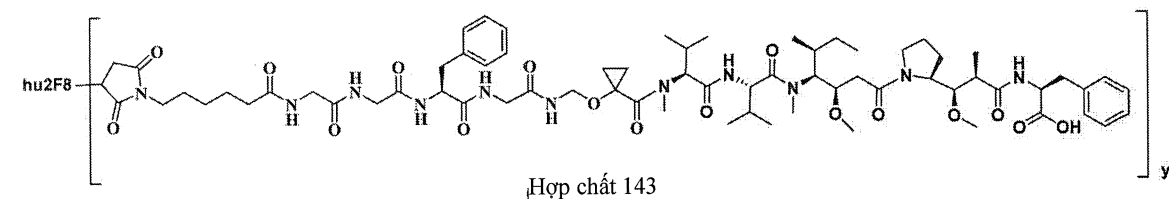
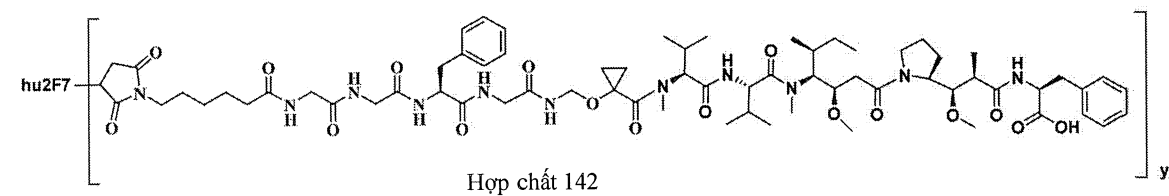
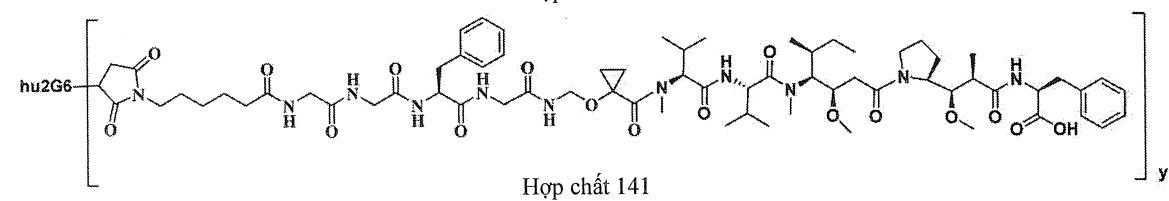
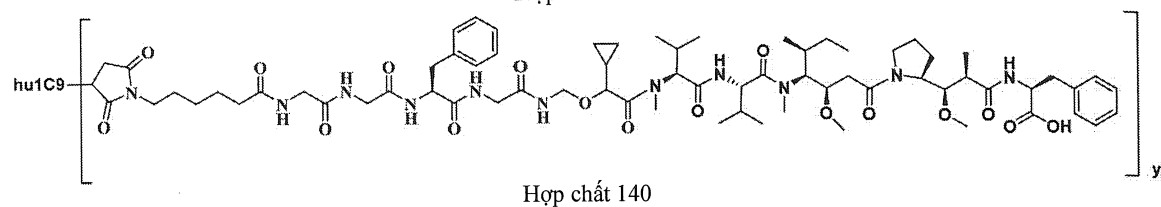
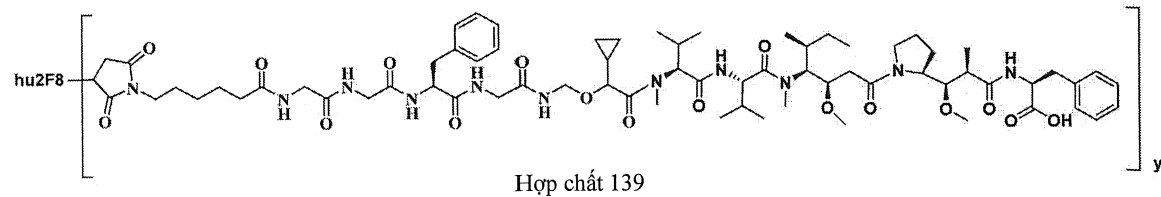
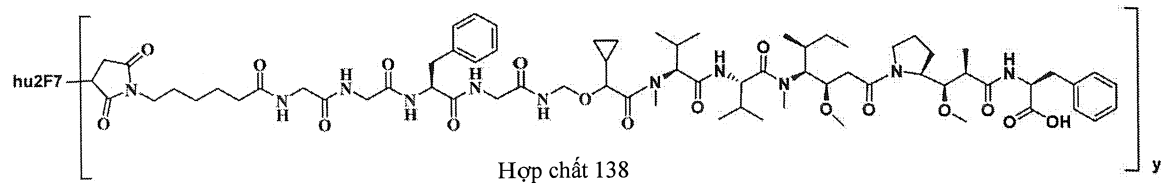
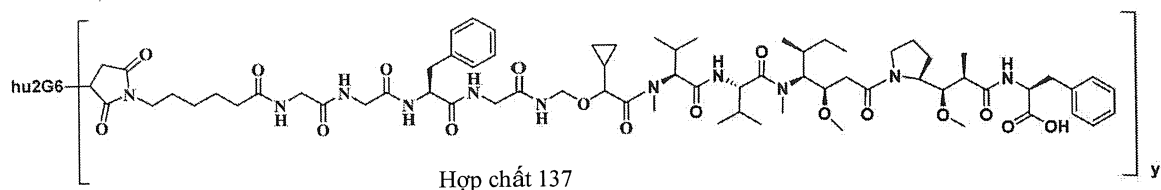
Hợp chất 108

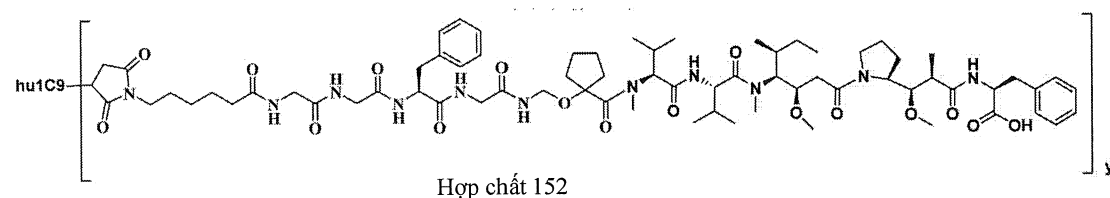
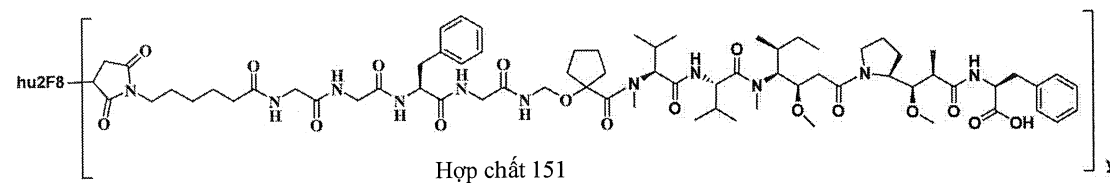
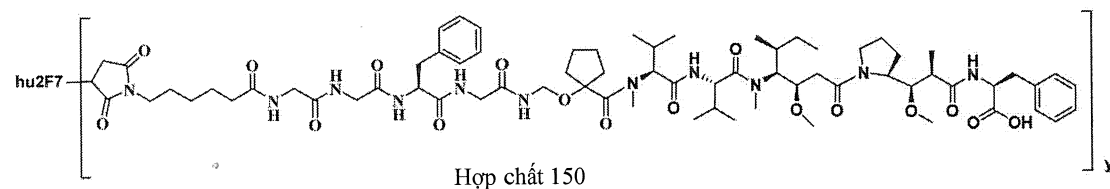
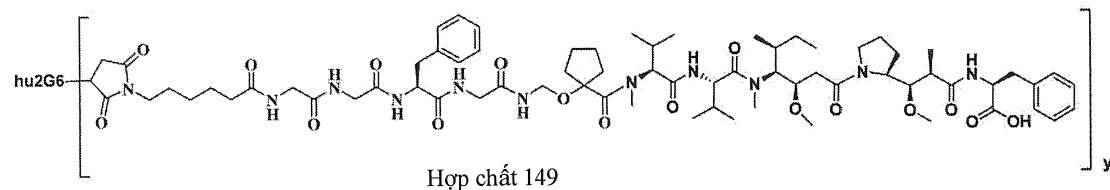
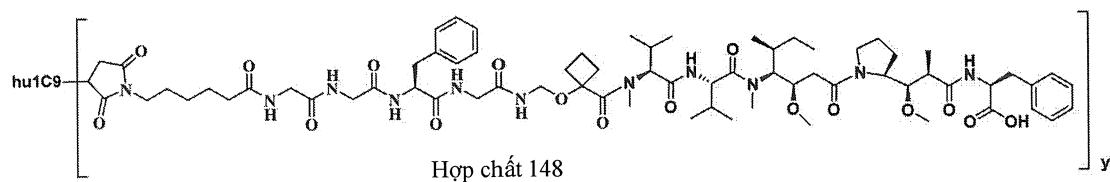
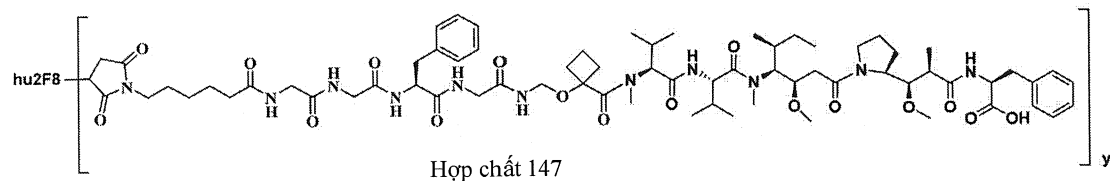
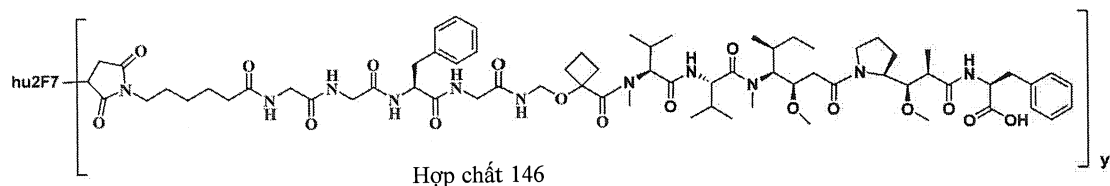
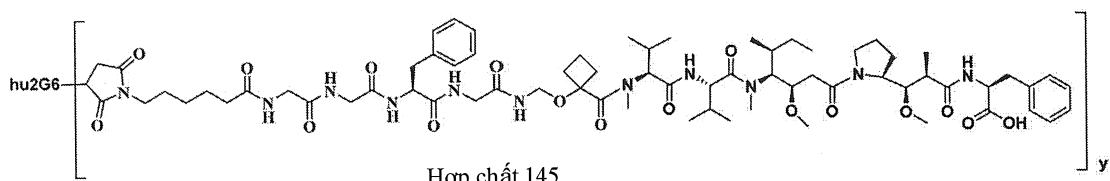








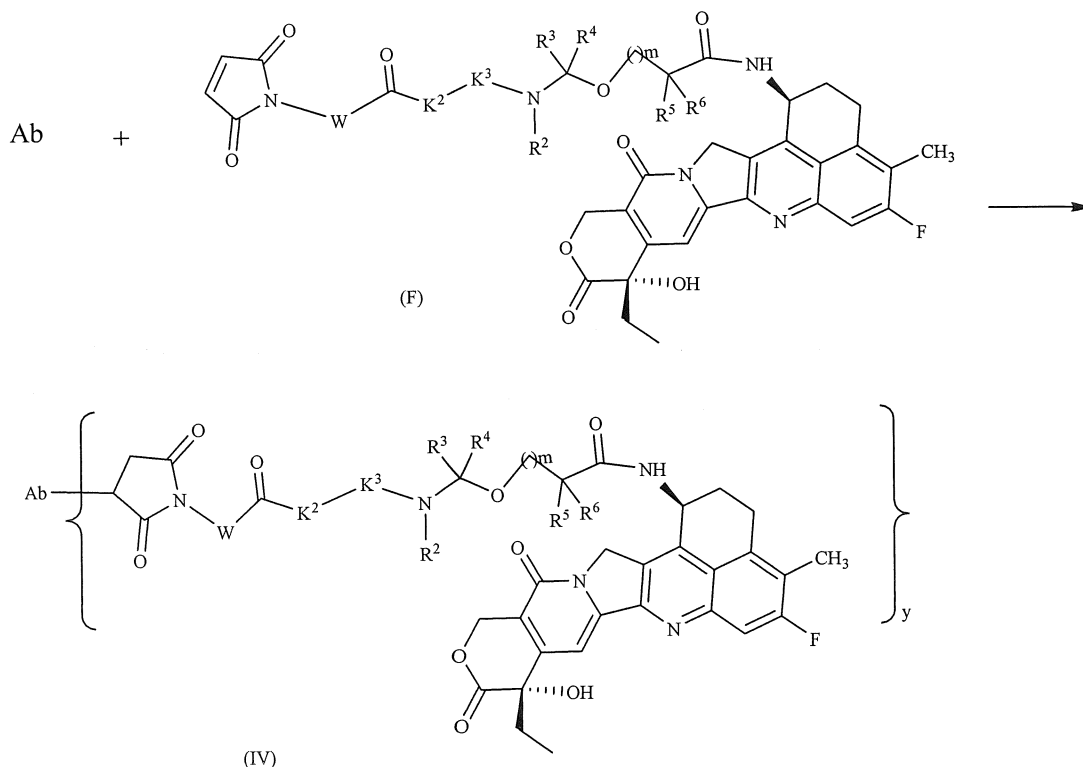




trong đó, y là một số được chọn từ 1 đến 10, tốt hơn là một số được chọn từ 2 đến 10, ngoài ra, còn là một số được chọn từ 6 đến 10, tốt hơn nữa là một số từ 7 đến 9, và tốt nhất là một số nguyên bằng 7, 8, 9; hoặc, y là một số được chọn từ 2 đến 10, tốt hơn là một số từ 4 đến 8, tốt hơn nữa là một số từ 6 đến 8, ngoài ra tốt hơn là một số từ 7 đến 8, và tốt nhất là 8.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp

hợp kháng thể-được chất có công thức chung (IV) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:



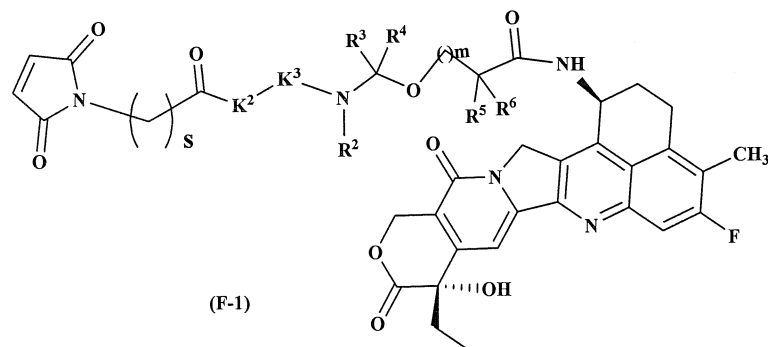
sau khi Ab được khử, nó sẽ được tiến hành phản ứng liên kết với công thức chung (F) để thu được hợp chất có công thức chung (IV);

trong đó:

Ab là kháng thể kháng B7H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó;

W, K², K³, R² đến R⁶, m và y là như được nêu trong công thức chung (IV).

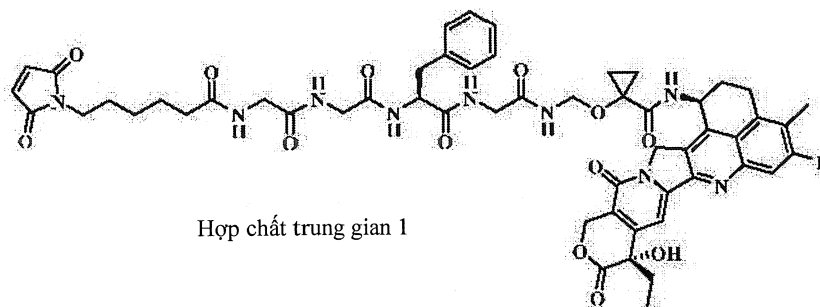
Theo một phương án được ưu tiên, công thức chung (F) là hợp chất có công thức chung (F-1):



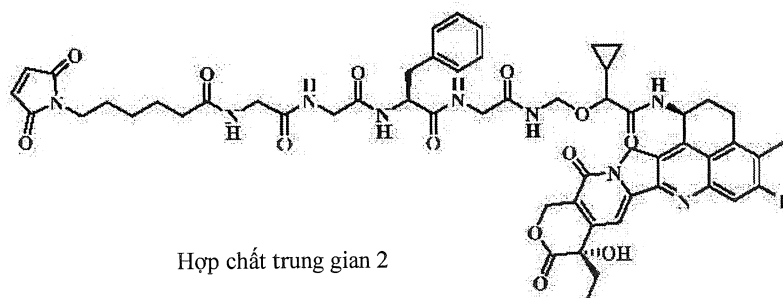
hoặc chất đồng phân hỗn biến, mesome, raxemat, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang hoặc dạng hỗn hợp của chúng, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó

K², K³, R² đến R⁶, s và m là như được nêu trong cấu trúc -L₂-L₁- trên đây.

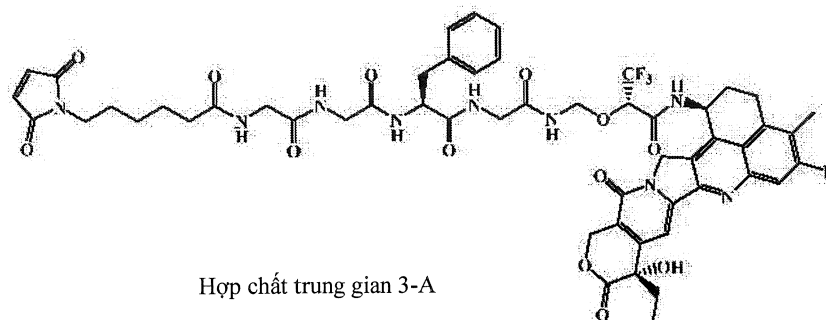
Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức chung (F) hoặc công thức chung (F-1) được chọn từ nhóm bao gồm:



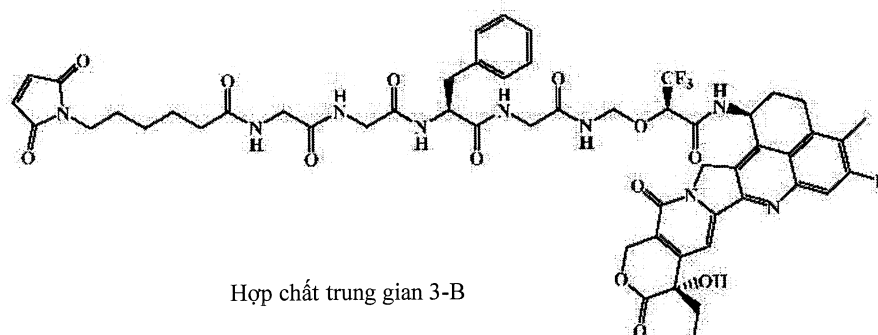
Hợp chất trung gian 1



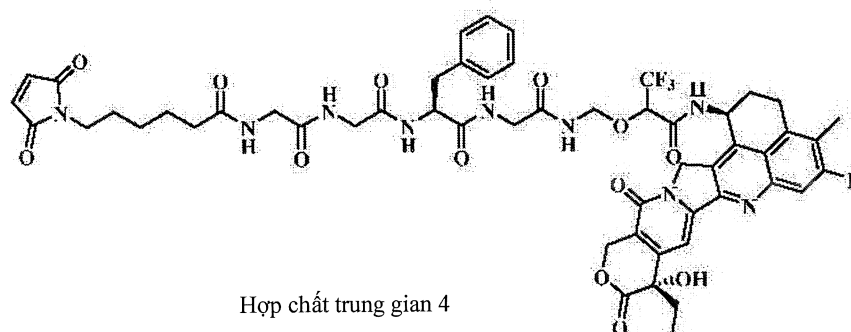
Hợp chất trung gian 2



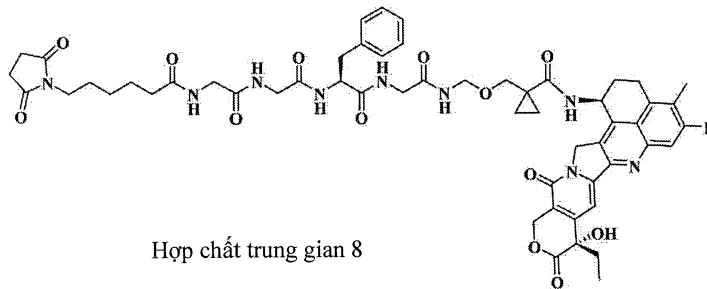
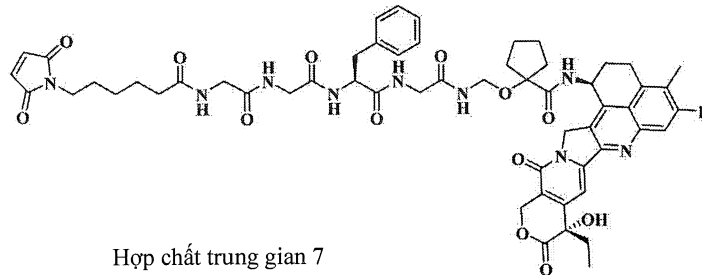
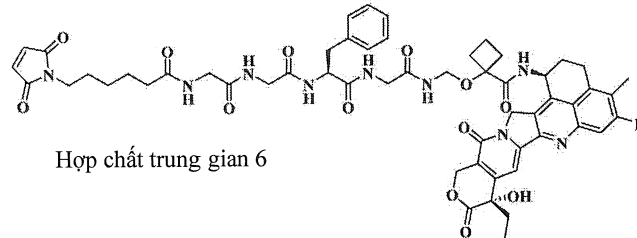
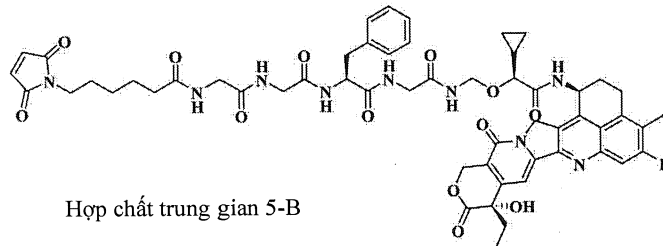
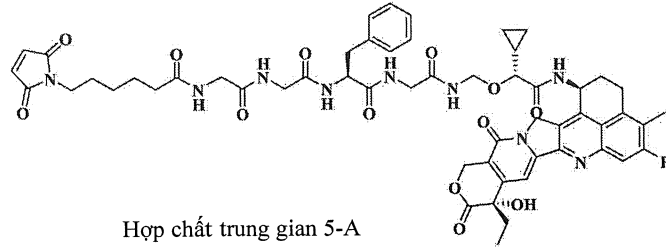
Hợp chất trung gian 3-A



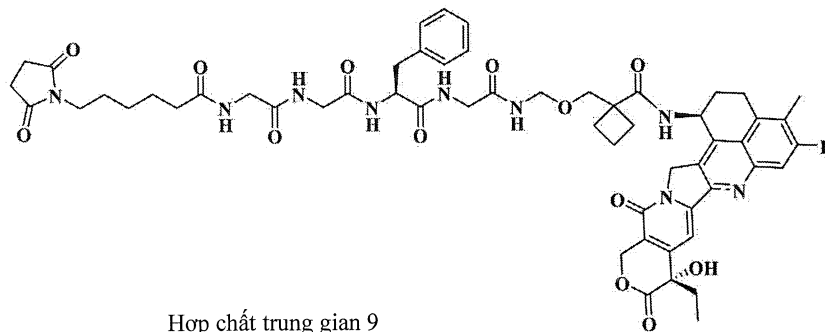
Hợp chất trung gian 3-B



Hợp chất trung gian 4



và



Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến được phẩm, trong đó được

phẩm này chứa thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo phương án bất kỳ theo sáng chế, hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng, và một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến việc sử dụng thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A), hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng, hoặc dược phẩm của chúng, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh có liên quan đến B7-H4 của người, tốt hơn là thuốc để điều trị bệnh ung thư có mức biểu hiện B7-H4 cao.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, bệnh ung thư này được chọn từ nhóm bao gồm u nguyên bào hình sao ở não người, ung thư hầu ở người, u thượng thận, ung thư có liên quan đến AIDS, sarcom phế nang phần mềm, u bào hình sao, ung thư bàng quang, ung thư xương, ung thư não và cột sống, u não di căn, ung thư vú, u thể động mạch cảnh, ung thư cổ tử cung, sarcom sụn, u nguyên sống, caxinôm tế bào kỵ màu ở thận, caxinôm tế bào sáng, ung thư đại tràng, ung thư đại trực tràng, u tế bào nhỏ dạng tròn tăng sinh ở mô liên kết, u màng não thất, sarcom Ewing, sarcom sụn tạo nhầy ngoài xương, chứng tạo sụn không hoàn hảo ở xương, loạn sản xơ ở xương, ung thư đường mật hoặc túi mật, ung thư dạ dày, bệnh nguyên bào nuôi trong thai kỳ, u tế bào mầm, ung thư đầu và cổ, caxinôm tế bào gan, u tế bào đảo, sarcom Kaposi, ung thư thận, bệnh bạch cầu, sarcom mỡ/u mỡ ác tính, ung thư gan, u lympho, ung thư phổi, u nguyên bào tủy, u melanin, u màng não, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sinh tủy, u nguyên bào thần kinh, u thần kinh nội tiết, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến giáp dạng nhú, u tuyến cận giáp, ung thư ở trẻ em, u bao sợi thần kinh ngoại biên, u tủy thượng thận, u tuyến yên, u tuyến tiền liệt, u melanin sau màng mạch nhỏ, ung thư thận di căn, u hình que điển hình, sarcom cơ vân, sarcom, ung thư da, sarcom mô mềm, caxinôm tế bào vảy, sarcom hoạt dịch, ung thư tinh hoàn, ung thư tuyến ức, ung thư tuyến ức di căn và ung thư dạ con.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Thể hiện hiệu quả *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất: hu2G6-MC-MMAF và hu2F7-MC-MMAF thể hiện tác dụng ức chế và tiêu diệt trên các khối u ghép ngoại lai MX-1 ở các liều 1,5 mg/kg và 3 mg/kg.

Fig.2: Thể hiện phổ HPLC của hu2F7-MC-MMAF với mức tải dược chất bằng 2 và 4, tương ứng.

Fig.3: Thể hiện hiệu quả chống khối u *in vivo* của hu2F7-MC-MMAF với mức tải

được chất bằng 2 và 4, tương ứng.

Fig.4: Thể hiện hiệu quả chống khối u *in vivo* của hu2F7-MC-MMAF với mức tải được chất bằng 2 và 4, tương ứng. Hình vẽ này thể hiện các khối u của chuột trong mỗi nhóm vào ngày 21.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Các thuật ngữ

Để hiểu dễ hơn sáng chế, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được quy định rõ ràng theo cách khác trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các mã ba chữ cái và một chữ cái của các axit amin được sử dụng trong sáng chế là như được mô tả trong tài liệu J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968).

Thuật ngữ "kháng thể" được mô tả trong sáng chế thường được dùng để chỉ globulin miễn dịch, là cấu trúc chuỗi tetrapeptit gồm hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua liên chuỗi. Thành phần và thứ tự của axit amin trong (các) vùng cố định chuỗi nặng của globulin miễn dịch là khác nhau, vì thể tính kháng nguyên của chúng cũng khác nhau. Do đó, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm loại, cũng được biết đến dưới dạng các isotyp của globulin miễn dịch, đó là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, và các chuỗi nặng tương ứng của chúng là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ , tương ứng. Cùng một loại Ig có thể còn được chia tiếp thành các nhóm phụ khác nhau theo sự khác nhau về thành phần axit amin của vùng bản lề và số và vị trí của các liên kết disulfua trong chuỗi nặng. Ví dụ, IgG có thể được phân loại thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Chuỗi nhẹ được phân loại thành chuỗi κ hoặc chuỗi λ theo sự khác nhau về vùng cố định. Mỗi loại trong số năm loại Ig có thể có chuỗi κ hoặc chuỗi λ .

Theo sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế có thể còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ, mà bao gồm các chuỗi κ , λ của chuột hoặc của người hoặc biến thể của chúng.

Theo sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế có thể còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng, mà bao gồm IgG1, 2, 3, 4 của chuột hoặc của người hoặc biến thể của chúng.

Trình tự gồm khoảng 110 axit amin gần đầu N của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của

kháng thể khác nhau rất lớn và là vùng biến đổi (vùng V); trình tự axit amin còn lại gần đầu C là tương đối ổn định và là vùng cố định (vùng C). Vùng biến đổi bao gồm 3 vùng siêu biến (hypervariable region-HVR) và 4 vùng khung (framework region-FR) với các trình tự tương đối bảo toàn. Ba vùng siêu biến mà quyết định tính đặc hiệu của kháng thể, và cũng được biết đến là các vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining region-CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm ba vùng CDR và 4 vùng FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxyl theo thứ tự: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ba vùng CDR của chuỗi nhẹ được dùng để chỉ LCDR1, LCDR2, và LCDR3; và ba vùng CDR của chuỗi nặng được dùng để chỉ HCDR1, HCDR2, và HCDR3. Số và vị trí của các gốc axit amin trong CDR của vùng VL và vùng VH của kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế tuân theo tiêu chuẩn đánh số Kabat hoặc Chothia đã biết hoặc tiêu chuẩn định nghĩa AbM (<http://bioinf.org.uk/abs/>).

Thuật ngữ "tế bào trình diện kháng nguyên" hoặc "APC" là tế bào mà trình diện kháng nguyên ngoại lai tạo phức với MHC trên bề mặt tế bào. Các tế bào T sử dụng các thụ thể tế bào T (T cell receptor-TCR) để nhận diện các phức hợp này. Các ví dụ về APC bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào tua (dendritic cell-DC), tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell-PBMC), các bạch cầu đơn nhân, nguyên bào lympho B và các tế bào tua (DC) có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân. Thuật ngữ "trình diện kháng nguyên" được dùng để chỉ quá trình mà qua đó các APC sẽ bắt giữ các kháng nguyên và khiến cho chúng được nhận diện bởi các tế bào T, ví dụ dưới dạng một thành phần của thể tiếp hợp MHC-I/MHC-II.

Thuật ngữ "B7-H4" được dùng để chỉ một thành viên thuộc họ protein B7 của người, cũng được biết đến là CD276, là một protein xuyên màng typ I có bốn miền ngoại bào giống Ig. B7-H4 là một trong số các protein trọng yếu của hệ miễn dịch được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào trình diện kháng nguyên hoặc tế bào ung thư, và có tác dụng ức chế sự hoạt hóa chức năng của các tế bào T. Thuật ngữ "B7-H4" bao gồm biến thể bất kỳ hoặc dạng đồng dạng của B7-H4 mà được biểu hiện một cách tự nhiên bởi các tế bào. Các kháng thể theo sáng chế có thể phản ứng chéo với B7-H4 thu được từ các loài không phải người. Theo một lựa chọn khác, các kháng thể cũng có thể đặc hiệu với B7-H4 người và có thể không thể hiện khả năng phản ứng chéo với các loài khác. B7-H4 hoặc biến thể bất kỳ hoặc dạng đồng dạng của nó có thể được phân lập từ các tế bào hoặc các mô biểu hiện nó một cách tự nhiên, hoặc được tổng hợp bằng các kỹ thuật tái tổ hợp sử dụng các kỹ thuật thường

được dùng trong lĩnh vực kỹ thuật này và các kỹ thuật được mô tả ở đây. Tốt hơn là, kháng thể kháng B7-H4 nhằm vào B7-H4 người có kiểu glycosyl bình thường.

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp" bao gồm các kháng thể người được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương pháp tái tổ hợp, và các kỹ thuật và phương pháp có liên quan đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ (1) các kháng thể được phân lập từ các động vật chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể (ví dụ chuột nhắt) biểu hiện các gen globulin miễn dịch của người, hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó; (2) các kháng thể được phân lập từ các tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể, như tế bào chuyển nhiễm; (3) các kháng thể được phân lập từ các thư viện kháng thể người tổ hợp tái tổ hợp; cũng như là (4) các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách ghép nối các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự ADN khác và bằng các phương pháp khác. Các kháng thể người tái tổ hợp như vậy bao gồm các vùng biến đổi và (các) vùng cố định, mà sử dụng các trình tự globulin miễn dịch đặc hiệu dòng mầm của người được mã hóa bởi các gen dòng mầm, kể cả bao gồm các dạng sắp xếp lại và các dạng đột biến sau đó xuất hiện trong quá trình trưởng thành của kháng thể.

Thuật ngữ "kháng thể chuột" trong sáng chế là kháng thể đơn dòng kháng B7-H4 của người được điều chế theo kiến thức và kỹ năng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong quá trình sản xuất, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên B7-H4, và sau đó tế bào lai biểu hiện kháng thể có trình tự hoặc các đặc tính chức năng mong muốn được phân lập. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể B7-H4 của chuột hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó còn bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của chúng, hoặc còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc biến thể của chúng.

Thuật ngữ "kháng thể người" bao gồm các kháng thể với (các) vùng cố định và biến đổi của các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các kháng thể người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin mà không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (như các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí hoặc gây đột biến ngẫu nhiên *in vitro* hoặc các đột biến soma *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể người" không bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của loài động vật có vú khác (như chuột nhắt) được ghép với các trình tự khung của người (đó là "kháng thể được làm tương thích với người").

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người", cũng được biết đến là kháng

thể được ghép CDR, được dùng để chỉ kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR của chuột vào khung của các vùng biến đổi của kháng thể người. Kháng thể được làm tương thích với người có thể tránh được các phản ứng đáp ứng miễn dịch mạnh được gây ra bởi các kháng thể khảm mang một lượng lớn các thành phần protein của chuột. Để tránh việc làm giảm hoạt tính do tính sinh miễn dịch giảm, các vùng biến đổi của kháng thể người có thể được tiến hành đột biến ngược ở mức tối thiểu để duy trì hoạt tính.

Thuật ngữ "kháng thể khảm", là kháng thể được tạo ra bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể chuột với vùng cố định của kháng thể người, mà có thể làm giảm đáp ứng miễn dịch được gây ra bởi kháng thể chuột. Việc tạo ra kháng thể khảm, trước hết, đòi hỏi tạo ra một tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu của chuột, sau đó tách dòng gen vùng biến đổi từ tế bào lai của chuột, và sau đó tách dòng gen vùng cố định của kháng thể người nếu cần, liên kết gen vùng biến đổi của chuột với gen của vùng cố định của người để tạo thành gen khảm, mà được cài vào vector biểu hiện của người, và cuối cùng biểu hiện phân tử kháng thể khảm trong hệ có nhân thực dùng trong công nghiệp hoặc hệ nhân sơ dùng trong công nghiệp. (Các) vùng cố định của kháng thể người có thể được chọn từ (các) vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là bao gồm (các) vùng cố định chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 người, hoặc sử dụng IgG1 có độc tính ADCC (tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) tăng cường sau khi gây đột biến axit amin.

Thuật ngữ "đoạn gắn kết với kháng nguyên" được dùng để chỉ các đoạn gắn kết với kháng nguyên và các dạng tương tự kháng thể của kháng thể, mà thường bao gồm ít nhất một phần của vùng gắn kết với kháng nguyên hoặc các vùng biến đổi (ví dụ, một hoặc nhiều CDR) của kháng thể gốc. Đoạn kháng thể vẫn giữ được ít nhất phần nào tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể gốc. Nói chung, khi hoạt tính được biểu thị trên cơ sở mol, thì đoạn kháng thể vẫn có ít nhất 10% hoạt tính gắn kết của kháng thể gốc. Tốt hơn là, đoạn kháng thể vẫn có ít nhất 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 100% hoặc hơn 100% ái lực gắn kết của kháng thể gốc với đích. Ví dụ về các đoạn gắn kết với kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: Fab, Fab', F(ab')₂, đoạn Fv, kháng thể mạch thẳng, kháng thể chuỗi đơn, nanobody, kháng thể miễn và kháng thể đa đặc hiệu. Các biến thể của kháng thể được thao tác di truyền được xem xét trong tài liệu Holliger and Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136.

"Đoạn Fab" bao gồm CH1 và các vùng biến đổi của một chuỗi nhẹ và một chuỗi nặng.

Chuỗi nặng của phân tử Fab không thể tạo các liên kết disulfua với phân tử chuỗi nặng khác.

Vùng "Fc" bao gồm hai đoạn chuỗi nặng chứa các miền CH1 và CH2 của kháng thể. Hai đoạn chuỗi nặng được gắn với nhau nhờ hai hoặc nhiều liên kết disulfua và thông qua tương tác kỵ nước của miền CH3.

Đoạn "Fab'" bao gồm chuỗi nhẹ và một phần của chuỗi nặng mà bao gồm miền VH, miền CH1 và vùng giữa các miền CH1 và CH2, sao cho các liên kết disulfua liên chuỗi có thể được tạo thành giữa hai chuỗi nặng của hai đoạn Fab, để tạo thành phân tử $F(ab')_2$.

"Đoạn $F(ab')_2$ " bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng chứa một phần của vùng cố định giữa các miền CH1 và CH2, nhờ đó tạo thành các liên kết disulfua liên chuỗi giữa hai chuỗi nặng. Do đó, đoạn $F(ab')_2$ gồm hai đoạn Fab' được gắn với nhau bằng các liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng.

"Vùng Fv" bao gồm các vùng biến đổi từ cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, nhưng thiếu (các) vùng cố định.

Thuật ngữ "kháng thể đa đặc hiệu" được sử dụng với nghĩa rộng nhất của nó, bao gồm các kháng thể có tính đặc hiệu polypeptit. Các kháng thể đa đặc hiệu này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó đơn vị VH-VL có tính đặc hiệu đa epitop; các kháng thể có hai hoặc nhiều vùng VL và VH, mỗi đơn vị VH-VL gắn kết với các đích khác nhau hoặc các epitop khác nhau của cùng một đích; các kháng thể có hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn, mỗi vùng biến đổi đơn gắn kết với các đích khác nhau hoặc các epitop khác nhau của cùng một đích; các kháng thể có chiều dài đầy đủ, các đoạn kháng thể, diabody, các diabody đặc hiệu kép và triabody, các đoạn kháng thể mà gắn kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với nhau, và dạng tương tự.

Thuật ngữ "kháng thể chuỗi đơn" là một protein tái tổ hợp chuỗi đơn được tạo ra nhờ liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể thông qua peptit liên kết. Kháng thể chuỗi đơn là đoạn kháng thể nhỏ nhất với vị trí gắn kết kháng nguyên đầy đủ.

Thuật ngữ "đoạn kháng thể miền" là một đoạn globulin miễn dịch có các chức năng miễn dịch mà chỉ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Trong một vài trường hợp, hai hoặc nhiều vùng VH được liên kết cộng hóa trị với peptit liên kết để tạo thành đoạn kháng thể miền hai giá. Hai vùng VH của đoạn kháng thể miền hai giá có

thể hướng đích vào cùng một kháng nguyên hoặc các kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ "liên kết với B7-H4" theo sáng chế được dùng để chỉ khả năng tương tác với B7-H4 người. Thuật ngữ "vị trí gắn kết với kháng nguyên" theo sáng chế được dùng để chỉ vị trí ba chiều mà nằm rải rác trên kháng nguyên và được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" và "gắn kết chọn lọc" được sử dụng trong sáng chế được dùng để chỉ việc gắn kết kháng thể với epitop trên kháng nguyên tiền định. Nói chung, khi B7-H4 người tái tổ hợp được sử dụng làm chất phân tích và kháng thể được sử dụng làm phối tử, khi được đo bằng công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance-SPR) trong một thiết bị, thì kháng thể gắn kết với kháng nguyên định trước với hằng số phân ly cân bằng (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M hoặc thậm chí còn nhỏ hơn, và ái lực gắn kết của nó với kháng nguyên tiền định ít nhất bằng hai lần ái lực gắn kết của nó với các kháng nguyên không đặc hiệu (ngoài kháng nguyên định trước hoặc các kháng nguyên có quan hệ gần, như BSA và dạng tương tự). Thuật ngữ "kháng thể nhận diện kháng nguyên" có thể được sử dụng thay đổi cho thuật ngữ "kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với..." trong sáng chế.

Thuật ngữ "phản ứng chéo" được dùng để chỉ khả năng kháng thể theo sáng chế gắn kết với B7-H4 từ các loài khác nhau. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế mà gắn kết với B7-H4 người có thể gắn kết với B7-H4 của loài khác. Mức phản ứng chéo được đo bằng cách phát hiện khả năng phản ứng đặc hiệu với các kháng nguyên đã tinh chế trong thử nghiệm gắn kết (ví dụ SPR và ELISA), hoặc bằng cách gắn kết hoặc tương tác chức năng với các tế bào mà biểu hiện sinh lý B7-H4. Các phương pháp xác định khả năng phản ứng chéo bao gồm các thử nghiệm gắn kết chuẩn như được mô tả ở đây, ví dụ phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) hoặc phép đo dòng chảy tế bào.

Thuật ngữ "ức chế" hoặc "phong bế" có thể được sử dụng thay đổi cho nhau và bao gồm cả ức chế/phong bế một phần hoặc hoàn toàn. Ức chế/phong bế phối tử tốt hơn là làm giảm hoặc thay đổi mức hoặc loại hoạt tính thông thường mà xuất hiện khi xảy ra sự gắn kết phối tử mà không ức chế hoặc phong bế. Ức chế và phong bế cũng được dự định là bao gồm việc làm giảm ái lực gắn kết của phối tử có thể đo được khi tiếp xúc với kháng thể kháng B7-H4, so với ái lực gắn kết của phối tử khi được tiếp xúc với kháng thể kháng B7-H4.

Thuật ngữ "ức chế sự phát triển" (ví dụ khi được dùng để chỉ các tế bào) được dự định

là bao gồm việc làm giảm sự phát triển tế bào có thể đo được.

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch được cảm ứng" và "đáp ứng miễn dịch được tăng cường" có thể được sử dụng thay đổi cho nhau và được dùng để chỉ đáp ứng miễn dịch với sự kích thích bởi kháng nguyên đặc hiệu (tức là, thụ động hoặc thích ứng). Thuật ngữ "cảm ứng" được dùng trong thuật ngữ "cảm ứng CDC hoặc ADCC" được dùng để chỉ việc kích thích cơ chế riêng tiêu diệt tế bào trực tiếp.

"ADCC" theo sáng chế, tức là tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, có nghĩa là các tế bào biểu hiện các thụ thể Fc tiêu diệt trực tiếp các tế bào đích được phủ kháng thể bằng cách nhận diện đoạn Fc của kháng thể. Chức năng tác dụng ADCC của các kháng thể có thể được tăng cường, làm giảm hoặc loại bỏ bằng cách cải biến đoạn Fc của IgG. Cải biến được dùng để chỉ các đột biến trong vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể.

Các phương pháp để tổng hợp và tinh chế các kháng thể và các đoạn gắn kết với kháng nguyên là đã biết rõ và có thể được tìm thấy trong giải pháp kỹ thuật đã biết, như *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, chapters 5-8 and 15. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch bằng B7-H4 của người hoặc đoạn của nó, và các kháng thể thu được sau đó có thể được phục hồi đặc tính và tinh chế và tiến hành giải trình tự axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Đoạn gắn kết với kháng nguyên cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế được thao tác di truyền để đưa một hoặc nhiều vùng FR của người vào các vùng CDR không phải của người. Các trình tự dòng mầm FR của người có thể thu được từ trang web ImmunoGeneTics (IMGT) <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ *The Immunoglobulin FactsBook*, 2001 ISBN 012441351.

Các kháng thể được thao tác di truyền hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Các trình tự cADN của các kháng thể tương ứng có thể được tách dòng và tái tổ hợp vào vector biểu hiện GS. Vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào tế bào CHO. Theo giải pháp kỹ thuật được khuyến nghị nhiều, hệ biểu hiện của động vật có vú có thể dẫn đến việc glycosyl hóa kháng thể, đặc biệt là ở đầu N được bảo toàn cao của vùng Fc. Các dòng ổn định được tạo ra bằng cách biểu hiện các kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên của người. Các dòng dương tính có thể được nhân rộng trong môi trường không chứa huyết thanh chứa trong các bình phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi

trường nuôi cấy mà kháng thể được tiết vào đó có thể được tinh chế và thu gom bằng các kỹ thuật thông thường. Các kháng thể có thể được lọc và cô bằng các phương pháp thông thường. Các multimer và hỗn hợp hòa tan cũng có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, ví dụ rây phân tử và trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được đông lạnh ngay lập tức, như ở nhiệt độ -70°C , hoặc được đông khô.

Kháng thể theo sáng chế được dùng để chỉ kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng (mAb) được mô tả theo sáng chế được dùng để chỉ kháng thể thu được từ chủng tế bào được tách dòng đơn, chủng tế bào này không bị giới hạn ở chủng tế bào có nhân thực, chủng tế bào nhân sơ hoặc chủng tế bào được tách dòng bằng thể thực khuẩn. Các kháng thể đơn dòng hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp nhờ, ví dụ, công nghệ tế bào lai, công nghệ tái tổ hợp, công nghệ biểu hiện qua thể thực khuẩn, công nghệ tổng hợp (như ghép CDR) hoặc các công nghệ hiện có khác.

"Sử dụng" và "điều trị", nếu được áp dụng cho động vật, người, đối tượng thí nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, được dùng để chỉ việc cho thuốc ngoại sinh, chất điều trị, chất chẩn đoán hoặc chế phẩm tiếp xúc với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. "Sử dụng" và "điều trị" có thể được dùng để chỉ việc điều trị, các thông số được động học, các phương pháp chẩn đoán, nghiên cứu và thử nghiệm. Việc điều trị tế bào bao gồm cho chất phản ứng tiếp xúc với tế bào, và cho chất phản ứng tiếp xúc với dịch, trong đó dịch này được cho tiếp xúc với tế bào. "Sử dụng" và "điều trị" cũng có nghĩa là điều trị các tế bào bằng các chất phản ứng, chất chẩn đoán, các chế phẩm gắn kết hoặc bằng loại tế bào khác *in vitro* và *ex vivo* chẳng hạn. "Điều trị", nếu được áp dụng cho người, thú ý hoặc đối tượng nghiên cứu, được dùng để chỉ việc điều trị chữa bệnh, các biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn ngừa, các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

Thuật ngữ "điều trị" được dùng để chỉ việc sử dụng chất điều trị nội sinh hoặc ngoại sinh, ví dụ chế phẩm chứa hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất gắn kết theo sáng chế, cho bệnh nhân có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà chất điều trị được biết đến là có tác dụng điều trị. Thông thường, chất điều trị được sử dụng với lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở bệnh nhân hoặc nhóm bệnh nhân cần điều trị, để làm thoái lui các triệu chứng như vậy hoặc ức chế sự tiến triển của các triệu chứng này đến mức có thể đánh giá được trên lâm sàng. Lượng chất điều trị mà hữu hiệu để làm thuyên giảm triệu chứng bệnh cụ thể bất kỳ (cũng được dùng để chỉ là "lượng hữu hiệu để điều trị") có thể khác nhau tùy thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ tình trạng bệnh, độ tuổi, và thể trọng của

bệnh nhân, và khả năng dược chất gây ra tác dụng điều trị mong muốn ở bệnh nhân. Liệu triệu chứng bệnh đã được làm thuyên giảm hay không có thể được đánh giá bằng các phương pháp thử nghiệm lâm sàng bất kỳ thường được sử dụng bởi bác sỹ hoặc các chuyên gia chăm sóc sức khỏe khác để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó. Mặc dù các phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc sản phẩm điều trị) có thể không có hiệu quả trong việc làm thuyên giảm mỗi triệu chứng bệnh quan tâm, nhưng chúng cần làm giảm triệu chứng bệnh quan tâm ở một số bệnh nhân có ý nghĩa thống kê, như được xác định theo các phương pháp kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như kiểm định t Student, kiểm định chi bình phương, kiểm định U theo Mann và Whitney, kiểm định Kruskal-Wallis (kiểm định H), kiểm định Jonckheere-Terpstra và kiểm định Wilcoxon.

Thuật ngữ "về cơ bản bao gồm....." hoặc biến thể của nó được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ có nghĩa là bao gồm toàn bộ các yếu tố hoặc nhóm yếu tố được mô tả, và tùy ý bao gồm các yếu tố khác có bản chất tương tự hoặc khác với các yếu tố được mô tả, mà không làm thay đổi đáng kể các đặc tính cơ bản hoặc mới của phác đồ dùng liều, phương pháp hoặc chế phẩm được đề cập. Theo một ví dụ không giới hạn, hợp chất gắn kết về cơ bản bao gồm trình tự axit amin được đề cập cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin, mà không làm ảnh hưởng đáng kể đến các đặc tính của hợp chất gắn kết.

Thuật ngữ "có nguồn gốc trong tự nhiên" được áp dụng cho đối tượng nhất định theo sáng chế được dùng để chỉ thực tế là đối tượng này có thể được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ, trình tự polypeptit hoặc trình tự polynucleotit dường như là có nguồn gốc trong tự nhiên, nếu nó tồn tại trong các sinh vật (kể cả virus) và có thể được phân lập từ các nguồn tự nhiên, và không được cải biến nhân tạo trong phòng thí nghiệm.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" bao gồm lượng đủ để làm giảm hoặc ngăn ngừa triệu chứng hoặc tình trạng bệnh. Lượng hữu hiệu cũng có thể được dùng để chỉ lượng đủ để cho phép hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc chẩn đoán. Lượng hữu hiệu dùng cho một bệnh nhân hoặc đối tượng thú y cụ thể có thể khác nhau tùy thuộc vào các yếu tố sau: như tình trạng bệnh được điều trị, tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân, phương pháp, đường dùng và liều sử dụng của thuốc, và mức độ nghiêm trọng của các tác dụng phụ. Lượng hữu hiệu có thể là liều tối đa hoặc phác đồ dùng liều tránh được các tác dụng phụ hoặc tác dụng độc một cách đáng kể.

"Ngoại sinh" được dùng để chỉ các chất được tổng hợp bên ngoài sinh vật, tế bào hoặc

cơ thể người tùy theo các tình huống. "Nội sinh" được dùng để chỉ các chất được tổng hợp trong tế bào, sinh vật, hoặc cơ thể người tùy theo các tình huống.

"Tính tương đồng" được dùng để chỉ tính tương đồng trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai trình tự polypeptit. Nếu các vị trí trong hai trình tự cần so sánh được chiếm giữ bởi cùng một tiểu đơn vị monome axit amin hoặc bazơ, ví dụ nếu mỗi vị trí của hai phân tử ADN bị chiếm giữ bởi adenin, thì các phân tử này là tương đồng ở vị trí đó. Tỷ lệ tương đồng giữa hai trình tự là một hàm số các vị trí bắt cặp hoặc tương đồng có chung bởi hai trình tự chia cho số vị trí được so sánh nhân với 100%. Ví dụ, khi so sánh trình tự tối ưu, nếu 6 trong số 10 vị trí trong hai trình tự được bắt cặp hoặc tương đồng, thì hai trình tự này tương đồng 60%. Nói chung, tiến hành so sánh khi hai trình tự được sắp thẳng hàng để thu được tỷ lệ tương đồng tối đa.

Thuật ngữ "tế bào," "dòng tế bào," và "chủng nuôi cấy tế bào" sử dụng ở đây có thể được sử dụng thay đổi cho nhau và tất cả các thuật ngữ này bao gồm cả thể hệ con. Do đó, các thuật ngữ "tế bào biến nạp" và "tế bào đã biến nạp" bao gồm các tế bào thử nghiệm và các chủng nuôi cấy sơ cấp thu được từ đó bất kể số lần cấy chuyển. Cần hiểu rằng do các đột biến cố ý hoặc không cố ý, tất cả thể hệ con có thể không giống nhau hoàn toàn về lượng ADN. Thể hệ con đột biến có cùng hoạt tính sinh học hoặc chức năng như được sàng lọc trong các tế bào đã biến nạp ban đầu được bao gồm. Nếu có các tên khác được đề cập, thì sẽ được hiểu rõ ràng theo ngữ cảnh.

"Tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống đi sau thuật ngữ này có thể xảy ra, nhưng không nhất thiết phải xảy ra, và thuật ngữ này bao gồm các ví dụ trong đó sự kiện hoặc tình huống xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, "tùy ý bao gồm 1 đến 3 vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể" có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có các trình tự cụ thể có thể có mặt nhưng không nhất thiết phải có mặt.

"Dược phẩm" có nghĩa là hỗn hợp chứa một hoặc nhiều hợp chất được mô tả ở đây, hoặc muối dược dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý hoặc tiền dược chất của chúng, và các thành phần hóa học khác, cũng như là các thành phần khác như chất mang và tá dược dược dụng/chấp nhận được về mặt sinh lý. Mục đích của dược phẩm là nhằm thúc đẩy việc sử dụng cho sinh vật, tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu dược chất và nhờ đó tạo ra tác dụng sinh học. Quy trình sản xuất dược phẩm thông thường được mô tả trong dược điển Trung Quốc.

"Muối dược dụng" được dùng để chỉ muối của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo

sáng chế, mà an toàn và hiệu quả để sử dụng ở động vật có vú và có hoạt tính sinh học mong muốn. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo sáng chế bao gồm ít nhất một nhóm amino, do đó nó có thể tạo thành muối với axit. Các ví dụ không giới hạn về muối được dụng bao gồm: hydroclorua, hydrobromua, hydroiodua, sulfat, hydro sulfat, xitrat, axetat, succinat, ascorbat, oxalat, nitrat, sorbat, hydro phosphat, dihydro phosphat, salixylat, hydro xitrat, tartrat, maleat, fumarat, format, benzoat, metansulfonat, etansulfonat, benzensulfonat và p-toluensulfonat.

Thuật ngữ "solvat" được dùng để chỉ solvat được dụng được tạo thành bởi thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo sáng chế và một hoặc nhiều phân tử dung môi. Các ví dụ không giới hạn về các phân tử dung môi bao gồm: nước, etanol, axetonitril, isopropanol và etyl axetat.

Thuật ngữ "được chất gây độc tế bào", nếu được sử dụng trong sáng chế, được dùng để chỉ chất mà ức chế chức năng của tế bào và/hoặc gây chết tế bào hoặc phá hủy tế bào.

Thuật ngữ "chất ức chế tubulin" được dùng để chỉ nhóm hợp chất mà can thiệp vào quá trình phân bào của tế bào bằng cách ức chế quá trình polyme hóa tubulin hoặc thúc đẩy sự kết tụ tubulin, nhờ đó tạo ra tác dụng chống khối u. Các ví dụ không giới hạn về chất này bao gồm: maytansinoid, calicheamicin, taxan, vincristin, colchicin, dolastatin/auristatin/monomethyl auristatin E (MMAE)/monomethyl auristatin F (MMAF).

"Yếu tố liên kết" được dùng để chỉ gốc hóa học trong đó kháng thể được gắn kết cộng hóa trị với liên kết cộng hóa trị hoặc chuỗi nguyên tử của được chất. Các ví dụ không giới hạn về yếu tố liên kết bao gồm: arylen, heteroarylen, PEG, polymetylenoxy, succinat, succinamit, diglycolat, malonat và caproamit.

"Tải thuốc" (DAR) được biểu thị bởi y, mà là số trung bình của các thuốc gây độc tế bào trên mỗi kháng thể trong công thức (A). Khoảng tải thuốc theo sáng chế có thể là 1-20 thuốc gây độc tế bào (D) cho mỗi kháng thể. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) là tập hợp các kháng thể được tiếp hợp với một khoảng nhất định (1-20) của các thuốc gây độc tế bào. Tải thuốc (DAR) ở thể tiếp hợp kháng thể-được chất từ phản ứng liên kết có thể được xác định bằng các biện pháp thông thường, ví dụ phép đo phổ khối, HPLC và ELISA. Bằng các biện pháp này, mức phân bố định lượng của thể tiếp hợp kháng thể-được chất biểu thị bằng giá trị y có thể được xác định.

2. Các thuật ngữ viết tắt

MC = 6-maleimidohexanoyl

VC = valin-citrullin

PAB = p-aminobenzyloxycarbonyl

MMAE = monomethyl auristatin E (MW 718)

MMAF = biến thể của monomethyl auristatin E, mà có phenylalanin ở đầu C của phân tử (MW 731,5).

Các ví dụ được đưa vào dưới đây để mô tả thêm sáng chế, tuy nhiên các ví dụ này không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các phương pháp thử nghiệm với các điều kiện cụ thể trong các ví dụ theo sáng chế thường theo các điều kiện thông thường, như *Antibodies: A Laboratory Manual* and *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor; hoặc theo các điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất sản phẩm hoặc nguyên liệu thô. Các chất phản ứng với nguồn gốc không được chỉ rõ là các chất phản ứng thông thường được mua trên thị trường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế kháng nguyên và tạo ra dòng tế bào ổn định

Trình tự mã hóa B7-H4 người có đuôi his (huB7-H4-His) và trình tự mã hóa B7-H4 người có đuôi Fc (huB7-H4-Fc) được tổng hợp bằng công nghệ ADN hợp nhất (IDT) của CRO (các trình tự khuôn mẫu của các protein tái tổ hợp B7-H4 trên đây đều được thiết kế theo sáng chế) và lần lượt được tách dòng vào các vector pTT5 (Biovector). Sau khi các protein B7-H4 tái tổ hợp được biểu hiện trong các tế bào 293T, chúng được tinh chế bằng các phương pháp thử nghiệm sau, và các protein đã tinh chế có thể được sử dụng trong các thử nghiệm sau trong các ví dụ.

Trình tự của huB7-H4-His:

MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPD
IKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLR
LKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEA
PRWFPQPTVWVASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYS
CMIENDIAKATGDIKVTSEIKRRSHLQLLSKADYKDDDDKGSHHHHHHHH

SEQ ID NO: 1

Trình tự của huB7-H4-Fc:

FGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKE
GKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKG

NANLEYKTGAFSMPEVNVNDYNASSETLRCEAPRWFQPTVVWASQVDQGANFS
 EVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTSEIKRR
 SHLQLLSKAGSGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2

Các bước tinh chế huB7-H4-His:

Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào HEK293 được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ tạp chất. Dung dịch đệm được thay thế bằng PBS và được bổ sung imidazol đến nồng độ cuối cùng bằng 5 mM. Các cột niken được làm cân bằng bằng dung dịch PBS chứa imidazol 5 mM và rửa bằng 2 đến 5 lần thể tích cột. Mẫu dịch nổi thu được sau khi thay thế được nạp vào cột. Cột được rửa bằng dung dịch PBS chứa imidazol 5 mM cho đến khi mức đọc tại A280 giảm đến mức cơ sở. Sau đó cột sắc ký được rửa bằng PBS+imidazol 10 mM để loại bỏ các tạp chất protein gắn kết không đặc hiệu, và dịch rửa giải được thu gom. Các protein đích sau đó được giải hấp bằng dung dịch PBS chứa imidazol 300 mM, và các đỉnh giải hấp được thu gom. Nước giải hấp thu gom được tinh chế tiếp bằng cách trao đổi ion (cột SP). Dung dịch điều chế A: PB 0,01 M, pH 8,0. Dung dịch điều chế B: Dung dịch A + NaCl 1 M. Trước tiên, dung dịch PBS chứa imidazol với protein đích đã giải hấp được thay thế bằng dung dịch A, cột SP được làm cân bằng bằng cách sử dụng dung dịch A, và mẫu được tải. Gradient nồng độ của dung dịch B là 0-100%. Mẫu được giải hấp với 10 lần thể tích cột, và mỗi đỉnh giải hấp được thu gom. Protein thu được được xác định là chính xác bằng kỹ thuật điện di, bản đồ peptit và sắc ký lỏng-phép đo phổ khối (LC-MS), và sau đó được chia nhỏ để sử dụng.

Các bước tinh chế huB7-H4-Fc:

Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào HEK293 được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ tạp chất. Dung dịch đệm được thay thế bằng PBS. Cột ái lực protein A được làm cân bằng bằng dung dịch đệm PBS 10 mM và được rửa 2-5 lần thể tích cột. Mẫu dịch nổi thu được sau khi thay thế được nạp vào cột. Cột được rửa bằng dung dịch đệm 25 lần thể tích cột cho đến khi mức đọc tại A280 giảm đến mức cơ sở. Protein đích được giải hấp bằng 0,8% dung dịch đệm axetat có pH 3,5, và các đỉnh giải hấp được thu gom. Sau khi chia nhỏ, dung dịch đệm

Tris-Cl 1M pH 8,0 được bổ sung ngay lập tức để trung hòa. Sau đó dung dịch được thay thế bằng PBS pH 6,9 bằng cách sử dụng cột lọc Millipore's Amico-15. Protein thu được được xác định bằng kỹ thuật điện di, bản đồ peptit và sắc ký lỏng-đo phổ khối (LC-MS), và sau đó được chia nhỏ để sử dụng.

Tạo nhóm tế bào CHO-S ổn định:

Các trình tự có chiều dài đầy đủ mã hóa protein B7-H4 của người hoặc của khỉ cynomolgus (huB7-H4 hoặc cyB7-H4) được tổng hợp bằng công nghệ ADN tích hợp (IDT) (các trình tự khuôn mẫu của protein tái tổ hợp B7-H4 nêu trên đều được thiết kế theo sáng chế), và lần lượt được tách dòng trong vector pcDNA3.1 đã cải biến, pcDNA3.1/puro (Invitrogen #V79020). Các tế bào CHO-S (ATCC) được nuôi cấy trong môi trường CD-CHO (Life Technologies, #10743029) đến $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml. 10 μ g vector mã hóa gen huB7-H4 hoặc cyB7-H4 được trộn với 50 μ l LF-LTX (Life Technologies, #A12621) trong 1 ml môi trường Opti-MEM (Life Technologies, #31985088). Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào CHO. Các tế bào được đặt trong tủ ủ cacbon dioxid để nuôi cấy. Sau 24 giờ, môi trường nuôi cấy tế bào được thay thế bằng môi trường mới và được bổ sung 10 μ g/ml puromyxin. Sau đó, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng môi trường mới cứ 2-3 ngày một lần, và thu được nhóm tế bào CHO-S ổn định sau 10-12 ngày chọn lọc.

Ví dụ 2: Tạo ra tế bào lai của chuột và các trình tự kháng thể

Tổng cộng 5 con chuột Balb/c và 5 con chuột cái 10 tuần tuổi A/J được gây miễn dịch bằng kháng nguyên của người huB7-H4-Fc. Tá được Freund đầy đủ Sigma (CFA) và tá được Freund không đầy đủ Sigma (IFA) được sử dụng. Chất kháng nguyên và tá được miễn dịch được trộn hoàn toàn và được nhũ hóa theo tỷ lệ 1:1 để tạo ra dung dịch “nước trong dầu” ổn định. Liều tiêm là 25 μ g/200 μ L/chuột.

Ngày 01: Gây miễn dịch lần thứ nhất, tá được Freund đầy đủ.

Ngày 21: Gây miễn dịch lần thứ hai, tá được Freund không đầy đủ.

Ngày 35: Gây miễn dịch lần thứ ba, tá được Freund không đầy đủ.

Ngày 42: Lấy mẫu máu và xét nghiệm hiệu giá huyết thanh (máu sau 3 lần gây miễn dịch).

Ngày 49: Gây miễn dịch lần thứ tư, tá được Freund không đầy đủ.

Ngày 56: Lấy mẫu máu và xét nghiệm hiệu giá huyết thanh (máu sau 4 lần gây miễn dịch).

Phương pháp ELISA gián tiếp được sử dụng để phát hiện ái lực của kháng thể hoặc huyết thanh: protein huB7-H4-His được pha loãng đến nồng độ 1µg/ml bằng PBS pH7,4, và bổ sung ở nồng độ 100µl/lỗ vào đĩa ELISA ái lực cao có 96 lỗ, và được làm lạnh ở nhiệt độ 4°C để ủ qua đêm (16-20 giờ). Đĩa được rửa 4 lần bằng PBST (pH 7,4 PBS chứa 0,05% Tween-20). Dung dịch phong bế albumin huyết thanh bò (BSA) 3% đã pha loãng bằng PBST được bổ sung ở nồng độ 150 µl/lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ để phong bế. Sau khi hoàn tất việc phong bế, dung dịch phong bế được loại bỏ và đĩa được rửa 4 lần bằng dung dịch đệm PBST. Kháng thể hoặc huyết thanh cần xét nghiệm được pha loãng bằng PBST chứa 3% BSA, để thu được gradien của 10 liều (pha loãng 10 lần) bắt đầu từ 1 µM, và được bổ sung vào đĩa vi chuẩn độ ở nồng độ 100 µl/lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi ủ xong, đĩa được rửa 4 lần bằng PBST, kháng thể thứ cấp của dê kháng người được đánh dấu HRP (Abcam, cat#ab97225) đã pha loãng bằng PBST chứa 3% BSA được bổ sung ở nồng độ 100 µl/lỗ, và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa được rửa 4 lần bằng PBST, sau đó cơ chất sinh màu TMB (Cell Signaling Technology, cat#7004S) được bổ sung ở nồng độ 100 µl/lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong 1 phút. Dung dịch dừng phản ứng (Cell Signaling Technology, cat#7002S) được bổ sung ở nồng độ 100 µl/lỗ để chấm dứt phản ứng. Giá trị hấp thụ được đọc ở bước sóng 450 nm bằng thiết bị đọc vi đĩa (BioTek, model Synergy H1). Số liệu được phân tích để thu được ái lực gắn kết của kháng thể hoặc huyết thanh với kháng nguyên B7-H4 của người.

Hiệu giá huyết thanh và khả năng huyết thanh của chuột đã cố định gắn kết với các kháng nguyên bề mặt tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp ELISA gián tiếp. Việc dung hợp tế bào được tiến hành theo các kết quả hiệu giá phát hiện được (lớn hơn 100.000 lần pha loãng). Chuột đã gây miễn dịch với hiệu giá huyết thanh cao, ái lực và khả năng gắn kết FACS được chọn lọc để gây miễn dịch lần cuối và sau đó bị giết. Các tế bào lách và các tế bào u tủy SP2/0 được dung hợp và cấy để thu được tế bào lai. Các tế bào lai đích được sàng lọc bằng ELISA gián tiếp và các chủng tế bào đơn dòng được tạo ra bằng phương pháp pha loãng giới hạn. Trong số các chủng kháng thể dương tính thu được, các chủng tế bào lai biểu hiện các kháng thể gắn kết không đặc hiệu còn được loại trừ bằng cách so sánh các tế bào CHO-S biểu hiện ổn định huB7-H4 và cyB7-H4, với các tế bào CHO-S trống. Các tế bào lai đích được sàng lọc bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự với phương pháp của thử nghiệm gắn kết tế bào *in vitro* trong ví dụ 5, và tạo ra các chủng tế bào đơn dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn. Các tế bào lai ở pha phát triển

logarit được thu gom. ARN được chiết bằng Trizol (Invitrogen, 15596-018) và tiến hành phản ứng phiên mã ngược (PrimeScript™ Reverse Transcriptase, Takara #2680A). cADN thu được bằng cách phiên mã ngược được khuếch đại bằng PCR với bộ đoạn mồi-Ig của chuột (Novagen, TB326 Rev.B 0503) và được giải trình tự. Cuối cùng, các trình tự của 4 chủng của kháng thể chuột được tạo ra để làm tương thích với người và tạo ra thể tiếp hợp kháng thể-được chất.

Các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 2G6 là như sau:

2G6 HCVR

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSRYGMSWVRQTPEKRLEWVAGINGG
GSYTYYLDTVKGRFTISRDNRSNTLYLQMSSLRSEDAMYYCVSQGSNYYFDYW
GQGTTLTVSSSEQ ID NO: 46

2G6 LCVR

DIRMTQSPSSMSVSLGDTVSIATCHASQGISSNIGWLQQKPGKSFKALIIYHGTNLED
GVPSRFSGSGSGADYSLTISSELEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 47

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 2G6 bao gồm các trình tự CDR sau:

Tên	Trình tự	Số
HCDR1	GFTFSRYGMS	SEQ ID NO: 3
HCDR2	GINGGGSYTYYLDTVKG	SEQ ID NO: 4
HCDR3	QGSNYYFDY	SEQ ID NO: 5
LCDR1	HASQGISSNIG	SEQ ID NO: 6
LCDR2	HGTNLED	SEQ ID NO: 7
LCDR3	VQYAQFPYT	SEQ ID NO: 8

Các trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 2F7 là như sau:

2F7 HCVR

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYYMSWVRQTPEKRLEWVAYVSSG
GGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAMYYCTRESYSQGNFYD
YWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 48

2F7 LCVR

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIG
IPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVIYCQNGHSFSLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 49

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 2F7 bao gồm các trình tự CDR sau:

Tên	Trình tự	Số
HCDR1	GFTFSNYYMS	SEQ ID NO: 9
HCDR2	YVSSGGGSTYYSDSVKG	SEQ ID NO: 10
HCDR3	ESYSQGNYFDY	SEQ ID NO: 11
LCDR1	RASQSIDYLH	SEQ ID NO: 12
LCDR2	FASQSIG	SEQ ID NO: 13
LCDR3	QNGHSFSLT	SEQ ID NO: 14

Các trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 2F8 là như sau:

2F8 HCVR

QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTNSWMNWAKLRPGQGLEWIGGIYP
NSGNIEYNEKFKGKATLTVDTSSTAYMDLTSLTSEDSAVYYCARDYRFSYWGQG
TLVTVSA

SEQ ID NO: 50

2F8 LCVR

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAVAWYQQKPGQSPKLLISSTSYRY
TGVPDRFTGSGSGTDFTFIISVQAEDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 51

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 2F8 bao gồm các trình tự CDR sau:

Tên	Trình tự	Số
HCDR1	GYTFTNSWMN	SEQ ID NO: 23
HCDR2	GIYPNSGNIEYNEKFKG	SEQ ID NO: 24
HCDR3	DSRFSY	SEQ ID NO: 25

LCDR1	KASQDVRTAVA	SEQ ID NO: 26
LCDR2	STSYRYT	SEQ ID NO: 27
LCDR3	QQHYSTPLT	SEQ ID NO: 28

Các trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 1C9 là như sau:

1C9 HCVR

QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGDTFTTYWMNWVKQRPGQGLEWIGGIYL
NSGSSEYNEKFKGKATLSVDTSSSTAYMDLSSLTSEDSAVYYCARDSEYWGQG
TLVTVSA

SEQ ID NO: 52

1C9 LCVR

DIVMTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPPELLISSASYRYT
GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYNTPLTFGAGTQLELK

SEQ ID NO: 53

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng chuột 1C9 bao gồm các trình tự CDR sau:

Tên	Trình tự	Số
HCDR1	GDTFTTY	SEQ ID NO: 29
HCDR2	YLNSGS	SEQ ID NO: 30
HCDR3	DSRFSY	SEQ ID NO: 31
LCDR1	KASQDVSTAVA	SEQ ID NO: 32
LCDR2	SASYRYT	SEQ ID NO: 33
LCDR3	QQHYNTPLT	SEQ ID NO: 34

Ví dụ 3: Thử nghiệm làm tương thích với người của các kháng thể chuột

Việc làm tương thích với người của các kháng thể đơn dòng chuột kháng B7-H4 người được tiến hành theo các phương pháp được công bố trong nhiều tài liệu trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói tóm lại, các miền cố định gốc (kháng thể chuột) được thay thế bằng các miền cố định của người. Theo sáng chế, các trình tự kháng thể dòng mầm của người được chọn lọc dựa vào tính tương đồng giữa các kháng thể chuột và các kháng thể người, và các kháng thể chuột 2G6, 2F7, 2F8 và 1C9 được làm tương thích với người. Các vùng

CDR của các kháng thể chuột 2G6 và 2F7 được ghép vào các khuôn mẫu được làm tương thích với người tương ứng đã chọn để thay thế các vùng biến đổi được làm tương thích với người, và sau đó tái tổ hợp (các) vùng cố định IgG (tốt hơn là, IgG1 đối với chuỗi nặng, và κ đối với chuỗi nhẹ). Sau đó, dựa trên cấu trúc ba chiều của các kháng thể chuột, các gốc được gắn vào, các gốc tương tác trực tiếp với các vùng CDR và các gốc có ảnh hưởng lớn đến cấu trúc của VL và VH được gây đột biến ngược, và các gốc axit amin không ổn định về mặt hóa học của các vùng CDR được làm tối ưu hóa, trong đó HCDR1 của kháng thể đơn dòng của chuột 2F8 được làm tối ưu hóa thành GYTFTSSWMN (SEQ ID NO: 43), HCDR2 được làm tối ưu hóa thành GIYPNRRGNIEY NEKFKG (SEQ ID NO: 44), HCDR2 của kháng thể đơn dòng chuột 1C9 được tối ưu hóa thành YLNRGS (SEQ ID NO: 45), và các kháng thể được làm tương thích với người được thiết kế bao gồm dạng tổ hợp của các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng dưới đây được tạo ra.

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu2G6 là như sau:

hu2G6 HCVR

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINGG
GSYTTYLD TVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVSQGSNYYFDYW
GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 15

hu2G6 LCVR

DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISSNIGWLQQKPGKAPKALIIYHGNTLED
GVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGG TKVEIK

SEQ ID NO: 16

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu2F7 là như sau:

hu2F7 HCVR

EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVAYVSS
GGGSTYYSDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCTRESYSQGNFYF
DYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 17

hu2F7 LCVR

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSDYLDHWYQQKPGQSPRLLIK FASQSIGI

PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQNGHSFSLTFGQGGTKLEIK

SEQ ID NO: 18

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu2F8 là như sau:

hu2F8 HCVR

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWMNWVRQAPGQRLEWMGGIY
PNRGNIEYNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDYRFSYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 35

hu2F8 LCVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVRTAVAWYQQKPGKAPKLLISSTSYRYT
GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYSTPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:36

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người hu1C9 là như sau:

hu1C9 HCVR

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTTYWMNWVRQAPGQRLEWMGGIY
LNRGSSEYNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDYRFSYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO:37

hu1C9 LCVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLISSASYRYT
GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYNTPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:38;

Các vùng biến đổi được tái tổ hợp với (các) vùng cố định IgG (tốt hơn là, IgG1 đối với chuỗi nặng, và κ đối với chuỗi nhẹ). Các trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được lấy làm ví dụ được thể hiện như sau,

IgG1 C:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 54

Ig kappa C:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 55;

Kháng thể được làm tương thích với người bao gồm các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được lấy làm ví dụ dưới đây được tạo ra sau khi liên kết:

hu2G6 HC

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINGG
GSYTTYLDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVSQGSNYYFDYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 19

hu2G6 LC

DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISSNIGWLQQKPGKAPKALIYHGNTLED
GVPSRFGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

hu2F7 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVAYVSS
GGGSTYYSDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCTRESYSQGNFY

DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21

hu2F7 LC

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSIDYLHWYQQKPGQSPRLLIKFAQSISGI
PARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQNGHSFSLTFGGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 22

hu2F8 HC

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWMNWVRQAPGQRLEWMGGIY
PNRGNIEYNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDSTRFSYWGQ
GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO:39

hu2F8 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVRTAVAWYQQKPGKAPKLLISSTSYRYT
GVPSRFGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQHYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:40

hu1C9HC

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTTYWMNWVRQAPGQRLEWMIGGIY
 LNRGSSEYNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDYRFSYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO:41

hu1C9 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLISSASYRYT
 GVPSRFGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYNTPLTFGGGTKVEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:42.

Ví dụ 4: Biểu hiện kháng thể được làm tương thích với người kháng B7-H4

Vector tái tổ hợp được thiết kế theo các trình tự của các kháng thể được làm tương thích với người. Vector mang chuỗi nặng được thiết kế như sau: peptit tín hiệu + chuỗi nặng được làm tương thích với người. Vector mang chuỗi nhẹ được thiết kế như sau: peptit tín hiệu + chuỗi nhẹ được làm tương thích với người.

Các trình tự trên được cài vào vector pCEP4 (ThermoFisher #V04450). Vector biểu hiện được tổng hợp theo thiết kế trên đây. Vector plasmit được tạo ra và được chiết ở quy mô lớn và được gửi đi để giải trình tự để kiểm tra. Plasmit đã định tính được chuyển nhiễm vào các tế bào 293F của người (ThermoFisher # R79007) với PEI (ThermoFisher # BMS1003-A). Các tế bào 293F được nuôi cấy liên tục bằng môi trường không chứa huyết thanh (Shanghai OPM Biosciences, OPM-293 CD03) đến pha phát triển logarit và được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào. 21,4Mg plasmit mang chuỗi nhẹ kháng thể được làm tương thích với người và 23,6µg plasmit mang chuỗi nặng kháng thể được làm tương thích với người được hòa tan trong 10ml môi trường huyết thanh đã khử Opti-MEM® I (GIBCO, 31985-070) và được trộn kỹ, sau đó 200 µg PEI được bổ sung và trộn kỹ, ủ ở RT trong 15 phút. 50 mL tế bào sau đó được bổ sung. Các điều kiện nuôi cấy tế bào: 5% CO₂, 37°C, 125

rpm/phút. Trong quá trình nuôi cấy, các chất bổ sung được bổ sung vào ngày 1 và ngày 3 cho đến khi khả năng sống của tế bào là nhỏ hơn 70%. Dịch nổi tế bào được thu gom, được ly tâm và lọc. Môi trường nuôi cấy tế bào đã ly tâm và lọc được nạp vào cột ái lực tinh chế kháng thể. Cột được rửa bằng dung dịch đệm phosphat. Mẫu được giải hấp bằng dung dịch đệm glyxin hydroclorua (pH 2,7 Gly-HCl 0,1 M), được trung hòa bằng Tris hydroclorua 1M pH 9,0, và được thẩm tách bằng dung dịch đệm phosphat để cuối cùng thu được kháng thể được làm tương thích với người đã tinh chế, mà có thể được sử dụng trong các thử nghiệm nêu trong mỗi ví dụ.

Ví dụ 5: Phát hiện khả năng gắn kết *in vitro* của các kháng thể được làm tương thích với người

Các kháng thể được làm tương thích với người đã thiết kế được thử nghiệm trong các thử nghiệm *in vitro* như sau:

1. Thử nghiệm gắn kết tế bào *in vitro*:

Các tế bào nuôi cấy MX-1 biểu hiện B7-H4 người (các dòng tế bào CLS Service GmbH #300296) được thu gom, và mật độ tế bào được điều chỉnh bằng PBS ở pH 7,4, và các tế bào được cấy trên đĩa có 96 lỗ có đáy hình chữ V ở mật độ 1×10^5 tế bào mỗi lỗ. Đĩa được ly tâm ở tốc độ 2000 rpm trong 5 phút và dịch nổi được loại bỏ. 100 μ l dung dịch kháng thể được làm tương thích với người được pha loãng gradien (được pha loãng bằng PBS chứa 0,5% BSA, bắt đầu từ 1 μ M, gradien gấp 3 lần của 10 liều) được bổ sung vào mỗi lỗ, được trộn kỹ và ủ ở nhiệt độ 4°C trên máy lắc trong 1 giờ. Đĩa được ly tâm ở tốc độ 2000 rpm trong 5 phút và dịch nổi được loại bỏ. Các tế bào được rửa hai lần bằng PBS. 100 μ l kháng thể thứ cấp của dê kháng người được đánh dấu FITC (Abcam, cat#ab97224) được pha loãng với 0,5% BSA trong PBS được bổ sung vào mỗi lỗ, được trộn kỹ và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C trên máy lắc. Đĩa được ly tâm ở tốc độ 2000 rpm trong 5 phút và dịch nổi được loại bỏ. Các tế bào được rửa hai lần bằng PBS và sau đó được tái huyền phù trong PBS. Tín hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào dòng chảy (BECKMAN COULTER, mẫu DxFLEX), và đường cong nồng độ được lập đồ thị để phân tích kết quả. Các kết quả là như được thể hiện trong bảng 1. Cả kháng thể được làm tương thích với người hu2G6 và hu2F7 đều gắn kết với các tế bào MX-1 có mức biểu hiện B7-H4 cao.

Bảng 1. Ái lực (EC_{50}) của mỗi kháng thể được làm tương thích với người với các tế bào

MX-1

Tên kháng thể	EC ₅₀ gắn kết FACS (nM) với các tế bào MX-1
hu2G6	14,3
hu2F8	7,26
hu1C9	7,25
hu2F7	7,32

2. Thử nghiệm các động học ái lực:

Phương pháp Biacore là phương pháp thường được công nhận để phát hiện một cách khách quan ái lực và các động học giữa các protein. Ái lực và các động học gắn kết của các kháng thể cần thử nghiệm theo sáng chế được phân tích bằng Biacore T200 (GE). Các kháng thể kháng B7-H4 cần thử nghiệm theo sáng chế được liên kết cộng hóa trị với các chip CM5 (GE) bằng cách sử dụng kit do Biacore sản xuất và phương pháp liên kết amino chuẩn NHS. Sau đó 50 nM protein huB7-H4-His người đã pha loãng trong cùng một dung dịch đệm được bơm vào với tốc độ dòng bằng 10 uL/phút. Sau khi bơm, toàn bộ các mẫu được phục hồi bằng tác nhân phục hồi trong kit. Các động học gắn kết của kháng nguyên-kháng thể được theo dõi trong 3 phút và các động học phân ly được theo dõi trong 10 phút. Số liệu thu được được phân tích bằng mô hình gắn kết 1:1 (Langmuir) bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá BIA của GE. Số liệu động học ái lực của các kháng thể được làm tương thích với người được tính toán bằng phương pháp này là như được thể hiện trong Bảng 2. Các kháng thể được làm tương thích với người hu2G6, hu2F7, hu2F8 và hu1C9 đều thể hiện ái lực mạnh với protein kháng nguyên B7-H4 của người.

Bảng 2. Xác định ái lực và động học của mỗi kháng thể được làm tương thích với người

Kháng thể	Tốc độ gắn kết $k_a(1/M*s)$	Tốc độ phân ly $k_d(1/s)$	Ái lực K_D
hu2G6	7,41e+05	1,00e-05	1,35e-11
hu2F8	4,47e+05	1,12e-04	2,50e-10
hu1C9	3,35e+05	1,00e-05	2,98e-11
hu2F7	3,29e+05	2,49e-04	7,57e-10

Ví dụ 6: Sự nhập bào của kháng thể kháng B7-H4

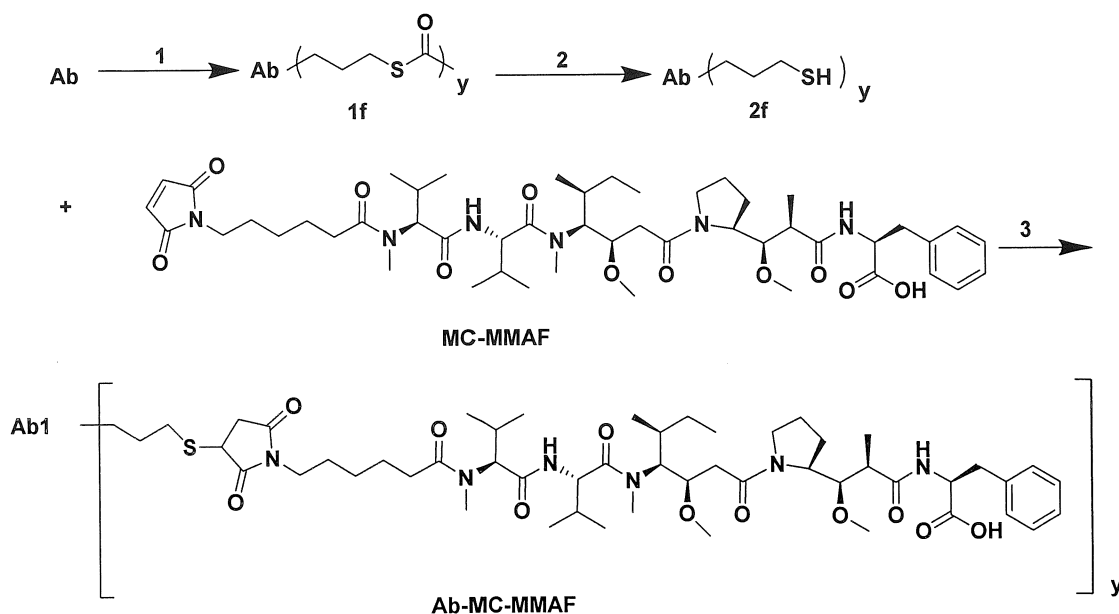
Để thử nghiệm xem liệu các kháng thể theo sáng chế có thể được nhập bào cùng với B7-H4 người sau khi gắn kết với B7-H4 hay không, các tế bào MX-1 được sử dụng để đánh giá. Các tế bào MX-1 được phân ly bằng cách sử dụng trypsin (trước hết rửa bằng PBS một lần ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 2 phút), thu gom và tái huyền phù trong dung dịch đệm FACS đã làm lạnh sơ bộ. Nồng độ tế bào được điều chỉnh đến 1×10^6 tế bào/mL. 1 mL dịch nổi tế bào được bổ sung vào ống EP, ly tâm ở tốc độ 1500 rpm trong 5 phút, và dịch nổi được loại bỏ. 1 mL kháng thể tạo ra cần thử nghiệm được bổ sung để tái huyền phù tế bào, và nồng độ cuối của kháng thể là 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Các tế bào được ủ trên máy lắc 4°C trong 1 giờ, ly tâm, và dịch nổi được loại bỏ (4°C, 1500 rpm $\times$ 5 phút). Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và dịch nổi được loại bỏ. 100 μL dung dịch làm việc chứa kháng thể thứ cấp huỳnh quang được bổ sung vào mỗi ống để tái huyền phù tế bào. Các tế bào được ủ trên máy lắc 4°C trong 30 phút, ly tâm, và dịch nổi được loại bỏ (4°C, 1500 rpm $\times$ 5 phút). Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và dịch nổi được loại bỏ. 1,0 mL môi trường đầy đủ nuôi cấy tế bào MX-1 đã làm ấm sơ bộ được bổ sung vào mỗi ống để tái huyền phù tế bào và trộn. Huyền phù tế bào được chia nhỏ vào 4 ống với lượng 200 μL mỗi ống, mà lần lượt là nhóm 0 phút, nhóm trống, nhóm 30 phút và nhóm 2 giờ. Các nhóm 0 phút và nhóm trống được đặt trên đá, trong khi đó các nhóm còn lại được đặt trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C để nhập bào trong 30 phút và 2 giờ tương ứng. Tại thời điểm tương ứng, ống EP được lấy ra và đặt trên đá để làm lạnh trước trong 5 phút. Toàn bộ các nhóm xử lý được ly tâm và dịch nổi được loại bỏ (4°C, 1500 vòng/phút $\times$ 5 phút). Các tế bào được rửa một lần bằng dung dịch đệm FACS và dịch nổi được loại bỏ. 250 μL dung dịch đệm tẩy được bổ sung vào các ống EP chứa toàn bộ các nhóm xử lý ngoại trừ nhóm 0 phút và ủ trong 8 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được ly tâm và dịch nổi được loại bỏ (4°C, 1500 vòng/phút $\times$ 5 phút). Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và dịch nổi được loại bỏ. Toàn bộ các nhóm xử lý được bổ sung 100 μL thuốc hãm nhuộm miễn dịch, đặt ở 4°C trong hơn 30 phút, và phát hiện bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy DxFlex. Tỷ lệ nhập bào của kháng thể B7-H4 (%) = (giá trị cường độ huỳnh quang trung bình ở mỗi thời điểm - giá trị cường độ huỳnh quang trung bình của nhóm trống) / (giá trị cường độ huỳnh quang trung bình ở thời điểm 0 - giá trị cường độ huỳnh quang trung bình của nhóm trống) $\times$ 100%. Số liệu được thể hiện trong bảng 3:

Bảng 3. Hiệu suất nhập bào qua trung gian kháng thể được làm tương thích với người của protein B7-H4

Kháng thể	0 giờ (%)	0,5 giờ (%)	2 giờ (%)
Đối chứng IgG	0	0,1	0,9
hu2G6	0	18,6	28,7
hu2F7	0	13,9	25,9

Ví dụ 7: Sự tiếp hợp của các kháng thể với MC-MMAF

Các kháng thể theo sáng chế có hoạt tính ái lực tế bào và hoạt tính nhập bào, khiến cho chúng phù hợp để liên kết với các dược chất để tạo thành thể tiếp hợp kháng thể-dược chất để điều trị các bệnh qua trung gian B7-H4. Quá trình liên kết được thể hiện trong phương trình sau, trong đó Ab là hu2G6 hoặc hu2F7:



Trong bước thứ nhất, S-(3-hydroxypropyl) thioacetat (0,7 mg, 5,3 mol) được hòa tan trong 0,9 mL axetonitril để tạo thành dung dịch để sử dụng sau đó. Dung dịch axetonitril được điều chế trước nêu trên chứa S-(3-hydroxypropyl) thioacetat được bổ sung vào kháng thể trong dung dịch đệm axetat/natri axetat pH=4,3 (10,35 mg/mL, 9,0 mL, 0,97 mol). Sau đó, 1,0 mL dung dịch nước chứa natri xyanoborohydrua (14,1 mg, 224 mol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp phản ứng và để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 25°C trong 2 giờ. Sau khi kết thúc phản ứng, hỗn hợp phản ứng được loại muối và tinh chế bằng cách sử dụng cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: pH 6,5 0,05 M dung dịch PBS) để thu được dung dịch chứa sản phẩm 1f. Dung dịch được cô đến 10 mg/mL và được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

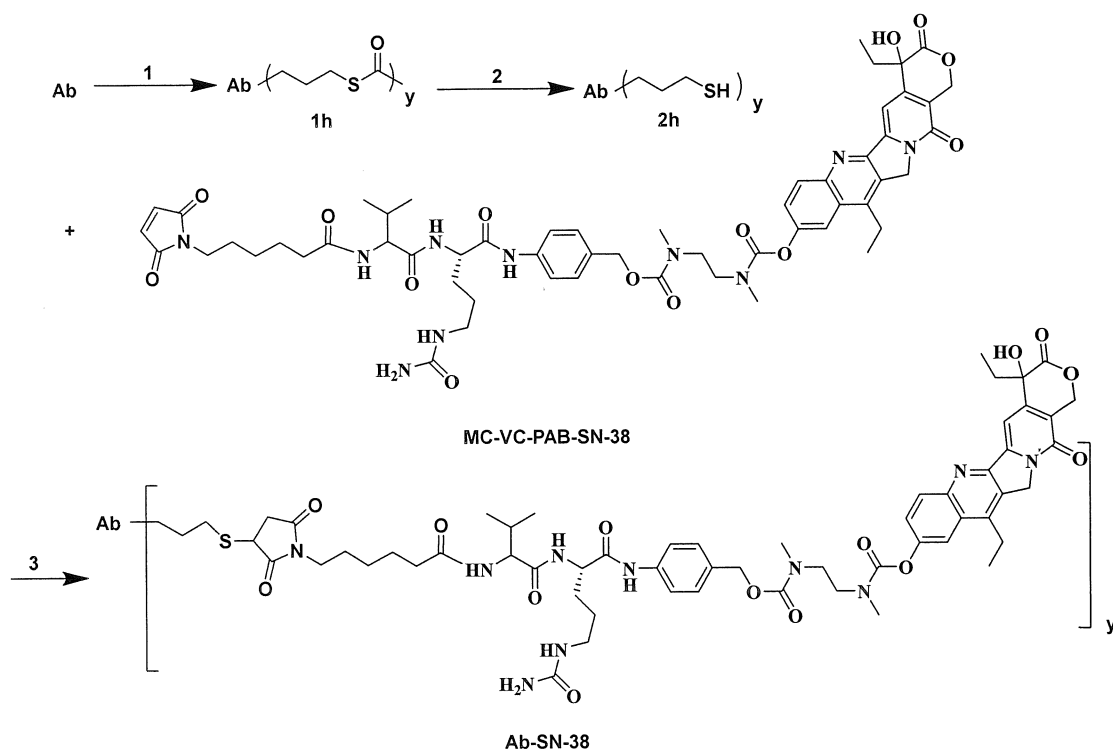
Trong bước thứ hai, dung dịch 1f (11,0 mL) được bổ sung với 0,35 mL dung dịch carboxyamin hydroclorua 2,0 M và được để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 25°C

trong 30 phút. Sau đó dung dịch phản ứng được loại muối và tinh chế bằng cách sử dụng cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: pH 6,5 dung dịch PBS 0,05 M) để thu được dung dịch chứa sản phẩm 2f (nồng độ 6,17 mg/mL, 14,7 mL).

Trong bước thứ ba, hợp chất MC-MMAF (1,1 mg, 1,2 mol, được điều chế bằng phương pháp được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2005081711) được hòa tan trong 0,3 mL axetonitril, được bổ sung vào dung dịch 2f (nồng độ 6,17 mg/mL, 3,0 mL) và được để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 25°C trong 4 giờ. Sau đó dung dịch phản ứng được loại muối và tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: pH 6,5 dung dịch PBS 0,05 M), và lọc trong các điều kiện vô trùng bằng màng lọc để thu được sản phẩm thể tiếp hợp kháng thể-được chất Ab-MC-MMAF trong dung dịch đệm PBS (3,7 mg/mL, 4,7 mL), mà được đông lạnh ở nhiệt độ 4°C. Giá trị trung bình y của sản phẩm hu2G6-MC-MMAF được xác định bằng HIC-HPLC là 3,8, và các mẫu chứa hu2G6-MC-MMAF ($y=4$) được tạo ra bằng cách tinh chế bằng HIC-HPLC. Giá trị trung bình y của sản phẩm hu2F7-MC-MMAF được xác định bằng HIC-HPLC là 3,2, và các mẫu hu2F7-MC-MMAF ($y=2$) và hu2F7-MC-MMAF ($y=4$) thu được bằng cách tinh chế bằng HIC-HPLC.

Ví dụ 8: Sự tiếp hợp của các kháng thể với SN-38

Các được chất được tiếp hợp với kháng thể được điều chế thông qua quy trình liên kết sau, trong đó Ab là hu2F7:



Trong bước thứ nhất, S-(3-hydroxypropyl) thioaxetat (0,7 mg, 5,3 mol) được hòa tan

trong 0,9 mL axetonitril để tạo thành dung dịch để sử dụng sau đó. Dung dịch axetonitril được điều chế trước nêu trên chứa S-(3-hydroxypropyl) thioaxetat được bổ sung vào kháng thể trong dung dịch đệm axetat/natri axetat pH=4,3 (10,35 mg/mL, 9,0 mL, 0,97 mol). Sau đó, 1,0 mL dung dịch nước chứa natri xyanoborohydrua (14,1 mg, 224 mol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp phản ứng và để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 25°C trong 2 giờ. Sau khi kết thúc phản ứng, hỗn hợp phản ứng được loại muối và tinh chế bằng cách sử dụng cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: pH 6,5 dung dịch PBS 0,05 M) để thu được dung dịch chứa sản phẩm 1h. Dung dịch được cô đến 10 mg/mL và được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

Trong bước thứ hai, dung dịch 1h (11,0 mL) được bổ sung với 0,35 mL dung dịch carboxyamin hydroclorua 2,0 M và được để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 25°C trong 30 phút. Sau đó dung dịch phản ứng được loại muối và tinh chế bằng cách sử dụng cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: pH 6,5 dung dịch PBS 0,05 M) để thu được dung dịch chứa sản phẩm 2h (nồng độ 6,2 mg/mL, 15,0 mL). Dung dịch 2h được cô đến nồng độ 10 mg/ml và được sử dụng trong phản ứng tiếp theo.

Trong bước thứ ba, hợp chất MC-VC-PAB-SN-38 (1,3 mg, 1,2 mol) được hòa tan trong 0,3 mL axetonitril, được bổ sung vào dung dịch 2h (nồng độ 6,2 mg/mL, 3,0 mL) và được để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 25°C trong 4 giờ. Sau đó dung dịch phản ứng được loại muối và tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: pH 6,5 dung dịch PBS 0,05 M), và lọc trong các điều kiện vô trùng bằng màng lọc để thu được sản phẩm thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hu2F7-SN-38 trong dung dịch đệm PBS (3,7 mg/mL, 4,7 mL), mà được đông lạnh ở nhiệt độ 4°C. Giá trị trung bình y được xác định bằng phương pháp sử dụng tia tử ngoại. Các cuvet đã nạp dung dịch đệm natri succinat được đặt trong ô hấp thụ đối chiếu và trong ô hấp thụ xác định mẫu tương ứng, và sau đó trừ đi dung môi trống, các cuvet đã nạp dung dịch thử nghiệm được đặt trong ô hấp thụ xác định mẫu. Mức hấp thụ ở bước sóng 280 nm và 370 nm được đo.

Xử lý số liệu:

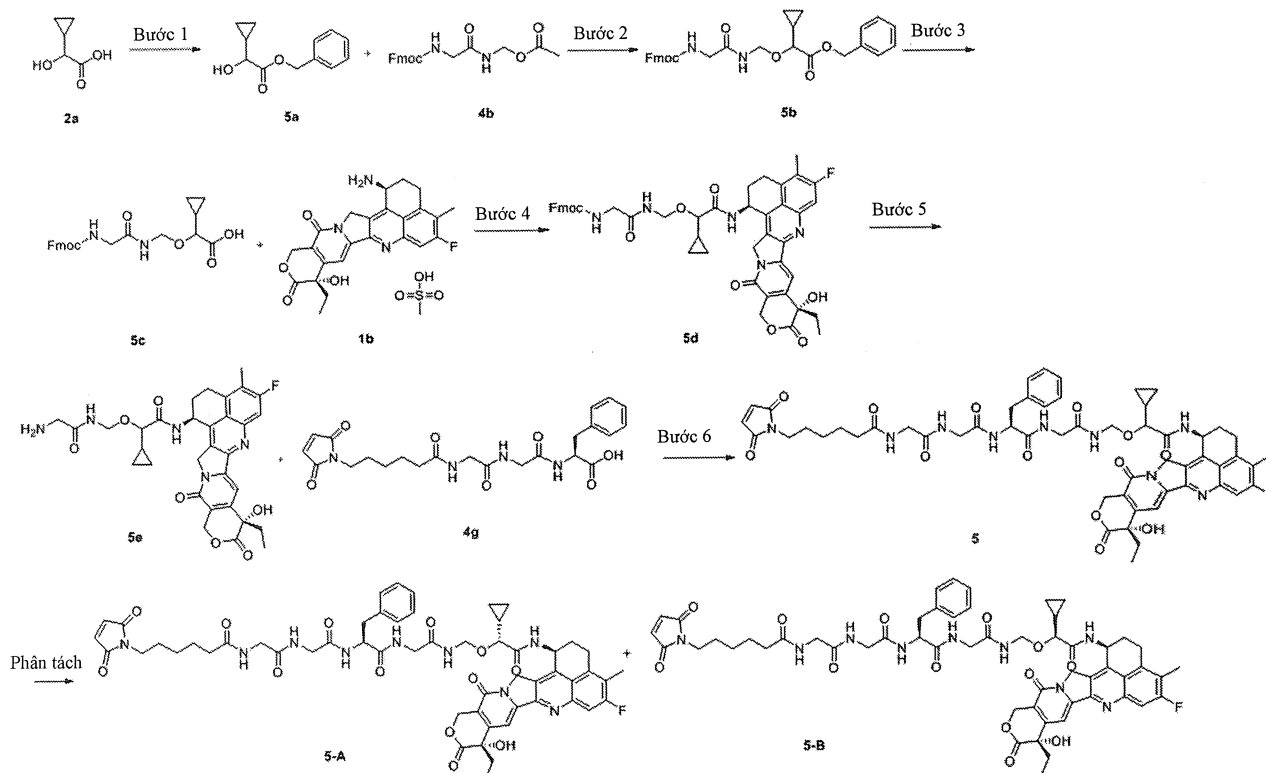
Nồng độ kháng thể C_{mab} được xác định bằng cách tạo ra đường cong chuẩn đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm. Lượng phân tử nhỏ $C_{dược\ chất}$ được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 370 nm.

Mức tải dược chất trung bình $y = C_{dược\ chất} / C_{mab}$

Giá trị trung bình $y=3,7$ của sản phẩm hu2F7-SN-38 được xác định bằng phương pháp

nêu trên. Các mẫu hu2F7-SN-38 ($y=4$) được tạo ra bằng cách tinh chế UV-HPLC.

Ví dụ 9: Sự tiếp hợp các kháng thể với Exatecan



Trong bước thứ nhất, hợp chất **2a** (2 g, 17,2 mmol) được hòa tan trong 75 mL axetonitril và được bổ sung liên tiếp với kali cacbonat (9,27 g, 67,2 mmol), benzyl bromua (20 mL, 167,2 mmol) và tetrabutylamoni iodua (620 mg, 1,68 mmol). Dung dịch phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ và lọc qua đất diatomit. Bánh lọc được rửa bằng etyl axetat (20 ml). Dịch lọc được gom lại và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi phát triển C để thu được sản phẩm **5a** (3,2 g, hiệu suất: 90,1%).

Trong bước thứ hai, hợp chất **5a** (181,3 mg, 0,879 mmol) và **4b** (270 mg, 0,733 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng, được bổ sung với 6 mL tetrahydrofuran và thay thế bằng argon ba lần. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 0-5°C trong bể nước lạnh và bổ sung với kali tert-butoxit (164 mg, 1,46 mmol), sau đó làm ấm đến nhiệt độ phòng bằng cách bỏ bể đá ra và khuấy trong 40 phút. Hỗn hợp phản ứng được bổ sung với 15 mL nước đá và chiết bằng etyl axetat (40 mL×2) và clorofom (20 mL×5). Các pha hữu cơ được thu gom và được cô. Cặn thu được được hòa tan trong 6 mL dioxan, bổ sung với 3 mL nước, natri bicacbonat (73,8 mg, 0,879 mmol) và 9-fluoren metyl clorofomat (190 mg, 0,734 mmol) và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được bổ sung với 30 mL

nước và chiết bằng ethyl axetat (20 mL×3). Các pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa (30 mL), làm khô bằng cách sử dụng natri sulfat khan và lọc. Cô dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi phát hiện C để thu được sản phẩm **5b** Benzyl 10-cyclopropyl-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundec-11-ate (73 mg, hiệu suất: 19,4%).

MS *m/z* (ESI): 515,0 [M+1].

Trong bước 3, hợp chất **5b** (30 mg, 0,058 mmol) được hòa tan trong 6,75 mL dung môi hỗn hợp chứa tetrahydrofuran và ethyl axetat (V:V=2:1), được bổ sung với paladi trên cacbon (18 mg, hàm lượng 10%, trên cơ sở khô), thay thế bằng hydro ba lần, và cho phản ứng trong điều kiện khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng được lọc bằng đất diatomit. Bánh lọc được rửa bằng ethyl axetat. Dịch lọc được cô để thu được sản phẩm thô **5c** 10-cyclopropyl-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundec-11-axit (20 mg), mà được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế.

MS *m/z* (ESI): 424,9 [M+1].

Trong bước bốn, hợp chất **1b** (15 mg, 28,2 μmol) được bổ sung vào bình phản ứng, được bổ sung với 1,5 mL *N,N*-dimethylformamid và thay thế bằng argon ba lần. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 0-5°C trong bể nước lạnh, được bổ sung một giọt triethylamin, được bổ sung với sản phẩm thô **5c** (20 mg, 47,1 μmol), được bổ sung với 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholin (25,4 mg, 86,2 μmol) và để phản ứng trong điều kiện khuấy trong bể đá trong 40 phút. Hỗn hợp phản ứng được bổ sung với 15 mL nước và chiết bằng ethyl axetat (20 mL×3). Các pha hữu cơ được thu gom. Các pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa (20 mL×2), làm khô bằng cách sử dụng natri sulfat khan và lọc. Cô dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Các cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi phát hiện B để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **5d** (9*H*-fluoren-9-yl)methyl(2-(((1-cyclopropyl-2-(((1*S*,9*S*)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-1,0,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolozino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-2-oxoethoxy)methyl)amino)-2-oxoethyl)carbamate (23,7 mg, hiệu suất: 78,9%).

MS *m/z* (ESI): 842,1[M+1].

Trong bước thứ năm, hợp chất **5d** (30 mg, 35,7 μmol) được hòa tan trong 3 mL

diclometan, được bổ sung với 1,5 mL diethylamin và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm, được bổ sung với 1,5 mL toluen và cô trong điều kiện áp suất giảm, lặp lại hai lần. Cặn được bổ sung với 4,5 mL n-hexan và được nghiền nát. Dịch nổi được rót ra sau khi để yên và chất rắn được giữ lại. Các cặn rắn được cô trong điều kiện áp suất giảm và được nghiền khô để thu được sản phẩm thô **5e** 2-((2-aminoacetamido)etoxy)-2-

xyclopropyl-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]indolozino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)

axetamid (23 mg), mà được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

MS *m/z* (ESI): 638,0[M+18].

Trong bước sáu, sản phẩm thô **5e** (20 mg, 32,3 μ mol) được hòa tan trong 1 mL *N,N*-dimethylformamid và được thay thế bằng argon ba lần. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 0-5°C trong bể nước lạnh, được bổ sung với 0,5 mL dung dịch *N,N*-dimethylformamid chứa hợp chất **4g** (31,8 mg, 67,3 μ mol), được bổ sung với 4-(4,6-dietoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylclomorpholin (27,8 mg, 94,3 μ mol) và được phản ứng trong điều kiện khuấy trong bể đá trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ phòng bằng cách loại bỏ bể đá và để phản ứng trong điều kiện khuấy trong 1 giờ để thu được hợp chất **5**. Dung dịch phản ứng được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện phân tách: cột: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; pha động: A-nước (10 mmol NH₄OAc): B-axetonitril, giải hấp theo gradien, tốc độ dòng: 18 mL/phút). Các thành phần tương ứng được thu gom và cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được các sản phẩm 5-A và 5-B (3,6 mg, 2,6 mg).

MS *m/z* (ESI): 1074,4 [M+1].

Hợp chất cấu trúc đơn 5-A (thời gian lưu ngắn)

Phân tích UPLC: thời gian lưu 1,14 phút, độ tinh khiết: 85% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μ m 2,1*50 mm, pha động: A-nước (5 mmol NH₄OAc), B-axetonitril).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,60 (t, 1H), 8,51-8,49 (d, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,96 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,15 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,65-5,54 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,74-4,62 (m, 2H), 4,54-4,40 (m, 2H), 3,76-3,64 (m, 4H), 3,62-3,48 (m, 2H), 3,20-3,07 (m, 2H), 3,04-2,94 (m, 2H), 2,80-2,62 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,15 (m, 2H), 2,15-2,04 (m, 2H), 1,93-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 5H), 0,87 (t, 3H),

0,64-0,38 (m, 4H).

Hợp chất cấu trúc đơn 5-B (thời gian lưu dài hơn):

Phân tích UPLC: thời gian lưu 1,16 phút, độ tinh khiết: 89% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μ m 2,1*50 mm, pha động: A-nước (5 mmol NH₄OAc), B-axetonitril).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,68-8,60 (m, 1H), 8,58-8,50 (m, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,94 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,13 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,60-5,50 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,78-4,68 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 2H), 3,76-3,58 (m, 4H), 3,58-3,48 (m, 1H), 3,20-3,10 (m, 2H), 3,08-2,97 (m, 2H), 2,80-2,72 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,13 (m, 2H), 2,13-2,04 (m, 2H), 2,03-1,94 (m, 2H), 1,91-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 5H), 0,91-0,79 (m, 3H), 0,53-0,34 (m, 4H).

Các phương pháp điều chế của các hợp chất trung gian khác có thể tham khảo phương pháp điều chế hợp chất trung gian 5.

Dung dịch nước được đệm PBS chứa kháng thể hu2F7 (pH=6,5 dung dịch nước được đệm PBS 0,05 M; 7,3 ml, 13,8 mg/ml, 0,681 μ mol) được bổ sung với dung dịch nước được điều chế chứa tris(2-carboxyetyl) phosphin (10 mM, 0,347 mL, 3,47 μ mol) ở 37°C. Hỗn hợp phản ứng được đặt trong máy lắc cách thủy và được để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 37°C trong 3 giờ. Phản ứng được kết thúc, và dung dịch phản ứng được làm nguội xuống 25°C trong bể nước, pha loãng đến 14,0 ml, và 3,3 ml dung dịch được lấy ra cho phản ứng tiếp theo.

Hợp chất **5-A** (3,0 mg, 3,72 μ mol) được hòa tan trong 0,15 mL DMSO và được bổ sung vào 3,3 ml dung dịch trên. Hỗn hợp phản ứng được đặt trong máy lắc cách thủy và được để phản ứng trong điều kiện lắc ở nhiệt độ 25°C trong 3 giờ. Phản ứng được kết thúc. Dung dịch phản ứng được loại muối và được tinh chế bằng cách sử dụng cột gel Sephadex G25 (pha giải hấp: pH 6,5 dung dịch nước được đệm PBS 0,05 M, chứa EDTA 0,001 M) để thu được sản phẩm được lấy làm ví dụ chứa Ab-Exatecan, hu2F7-Exatecan (hợp chất 34) trong dung dịch đệm PBS (1,35 mg/mL, 13 mL), mà được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Giá trị trung bình y được xác định bằng phương pháp sử dụng tia cực tím. Các cuvet đã nạp dung dịch đệm natri succinat lần lượt được đặt trong ô hấp thụ tham chiếu và ô hấp thụ xác định mẫu, và sau khi trừ đi dung môi trống, các cuvet đã nạp dung dịch thử nghiệm được đặt trong ô hấp thụ xác định mẫu. Mức hấp thụ ở bước sóng 280 nm và 370 nm được đo.

Xử lý số liệu:

Nồng độ kháng thể C_{mab} được xác định bằng cách tạo ra đường cong chuẩn đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm. Lượng phân tử nhỏ $C_{\text{dược chất}}$ được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 370 nm.

Mức tải dược chất trung bình $y = C_{\text{dược chất}}/C_{\text{mab}}$

Giống như đối với sản phẩm được lấy làm ví dụ hu2F7-Exatecan (hợp chất 34), y được xác định là 7,6 bằng phương pháp trên. Các mẫu của hu2F7-Exatecan ($y=8$) thu được bằng cách tinh chế bằng UV-HPLC.

Các phương pháp điều chế các thể tiếp hợp kháng thể khác xin tham khảo phương pháp điều chế hợp chất 34.

Ví dụ 10: Hoạt tính tiêu diệt của các thể tiếp hợp kháng thể-dược chất trên các tế bào khối u

Để thử nghiệm hiệu quả tiêu diệt của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế trên các tế bào khối u, các tế bào ung thư vú MX-1 được sử dụng để đánh giá. Các tế bào MX-1 được thu gom, ly tâm và đếm. Mật độ tế bào được điều chỉnh đến $0,44 \times 10^6$ tế bào/mL bằng môi trường đầy đủ, và các tế bào được cấy vào 60 lỗ của đĩa có 96 lỗ màu trắng ở mật độ 90 μL mỗi lỗ với số tế bào là 40.000. Các lỗ ngoài cùng còn lại được bổ sung với 100 μL PBS. Các tế bào được đặt trong tủ ủ 37°C , 5% CO_2 và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày thứ hai của thử nghiệm, dung dịch thể tiếp hợp kháng thể-dược chất được điều chế bằng PBS trong đĩa đáy hình chữ V có 96 lỗ, bắt đầu từ nồng độ 1000 nM (pha loãng 3 lần và 9 nồng độ). Sau khi hoàn tất việc điều chế, dung dịch được bổ sung vào đĩa màu trắng có 96 lỗ ở nồng độ 10 μL mỗi lỗ hai lần. Đĩa nuôi cấy tế bào được đặt trong tủ ủ 37°C , 5% CO_2 và kéo dài việc nuôi cấy trong 72 giờ. Vào ngày thứ năm của thử nghiệm, đĩa được phát hiện và đọc. Đĩa nuôi cấy tế bào được lấy ra. Hai lỗ đối chứng được thiết lập. 100 μL môi trường chứa 40.000 tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ, và sau khi làm cân bằng đến nhiệt độ phòng, 50 μL dung dịch CTG (Promega G7573) được bổ sung vào mỗi lỗ. Hỗn hợp được lắc và trộn, đặt trong bóng tối và để yên trong 10 phút, và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng chương trình phát quang của thiết bị đọc vi đĩa. Tỷ lệ tiêu diệt tế bào tối đa = $(1 - \text{giá trị huỳnh quang của lỗ 1000 nM} / \text{giá trị huỳnh quang của lỗ đối chứng})\%$. Các kết quả thử nghiệm là như được thể hiện trong bảng 4:

Bảng 4: Đánh giá hoạt tính tiêu diệt của các thể tiếp hợp kháng thể-dược chất trên các tế bào khối u

Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất	IC_{50} (nM)	Hiệu quả tiêu diệt ở liều tối
----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

		đa
IgG-MC-MMAF (đối chứng)	ND	ND
hu2G6-MC-MMAF (hợp chất 1, y=4)	1,1	48,2%
hu2F7-MC-MMAF (hợp chất 2, y=4)	3,4	53,9%
hu2F7-SN-38 (hợp chất 6, y=4)	78,85	56,4%
hu2F7-Exatecan (hợp chất 34, y=8)	80,28	60,39%

ND: Không phát hiện thấy hoạt tính.

Ví dụ 11: Hiệu quả ức chế của các thể tiếp hợp kháng thể-độc chất đến sự phát triển của các tế bào khối u

Để thử nghiệm hiệu quả tiêu diệt của các thể tiếp hợp kháng thể-độc chất theo sáng chế đến các tế bào khối u, các tế bào ung thư vú SK-BR-3 (ATCC #HTB30) được sử dụng để đánh giá. Các tế bào SK-BR-3 được thu gom, ly tâm và đếm. Mật độ tế bào được điều chỉnh đến $0,44 \times 10^6$ tế bào/mL bằng môi trường đầy đủ, và các tế bào được cấy vào 60 lỗ của đĩa có 96 lỗ màu trắng ở mật độ 90 μL mỗi lỗ với số tế bào là 40.000. Các lỗ ngoài cùng còn lại được bổ sung với 100 μL PBS. Các tế bào được đặt trong tủ ủ 37°C , 5% CO_2 và nuôi cấy qua đêm. Vào ngày thứ hai của thử nghiệm, dung dịch thể tiếp hợp kháng thể-độc chất được điều chế bằng PBS trong đĩa đáy hình chữ V có 96 lỗ, bắt đầu từ nồng độ 1000 nM (pha loãng 3 lần và 9 nồng độ). Sau khi hoàn tất việc điều chế, dung dịch được bổ sung vào đĩa màu trắng có 96 lỗ ở nồng độ 10 μL mỗi lỗ hai lần. Hai lỗ đối chứng khác được thiết lập và 10 μL PBS được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa nuôi cấy tế bào được đặt trong tủ ủ 37°C , 5% CO_2 và kéo dài việc nuôi cấy trong 72 giờ. Vào ngày thứ năm của thử nghiệm, đĩa được phát hiện và đọc. Đĩa nuôi cấy tế bào được lấy ra. Sau khi làm cân bằng đến nhiệt độ phòng, 50 μL dung dịch CTG (Promega G7573) được bổ sung vào mỗi lỗ. Hỗn hợp được lắc và trộn, đặt trong bóng tối và để yên trong 10 phút, và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng chương trình phát quang của thiết bị đọc vi đĩa. Tỷ lệ ức chế tối đa % = $(1 - \text{giá trị huỳnh quang của lỗ 1000 nM} / \text{giá trị huỳnh quang của lỗ đối chứng})\%$. Các kết quả thử nghiệm là như được thể hiện trong bảng 5:

Bảng 5: Đánh giá hoạt tính ức chế của các thể tiếp hợp kháng thể-độc chất đến các tế bào khối u

Thế tiếp hợp kháng thể-dược chất	IC ₅₀ (nM)	Tỷ lệ ức chế tối đa
IgG-MC-MMAF (đối chứng)	ND	ND
hu2G6-MC-MMAF (hợp chất 1, y=4)	1,0	90,3%
hu2F7-MC-MMAF (hợp chất 2, y=4)	9,5	91,8%

ND: Không phát hiện thấy hoạt tính.

Ví dụ 12: Đánh giá hiệu quả *in vivo* của các thế tiếp hợp kháng thể-dược chất được tiếp hợp với MMAF

Sau khi tạo thành các khối u đã cấy các tế bào MX-1 ở chuột, hiệu quả ức chế khối u của thế tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế được đánh giá. 5×10^6 tế bào MX-1 được tiêm dưới da vào chuột chui lông thiếu hụt miễn dịch (BALB/c chui lông). Sau 2 tuần, tiến hành tiêm tĩnh mạch các thế tiếp hợp kháng thể-dược chất hu2G6-MC-MMAF và hu2F7-MC-MMAF, với tần suất một lần/tuần và liều 1,5 mg/kg hoặc 3 mg/kg. Prorein IgG1 của người được sử dụng làm đối chứng ở liều 3 mg/kg. Mỗi nhóm trong số nhóm đối chứng hay nhóm sử dụng có 5 con chuột. Tỷ lệ ức chế khối u được tính toán bằng cách đo thể tích khối u. Tỷ lệ ức chế khối u = $100\% - (\text{thể tích khối u của nhóm sử dụng vào ngày 21} - \text{thể tích khối u của nhóm sử dụng vào ngày 0}) / (\text{thể tích khối u của nhóm đối chứng vào ngày 21} - \text{thể tích khối u của nhóm đối chứng vào ngày 0})$. Các kết quả thử nghiệm là như được thể hiện trong Fig.1 và bảng 6. Cả hu2G6-MC-MMAF và hu2F7-MC-MMAF đều thể hiện tác dụng chống khối u phụ thuộc liều. Cả hu2G6-MC-MMAF và hu2F7-MC-MMAF thể hiện tỷ lệ ức chế khối u là nhiều hơn 100% ở liều 3 mg/kg, mà có nghĩa là các thế tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế có thể không chỉ ức chế sự phát triển khối u, mà còn có tác dụng tiêu diệt đến khối u đã được hình thành.

Bảng 6. Hiệu quả của các hợp chất được sử dụng đến khối u được cấy MX-1 ở chuột chui lông mang khối u

Nhóm sử dụng	Tỷ lệ ức chế khối u
hu2G6-MC-MMAF (hợp chất 1, y=4) 1,5 mg/kg	38,0%
hu2G6-MC-MMAF (hợp chất 1, y=4) 3 mg/kg	115,6%
hu2F7-MC-MMAF (hợp chất 2, y=4) 1,5 mg/kg	90,3%
hu2F7-MC-MMAF (hợp chất 2, y=4) 3 mg/kg	163,8%

Ví dụ 13: Đánh giá hiệu quả *in vivo* của các thể tiếp hợp kháng thể-được chất với các tải được chất khác nhau

Để nghiên cứu thêm các thể tiếp hợp kháng thể-được chất với các tải được chất khác nhau, các thể tiếp hợp kháng thể-được chất được điều chế bằng phương pháp nêu trong ví dụ 7 và tinh chế bằng HPLC để thu được hu2F7-MC-MMAF (y=2) và hu2F7-MC-MMAF (y=4) (Fig.2). Sau khi tạo thành các khối u đã cấy MX-1 ở chuột, hiệu quả chống khối u của thể tiếp hợp kháng thể-được chất theo sáng chế được đánh giá. 5×10^6 tế bào MX-1 được tiêm dưới da vào chuột chui lông thiếu hụt miễn dịch. Sau 2 tuần, tiến hành tiêm dưới da các thể tiếp hợp kháng thể-được chất hu2F7-MC-MMAF (y=2) và hu2F7-MC-MMAF (y=4), với tần suất một lần/tuần và liều 3 mg/kg. Prorein IgG1 của người được sử dụng làm đối chứng ở liều 3 mg/kg. Mỗi nhóm trong số nhóm đối chứng hay nhóm sử dụng có 5 con chuột. Tỷ lệ ức chế khối u được tính toán bằng cách đo thể tích khối u. Tỷ lệ ức chế khối u = $100\% - (\text{thể tích khối u của nhóm sử dụng vào ngày 21} - \text{thể tích khối u của nhóm sử dụng vào ngày 0}) / (\text{thể tích khối u của nhóm đối chứng vào ngày 21} - \text{thể tích khối u của nhóm đối chứng vào ngày 0})$. Các kết quả thử nghiệm là như được thể hiện trong Fig.3 và Bảng 7. Cả hu2F7-MC-MMAF (y=2) và hu2F7-MC-MMAF (y=4) đều thể hiện tác dụng chống khối u. hu2F7-MC-MMAF (y=4) có tác dụng chống khối u mạnh hơn so với hu2F7-MC-MMAF (y=2) ở liều 3 mg/kg, cho thấy tỷ lệ ức chế khối u là lớn hơn 100%, mà có nghĩa là hu2F7-MC-MMAF (y=4) không chỉ ức chế sự phát triển khối u, mà còn có hiệu quả tiêu diệt trên khối u đã được tạo thành (Fig.4).

Bảng 7. Hiệu quả của các thể tiếp hợp kháng thể-được chất với các mức tải được chất khác nhau trên khối u đã cấy MX-1 ở chuột chui lông mang khối u

Nhóm sử dụng	Tỷ lệ ức chế khối u
hu2F7-MC-MMAF (y=2) 3 mg/kg	87,99%
hu2F7-MC-MMAF (y=4) 3 mg/kg	197,87%

Ví dụ 14: Đánh giá hiệu quả *in vivo* của thể tiếp hợp kháng thể-được chất được tiếp hợp với Exatecan

Để nghiên cứu các thể tiếp hợp kháng thể-được chất được tiếp hợp với Exatecan, các thể tiếp hợp kháng thể-được chất được điều chế bằng phương pháp nêu trong ví dụ 9 và được tinh chế bằng HPLC để thu được hu2F7-Exatecan (hợp chất 34, y=8). Sau khi tạo thành các khối u đã cấy MX-1 ở chuột, hiệu quả chống khối u của thể tiếp hợp kháng

thể-được chất theo sáng chế được đánh giá. 5×10^6 tế bào MX-1 được tiêm dưới da vào chuột chui lông thiếu hụt miễn dịch. Sau 2 tuần, tiến hành tiêm tĩnh mạch thể tiếp hợp kháng thể-được chất hu2F7-Exatecan ($y=8$), ở tần suất một lần/tuần và liều 5 mg/kg và 10 mg/kg. Prorein IgG1 của người được sử dụng làm đối chứng ở liều 5 mg/kg. Mỗi nhóm trong số nhóm đối chứng hay nhóm sử dụng có 5 con chuột. Tỷ lệ ức chế khối u được tính toán bằng cách đo thể tích khối u. Tỷ lệ ức chế khối u = $100\% - (\text{thể tích khối u của nhóm sử dụng vào ngày 18} - \text{thể tích khối u của nhóm sử dụng vào ngày 0}) / (\text{thể tích khối u của nhóm đối chứng vào ngày 18} - \text{thể tích khối u của nhóm đối chứng vào ngày 0})$. Các kết quả thử nghiệm là như được thể hiện trong Bảng 8. hu2F7-Exatecan thể hiện tỷ lệ ức chế khối u là trên 100% ở cả liều 5 mg/kg và 10 mg/kg, điều này có nghĩa là hu2F7-Exatecan ($y=8$) không chỉ ức chế sự phát triển khối u, mà còn có hiệu quả tiêu diệt trên khối u đã tạo thành.

Bảng 8. Hiệu quả của các thể tiếp hợp kháng thể-được chất được tiếp hợp với Exatecan trên khối u đã cấy MX-1 ở chuột chui lông mang khối u

Nhóm sử dụng	Tỷ lệ ức chế khối u
hu2F7-Exatecan (hợp chất 34, $y=8$) 5 mg/kg	173,55%
hu2F7-Exatecan (hợp chất 34, $y=8$) 10 mg/kg	183,48%

Ví dụ 15: Thử nghiệm hoạt tính tiêu diệt ngoài cuộc của các thể tiếp hợp kháng thể-được chất được tiếp hợp với Exatecan

Để nghiên cứu hiệu quả của các thể tiếp hợp kháng thể-được chất được tiếp hợp với Exatecan theo sáng chế trong việc tiêu diệt các tế bào âm tính B7-H4 thông qua tác dụng ngoài cuộc, hoạt tính tiêu diệt của thể tiếp hợp kháng thể-được chất đến dòng tế bào u tùy với sự biểu hiện B7-H4 âm tính được phát hiện bằng cách sử dụng kit phát hiện thử nghiệm ONE-Glo™ Luciferaza. Các tế bào MX-1 được thu gom, ly tâm, đếm, điều chỉnh đến nồng độ huyền phù tế bào là $7,5 \times 10^6$ tế bào/mL bằng môi trường đầy đủ và cấy vào đĩa màu trắng có 96 lỗ. 33 μL huyền phù tế bào MX-1 được bổ sung vào mỗi lỗ trong "nhóm tế bào hỗn hợp", và 33 μL PBS được bổ sung vào mỗi lỗ trong "nhóm tế bào đơn". Các tế bào khối u NCI-H929-LUC với sự biểu hiện B7-H4 âm tính (số catalo Cobioer CBP30061L) được thu gom. Mật độ tế bào được điều chỉnh đến $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL. 33 μL huyền phù tế bào NCI-H929-LUC được bổ sung vào mỗi lỗ trong "nhóm tế bào hỗn hợp" và "nhóm tế bào đơn". Đĩa tế bào được đặt trong tủ ủ 37°C , 5% CO_2 để nuôi cấy qua đêm. Vào ngày thứ hai của thử nghiệm, nồng độ cao nhất của thể tiếp hợp kháng thể-được chất hu2F7-Exatecan

(hợp chất 34, $y=8$) cần thử nghiệm được điều chỉnh đều đến 3000 nM, và được pha loãng để thu được gradien gấp 5 lần của 9 liều. 33,3 μ L dung dịch làm việc chứa thể tiếp hợp kháng thể-được chất đã pha loãng được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa thử nghiệm và trộn nhẹ. Đĩa tế bào được đặt trong tủ ủ 37°C, 5% và ủ trong 48 giờ. Đĩa nuôi cấy tế bào được lấy ra và làm cân bằng đến nhiệt độ phòng. Sau đó 100 μ L tác nhân phản ứng ONE-Glo™ Luciferaza (Promega E6120) được bổ sung vào mỗi lỗ. Các tế bào được lắc và dung giải ở nhiệt độ phòng trong bóng tối trong 10 phút. Dịch dung giải tế bào được ly tâm ở tốc độ 1000 rpm/phút trong 1 phút, và sau đó được chuyển sang đĩa có 96 lỗ với đáy trong suốt ở nồng độ 180 μ L mỗi lỗ. Đĩa được đọc ở bước sóng 490 nm trên thiết bị đọc vi đĩa. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism, và các kết quả thử nghiệm là như được thể hiện trong Bảng 9. Tác nhân phản ứng ONE-Glo™ Luciferaza có thể được phát hiện riêng khả năng sống của các tế bào NCI-H929-LUC. hu2F7-Exatecan tiêu diệt hiệu quả các tế bào NCI-H929-LUC ở "nhóm tế bào hỗn hợp", chứng tỏ là sự có mặt của các tế bào dương tính B7-H4, hu2F7-Exatecan có hiệu quả tiêu diệt ngoài cuộc, và nó không chỉ tiêu diệt các tế bào dương tính B7-H4, mà còn tiêu diệt cả các tế bào âm tính B7-H4 không nhạy cảm (trong "nhóm tế bào đơn").

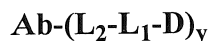
Bảng 9. Đánh giá hoạt tính tiêu diệt ngoài cuộc

Nhóm thử nghiệm	IC ₅₀ (nM)	Tỷ lệ ức chế tối đa
Nhóm tế bào hỗn hợp (MX-1:NCI-LUC=5:1)	70,34	76,8%
Nhóm tế bào đơn (NCI-H929-LUC)	ND	ND

ND: Không phát hiện thấy hoạt tính.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng,



(A)

trong đó:

D là được chất gây độc tế bào;

L_1 và L_2 là các đơn vị liên kết;

y là một số nằm trong khoảng từ 1 đến 20;

Ab là kháng thể B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể,

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:9, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:10 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:11; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:12, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:13 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:14.

2. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 1, trong đó Ab là kháng thể chuột hoặc một đoạn của nó, kháng thể khảm hoặc một đoạn của nó, kháng thể người hoặc một đoạn của nó, và kháng thể được làm tương thích với người hoặc một đoạn của nó.

3. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 1, trong đó Ab còn bao gồm vùng nêu trong mục bất kỳ trong số các mục (a), (b) và (c) hoặc tổ hợp của chúng:

(a) (các) vùng khung chuỗi nhẹ và (các) vùng khung chuỗi nặng có nguồn gốc từ các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng dòng mầm của người hoặc (các) trình tự đột biến của chúng;

(b) (các) vùng cố định chuỗi nặng có nguồn gốc từ IgG1 người hoặc biến thể của nó, IgG2 hoặc biến thể của nó, IgG3 hoặc biến thể của nó hoặc IgG4 hoặc biến thể của nó;

(c) (các) vùng cố định chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ chuỗi κ , chuỗi λ của người hoặc biến

thể của nó.

4. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 3, trong đó (các) vùng cố định chuỗi nặng có nguồn gốc từ IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người.

5. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 4, trong đó (các) vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 có tính độc ADCC được tăng cường sau khi gây đột biến axit amin.

6. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 5, trong đó vùng cố định chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 54.

7. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 3, trong đó (các) vùng cố định chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ chuỗi κ của người.

8. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 7, trong đó vùng cố định chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO:55.

9. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 1, trong đó Ab bao gồm (các) vùng biến đổi chuỗi nhẹ có các trình tự sau: SEQ ID NO: 18.

10. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 1, trong đó Ab bao gồm (các) vùng biến đổi chuỗi nặng có các trình tự sau: SEQ ID NO: 17.

11. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 1, trong đó chuỗi nhẹ của Ab được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau: SEQ ID NO: 22.

12. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng

theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng của Ab được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau: SEQ ID NO: 21.

13. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 1, trong đó Ab bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18.

14. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 13, trong đó Ab bao gồm chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22 và chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21.

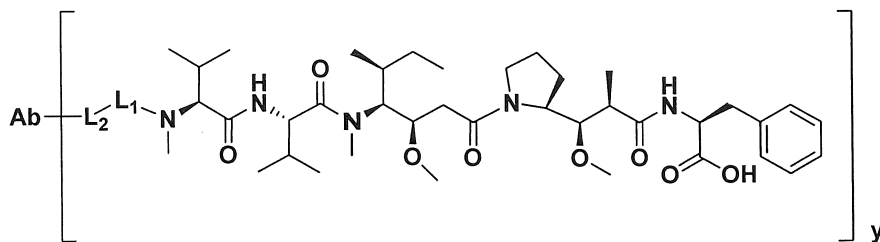
15. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó đoạn gắn kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn, vùng V được dime hóa, vùng V được làm ổn định liên kết disulfua và các đoạn gắn kết với kháng nguyên của peptit chứa các CDR.

16. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó dược chất gây độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm độc tố, chất hóa trị liệu, kháng sinh, đồng vị phóng xạ và enzym phân hủy nhân.

17. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó dược chất gây độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế tubulin hoặc chất ức chế ADN topoisomeraza mà ức chế sự phân chia tế bào.

18. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 17, trong đó dược chất gây độc tế bào được chọn từ DM1, DM3, DM4, SN-38, MMAF hoặc MMAE.

19. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng



(I)

trong đó:

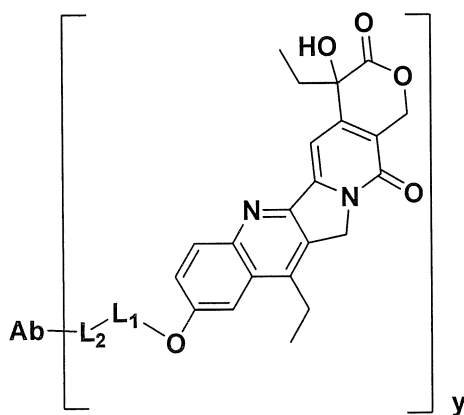
L_1 và L_2 là các đơn vị liên kết;

y là một số được chọn từ 1 đến 8;

Ab là kháng thể B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

24. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng theo điểm 23, trong đó y là một số được chọn từ 2 đến 4.

25. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng theo điểm 1, trong đó thở tiếp hợp kháng thể-dược chất là như dược thể hiện trong công thức chung (II):



(II)

trong đó:

L_1 và L_2 là các đơn vị liên kết;

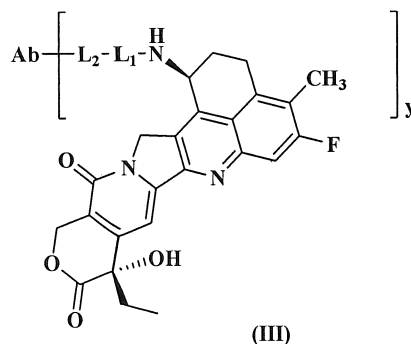
y là một số được chọn từ 1 đến 8;

Ab là kháng thể B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

26. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng

theo điểm 25, trong đó y là một số được chọn từ 2 đến 4.

27. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 1, trong đó thở tiếp hợp kháng thể-dược chất là như được thể hiện trong công thức chung (III):



trong đó:

L_1 và L_2 là các đơn vị liên kết;

y là một số được chọn từ 1 đến 10;

Ab là kháng thể B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

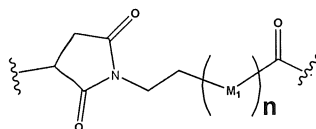
28. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 27, trong đó y là một số được chọn từ 2 đến 8.

29. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 28, trong đó y là một số được chọn từ 4 đến 8.

30. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 29, trong đó y là một số được chọn từ 6 đến 8.

31. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 30, trong đó y là 8.

32. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 31, trong đó L_1 là như được thể hiện trong công thức chung (B):



(B)

trong đó:

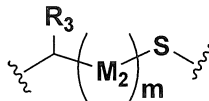
M_1 là $-CR_1R_2-$;

R_1 và R_2 là giống nhau hoặc khác nhau, và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, halogen, hydroxyl và amino;

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 5.

33. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 32, trong đó n là 1, 2 hoặc 3.

34. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 31, trong đó L_2 là như được thể hiện trong công thức chung (C):



(C)

trong đó:

M_2 là $-CR_4R_5-$;

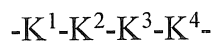
R_3 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, hydroxyl, amino, alkyl, alkoxy và xycloalkyl;

R_4 và R_5 là giống nhau hoặc khác nhau, và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, halogen, hydroxyl và amino;

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 5.

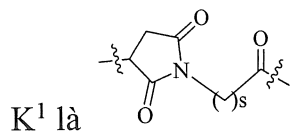
35. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 34, trong đó m là 1, 2 hoặc 3.

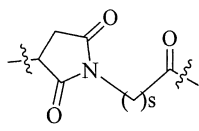
36. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 31, trong đó L_2 là như được thể hiện trong công thức chung (D):



(D)

trong đó:



K^1 là , s là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

K^2 được chọn từ nhóm bao gồm $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$, $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$, $-S(CH_2)_pC(O)-$ và liên kết đơn, p là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20;

R_1 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đoteri, hydroxyl, amino, alkyl, halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl;

K^3 là gốc tetrapeptit;

K^4 là $-NR^2(CR^3R^4)_t-$, mỗi R^2 , R^3 hoặc R^4 độc lập là hydro, đoteri, hydroxyl, amino, alkyl, halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl, và t là 1 hoặc 2.

37. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 36, trong đó:

p là từ 1 đến 6;

gốc tetrapeptit là gốc peptit được tạo thành bởi các axit amin được chọn từ nhóm bao gồm hai hoặc nhiều axit amin trong số phenylalanin, glyxin, valin, lysin, citrullin, serin, glutamat và aspartat.

38. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 37, trong đó gốc tetrapeptit là GGFG.

39. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 36, trong đó đầu K^1 của đơn vị liên kết $-L_2-$ được liên kết với Ab, và đầu K^4 được liên kết với L_1 .

40. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 31, trong đó:

L_1 được chọn từ nhóm bao gồm $-O-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$, $-O-CR^5R^6-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^5R^6-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$ và $-S-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$;

mỗi R^a và R^b độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đoteri, halogen và alkyl;

R^5 là haloalkyl hoặc xycloalkyl;

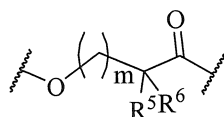
R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và xycloalkyl;

hoặc, R^5 và R^6 và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành xycloalkyl;

m là 0, 1, 2, 3 hoặc 4.

41. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 40, trong đó đầu O của L_1 được liên kết với đơn vị liên kết L_2 .

42. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 40, L_1 là như được thể hiện trong công thức chung (E):



(E),

R^5 được chọn từ nhóm bao gồm haloalkyl và xycloalkyl,

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và xycloalkyl,

hoặc, R^5 và R^6 và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành xycloalkyl;

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4.

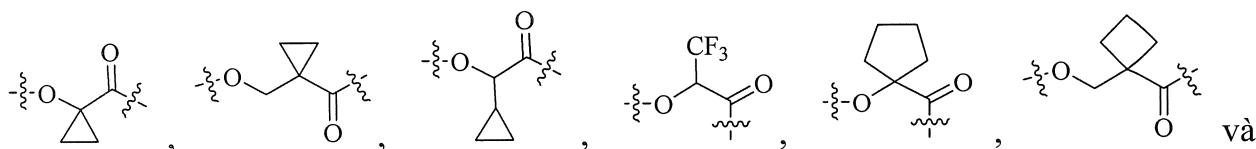
43. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 42, trong đó:

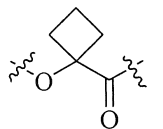
R^5 được chọn từ nhóm bao gồm C_{1-6} haloalkyl và C_{3-6} xycloalkyl,

R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C_{1-6} haloalkyl và C_{3-6} xycloalkyl,

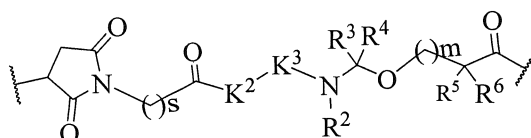
hoặc, R^5 và R^6 và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành C_{3-6} xycloalkyl.

44. Thẻ tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 43, trong đó công thức chung (E) được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm thể sau:





45. Thở tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, 18 đến 19, 21, 23 đến 31, 33, 35, 37 đến 39, 41 đến 44, trong đó -L₂-L₁- là như được thể hiện trong cấu trúc sau:



K² là một liên kết;

K³ là gốc tetrapeptit GGFG;

R⁵ được chọn từ nhóm bao gồm haloalkyl và C₃₋₆ xycloalkyl;

R⁶ được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và C₃₋₆ xycloalkyl;

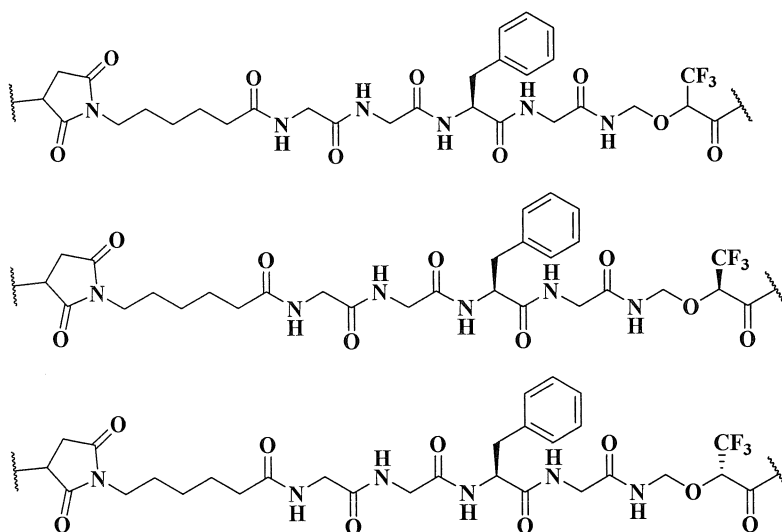
hoặc, R⁵ và R⁶ và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành C₃₋₆ xycloalkyl;

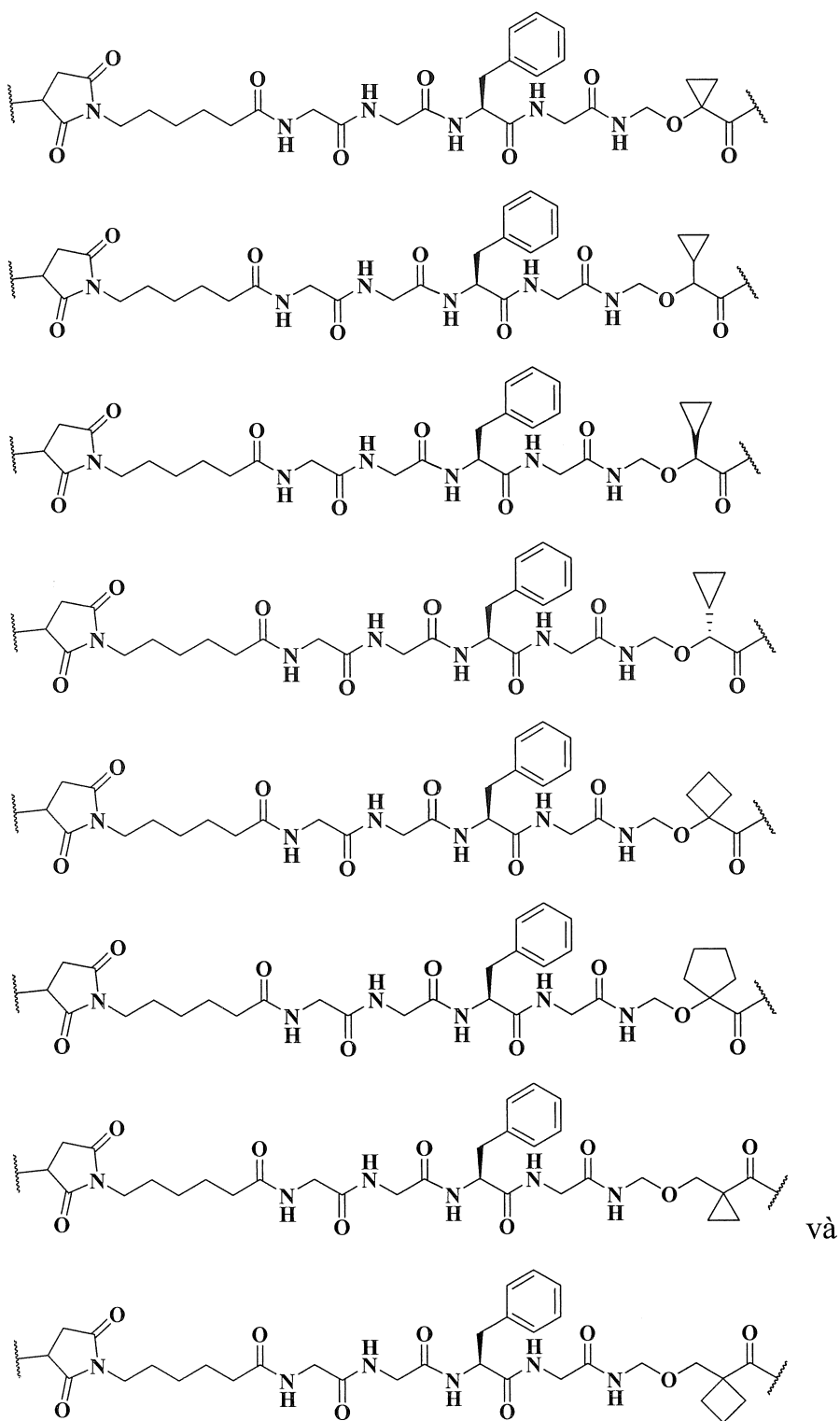
mỗi R², R³ hoặc R⁴ độc lập là hydro hoặc alkyl;

s là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4.

46. Thở tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 45, trong đó -L₂-L₁- được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc sau:





47. Thể tiếp hợp kháng thể-độc chất hoặc muối hoặc solvat được dùng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó thể tiếp hợp kháng thể-độc chất là như được thể hiện trong công thức chung (IV):



trong đó:

W được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₈ alkyl, C₁₋₈ alkyl-xycloalkyl và heteroalkyl mạch thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử, heteroalkyl bao gồm 1 đến 3 dị nguyên tử được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S;

K² được chọn từ nhóm bao gồm -NR¹(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂CH₂C(O)-, -NR¹(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂C(O)-, -S(CH₂)_{p1}C(O)- hoặc liên kết, R¹ được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl, và p₁ là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20;

K³ là gốc peptit có từ 2 đến 7 axit amin, (các) axit amin có thể được thế hoặc không được thế; nếu được thế, (các) nhóm thế có thể được thế ở điểm gắn kết có sẵn bất kỳ, và (các) nhóm thế độc lập là một hoặc nhiều nhóm được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxyl, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đoteri hóa, alkoxy và xycloalkyl;

R² độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa và hydroxyalkyl;

mỗi R³ và R⁴ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl được đơteri hóa và hydroxyalkyl;

R⁵ được chọn từ nhóm bao gồm halogen, haloalkyl, alkyl được đơteri hóa, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl;

R⁶ được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, haloalkyl, alkyl được đoteri hóa, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl;

hoặc, R⁵ và R⁶ và nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành xycloalkyl hoặc heteroxyclyl;

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4;

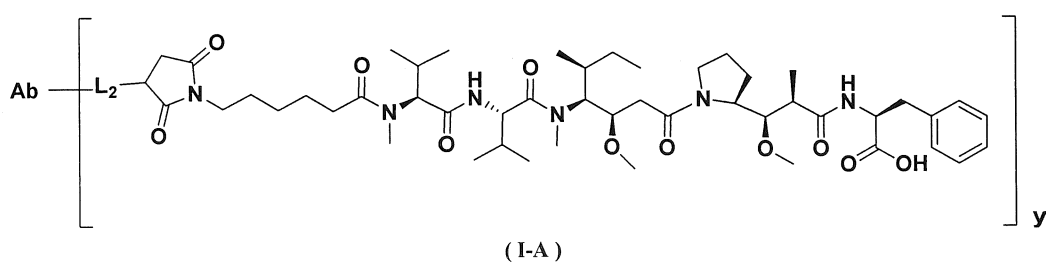
y là từ 1 đến 10, y là một số thập phân hoặc số nguyên;

Ab là kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó.

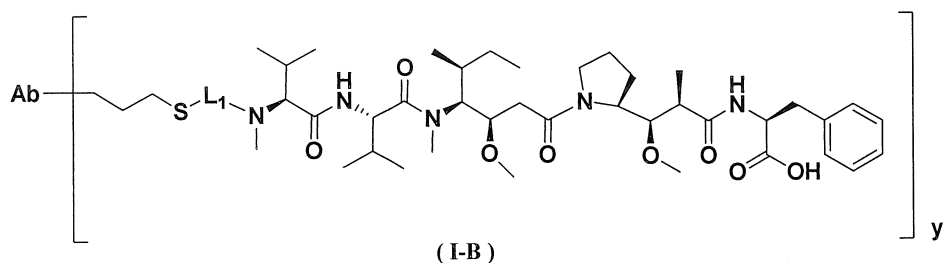
48. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dùng của chúng

theo điểm 47, trong đó C₁₋₈ alkyl, xycloalkyl và heteroalkyl tuyến tính tùy ý còn được thế bằng một hoặc nhiều nhóm thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxyl, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đơteri hóa, alkoxy và xycloalkyl.

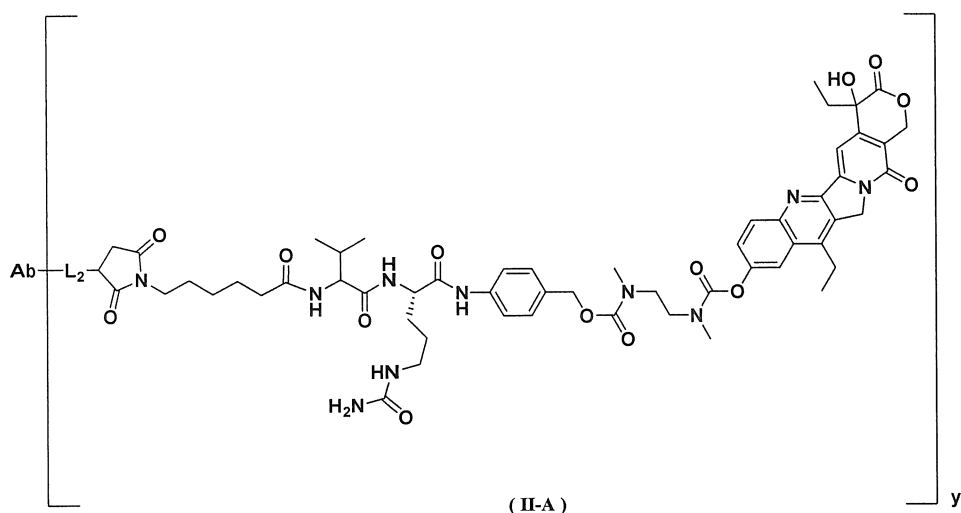
49. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (I) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 23, trong đó thể tiếp hợp kháng thể-dược chất là như được thể hiện trong công thức chung (I-A):



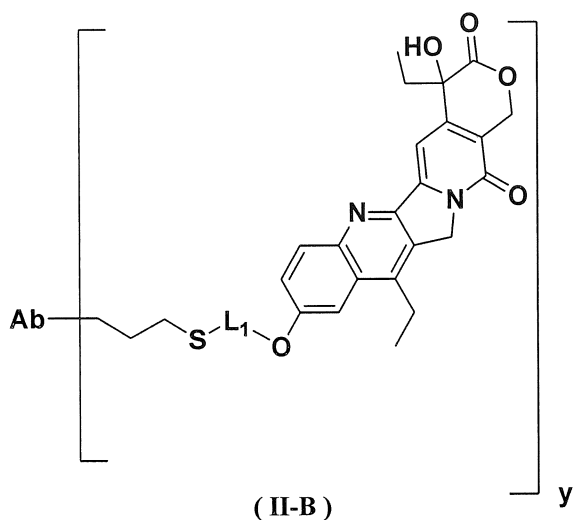
50. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (I) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 23, trong đó thể tiếp hợp kháng thể-dược chất là như được thể hiện trong công thức chung (I-B):



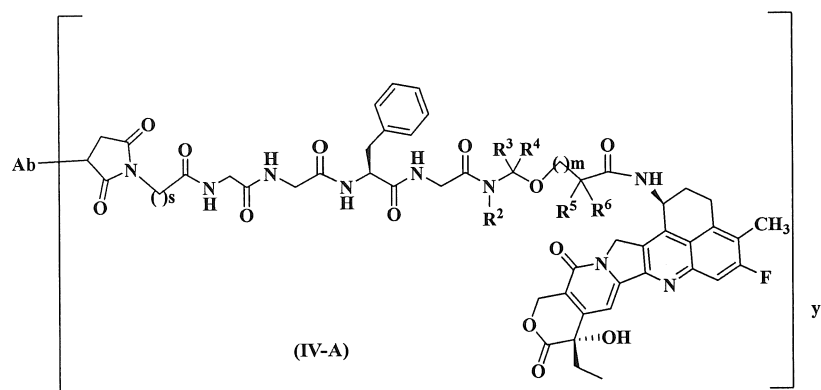
51. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (II) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 25, trong đó thể tiếp hợp kháng thể-dược chất là như được thể hiện trong công thức chung (II-A):



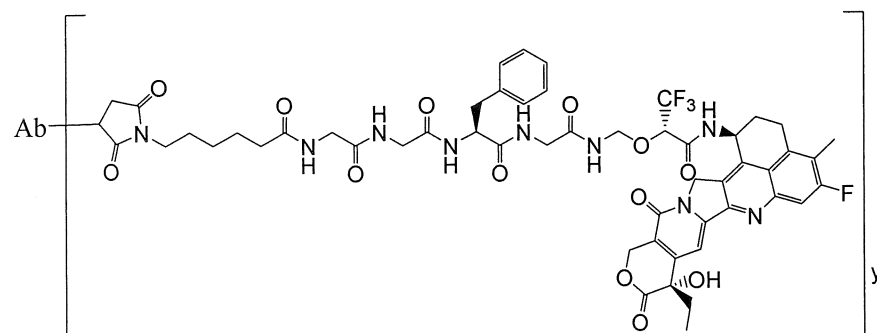
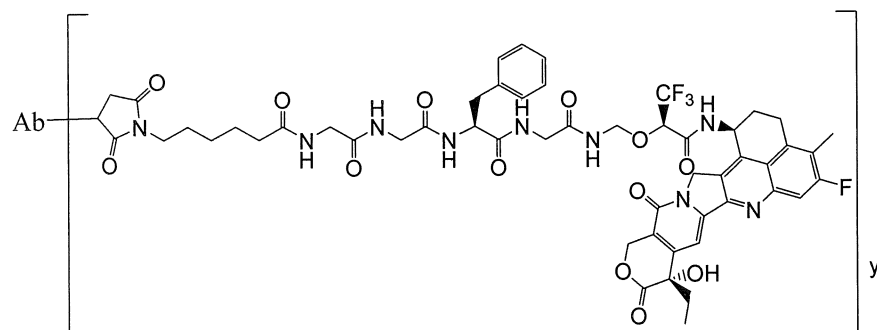
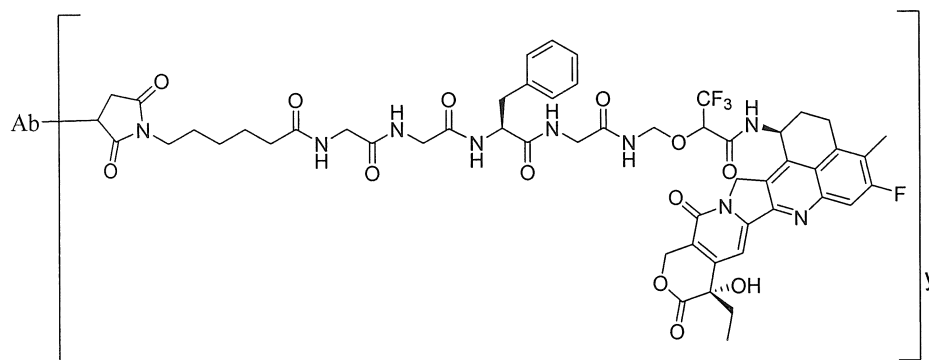
52. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (II) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 25, trong đó thể tiếp hợp kháng thể-dược chất là như được thể hiện trong công thức chung (II-B):

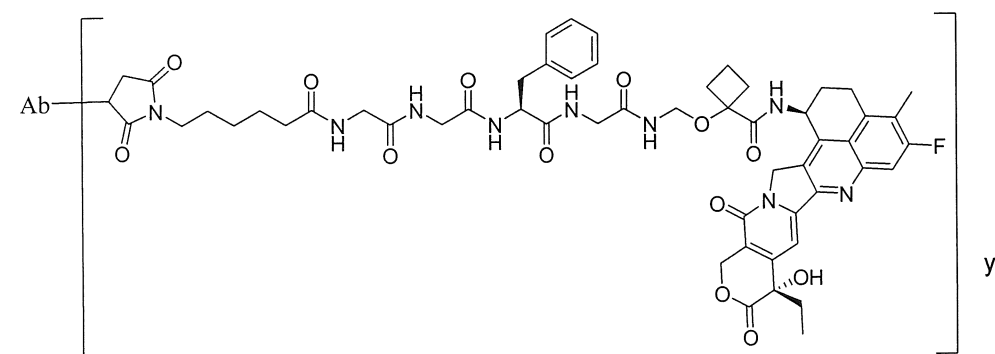
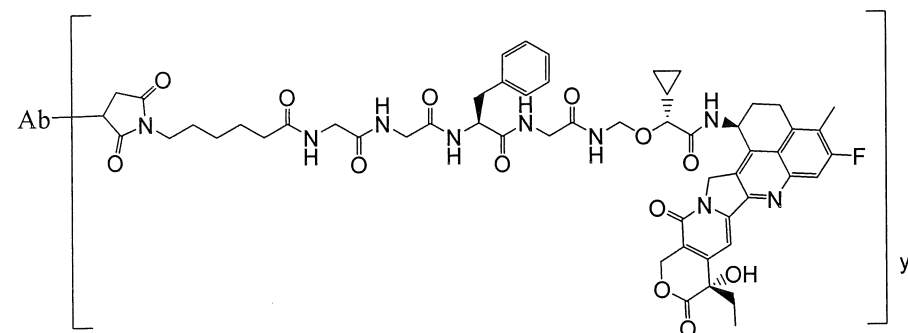
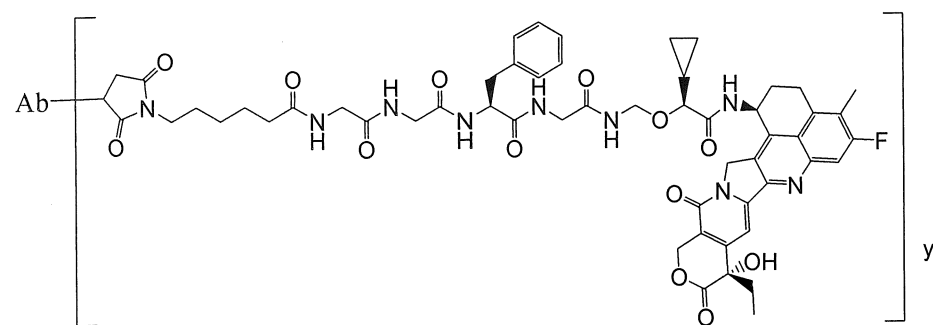
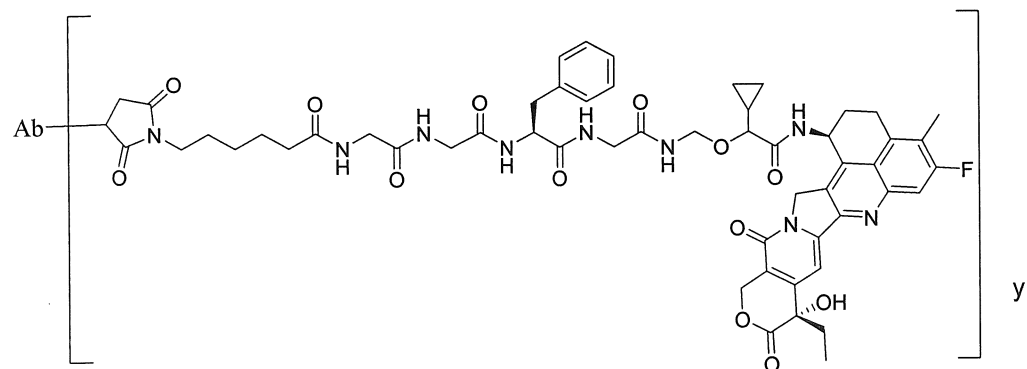
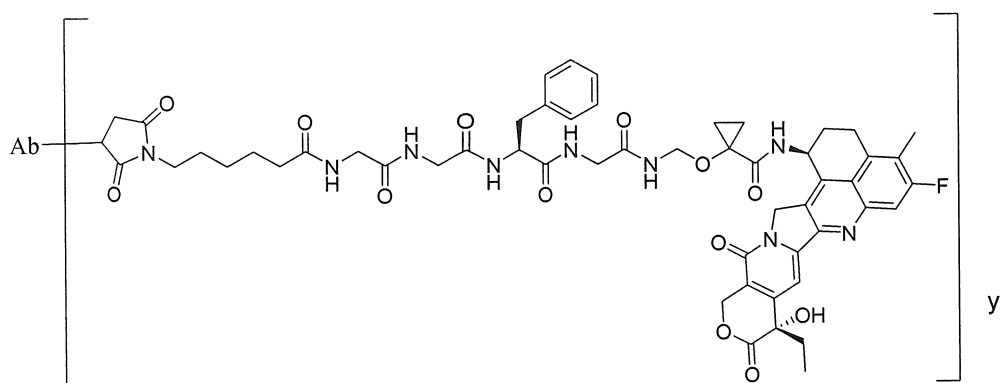


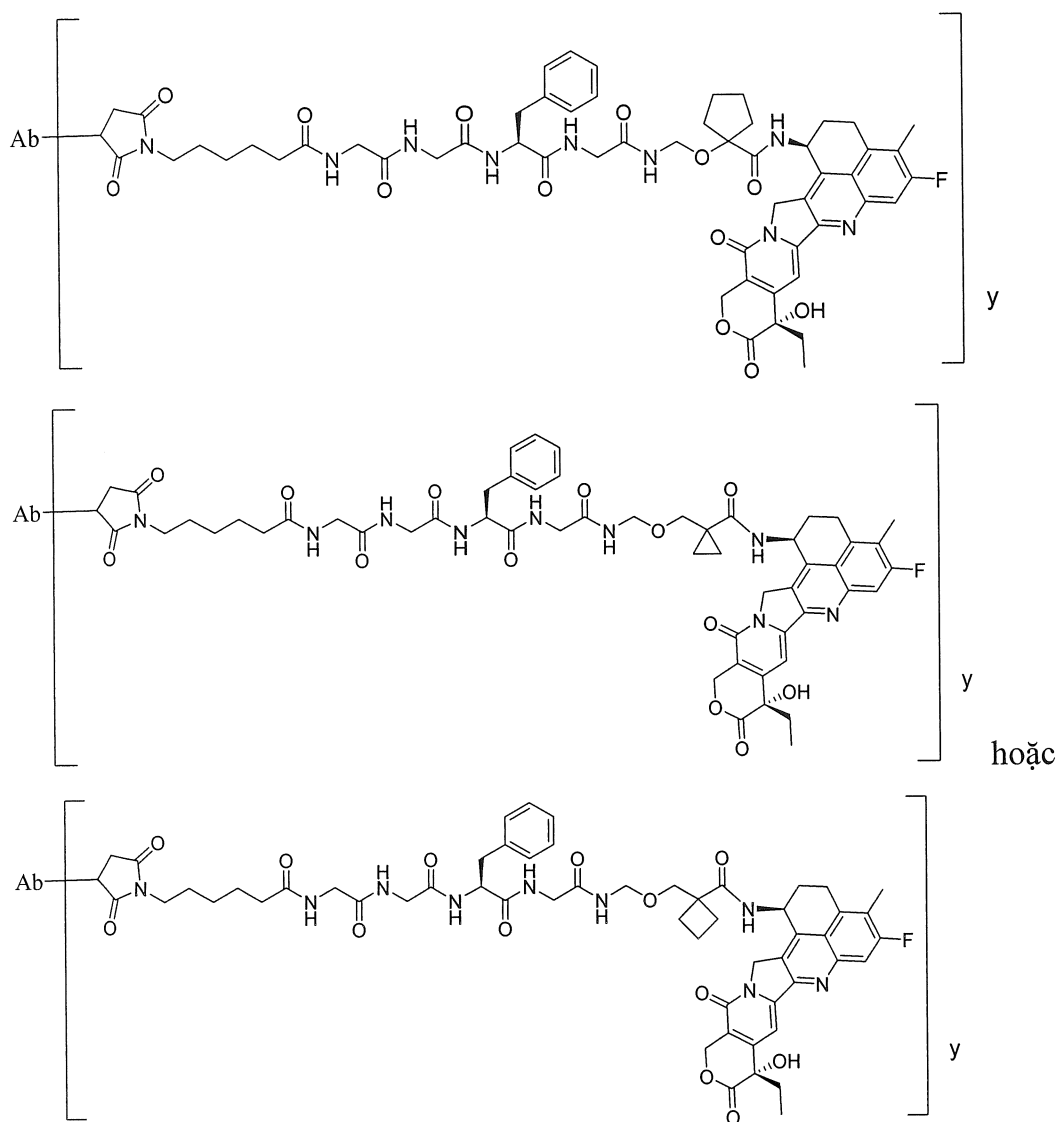
53. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 47, trong đó thể tiếp hợp kháng thể-dược chất là như được thể hiện trong công thức chung (IV-A):



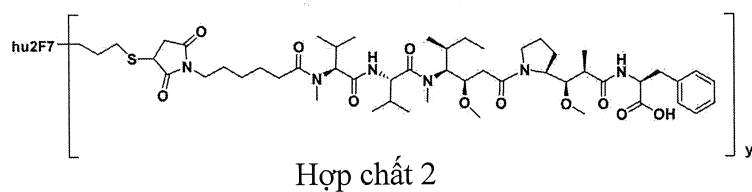
54. Thể tiếp hợp kháng thể-được chất hoặc muối hoặc solvat được dựng của chúng theo điểm 53, trong đó, thể tiếp hợp kháng thể-được chất được thể hiện như sau:

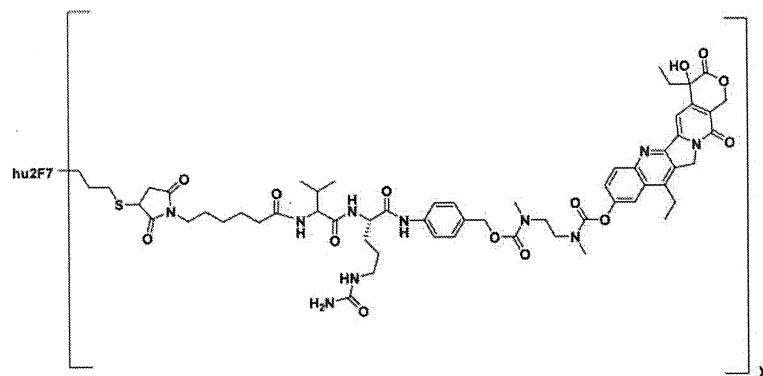




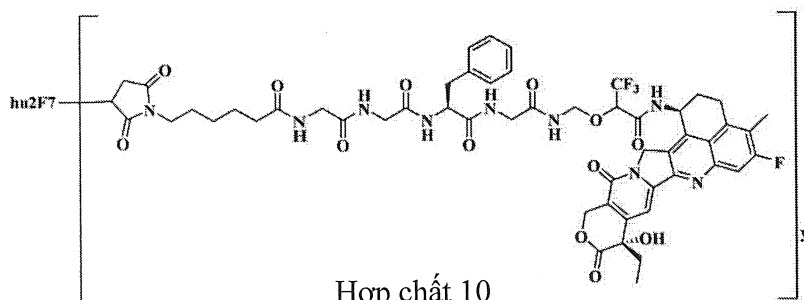


55. Thở tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 54, trong đó thở tiếp hợp kháng thể-dược chất được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất sau:

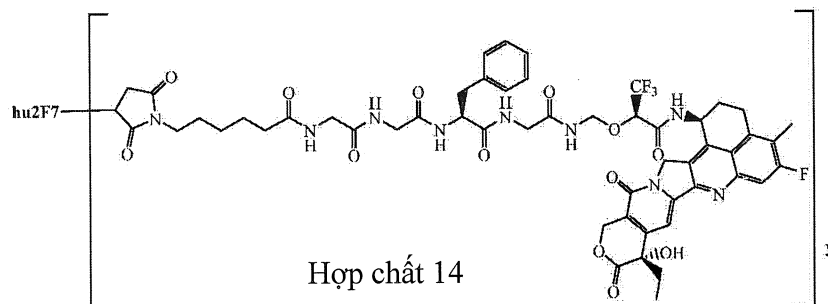




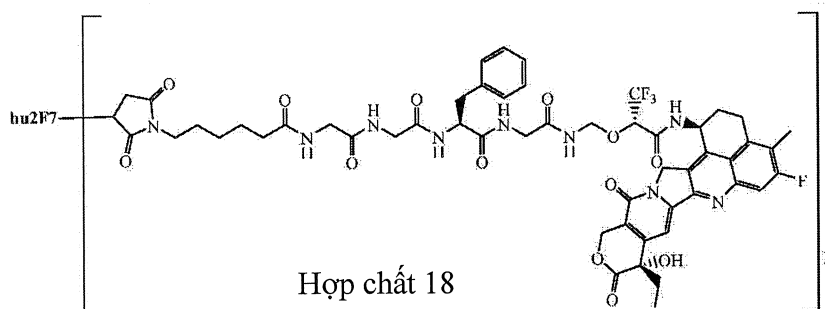
Hợp chất 6



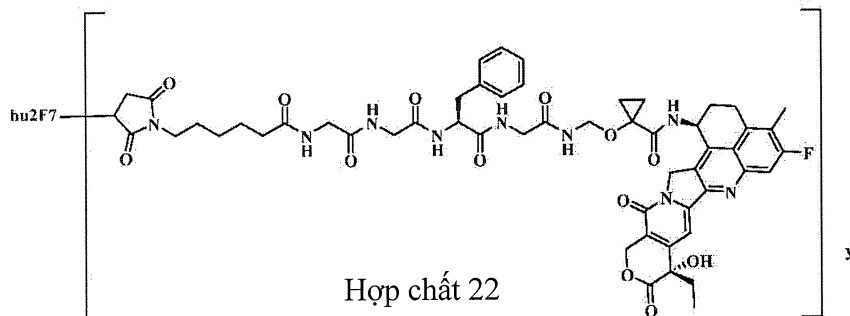
Hợp chất 10



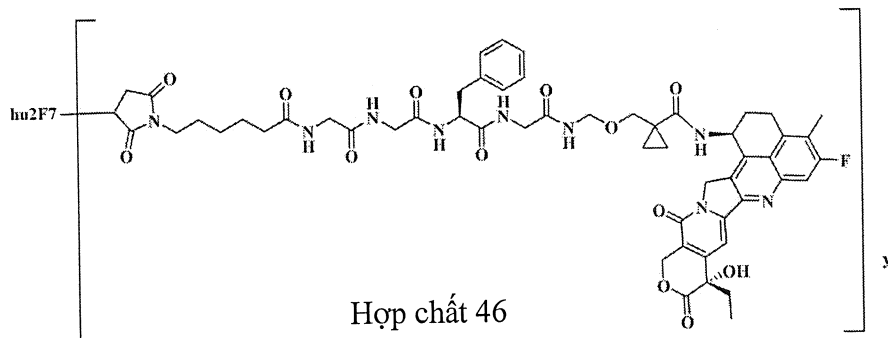
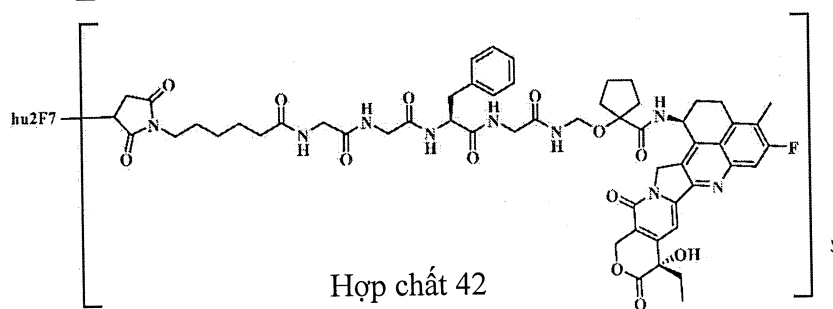
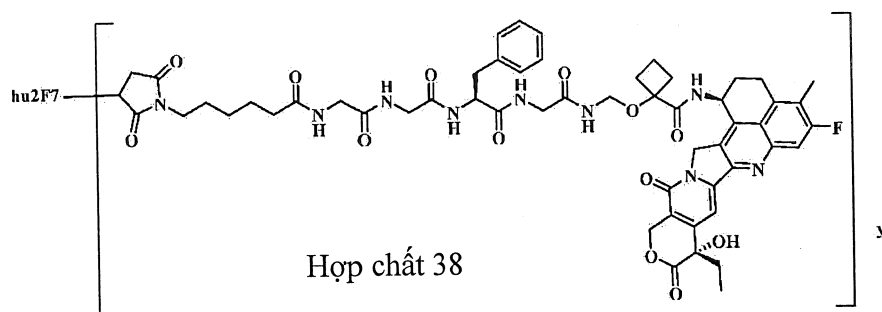
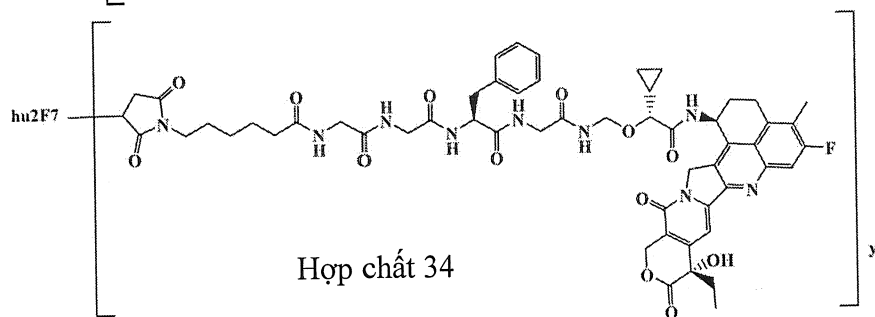
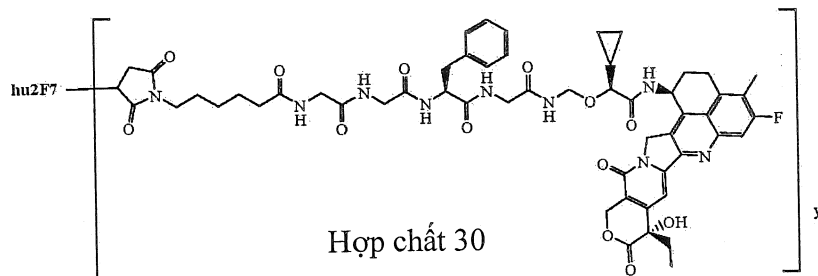
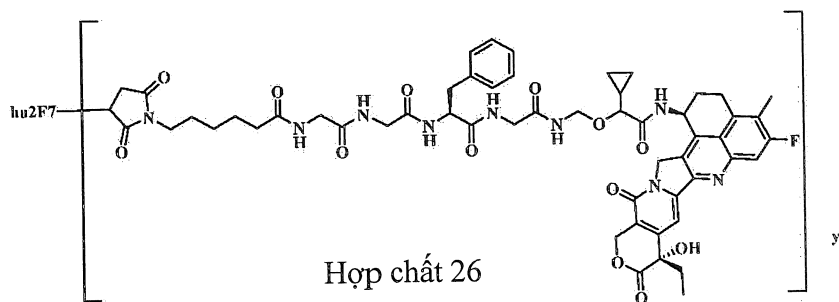
Hợp chất 14

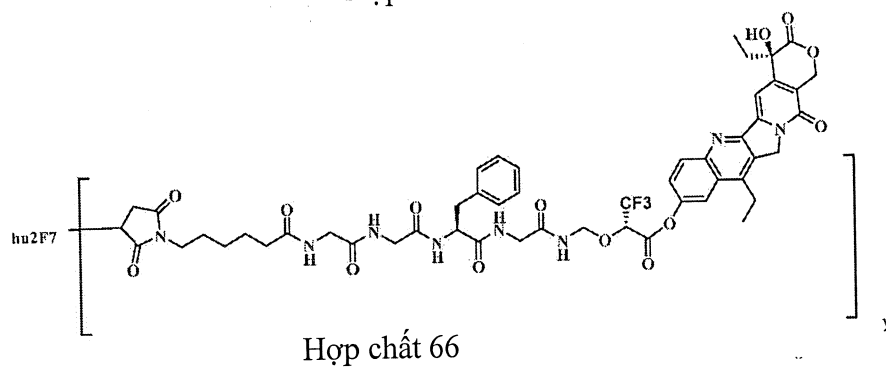
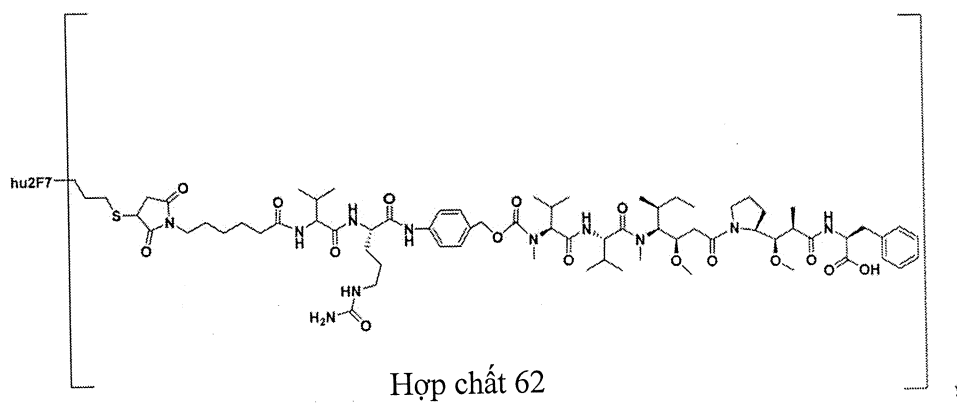
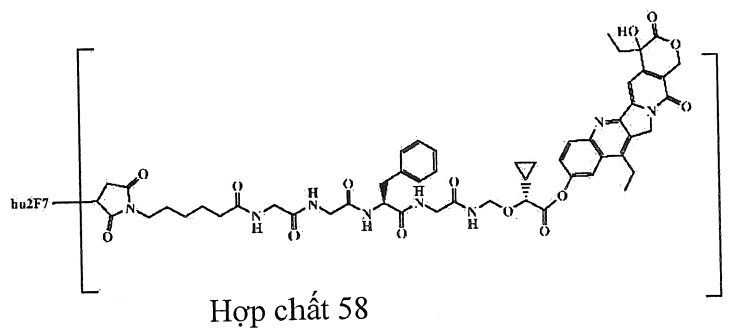
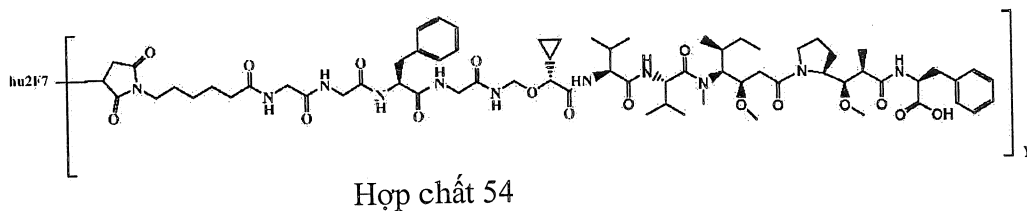
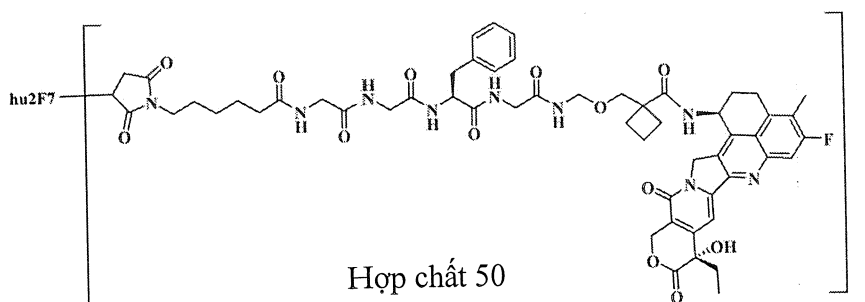


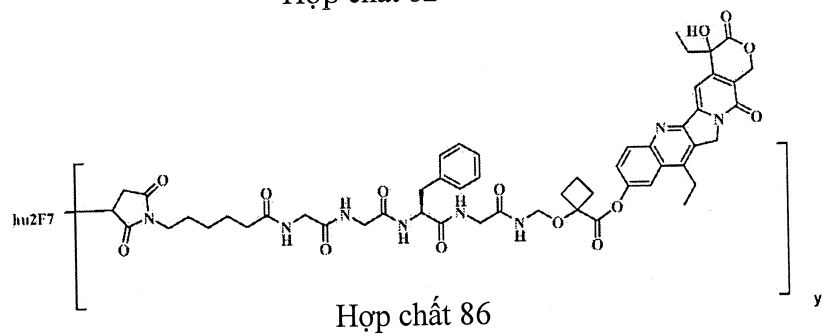
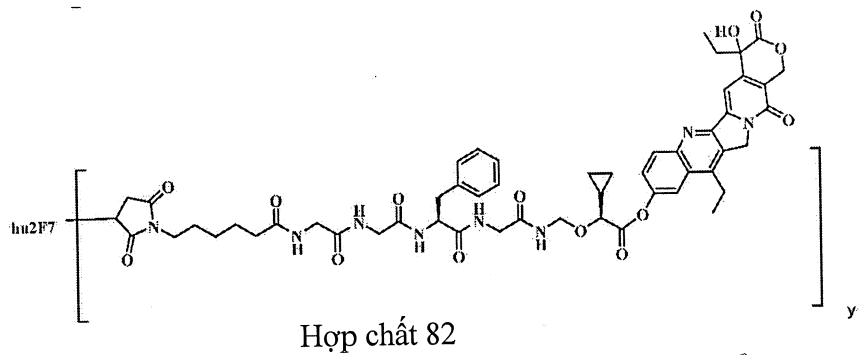
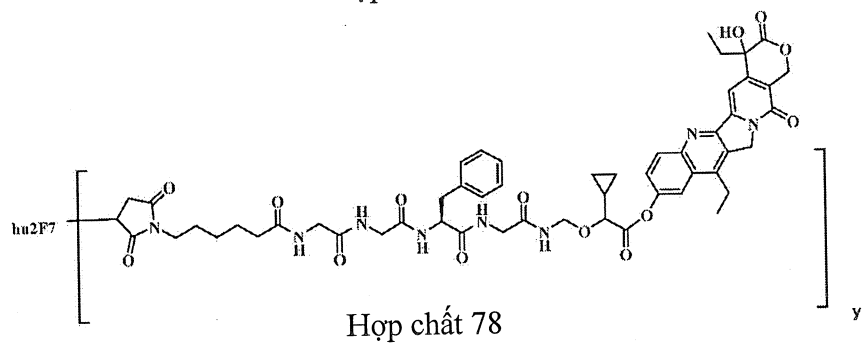
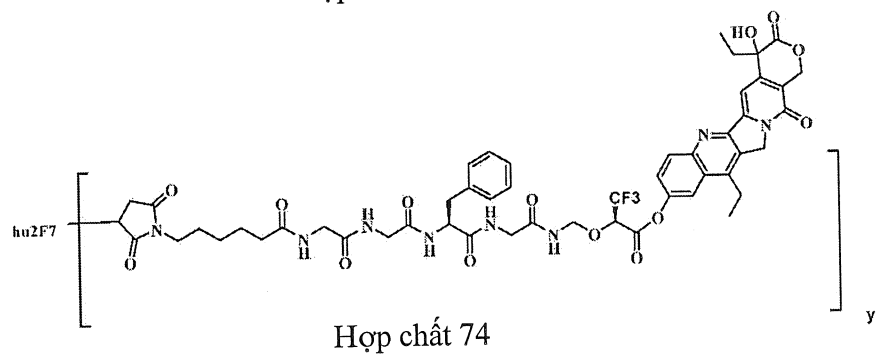
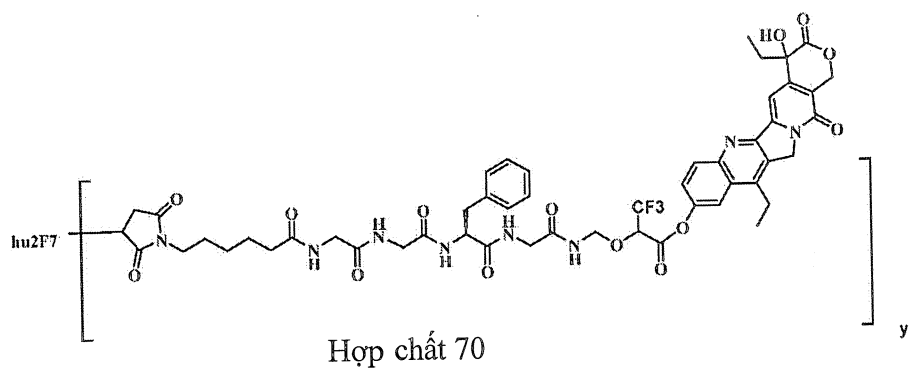
Hợp chất 18

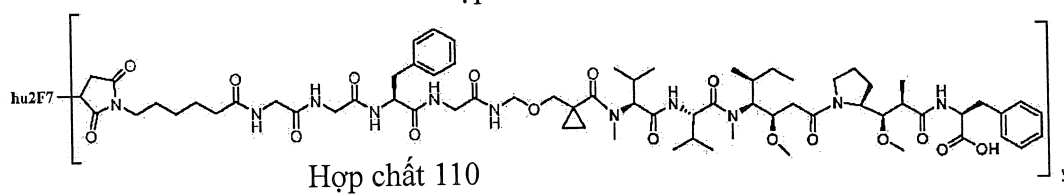
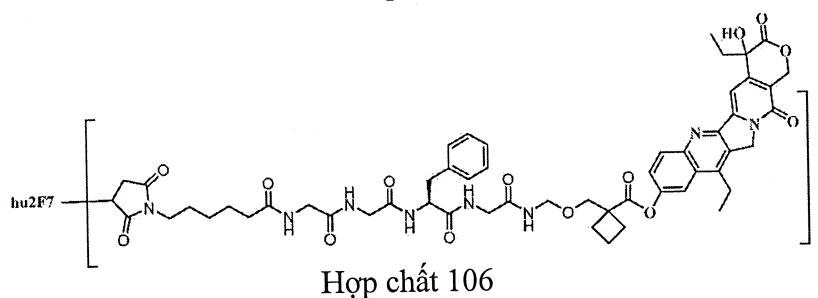
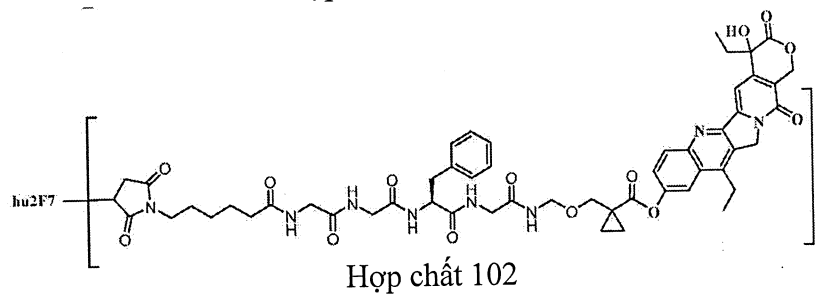
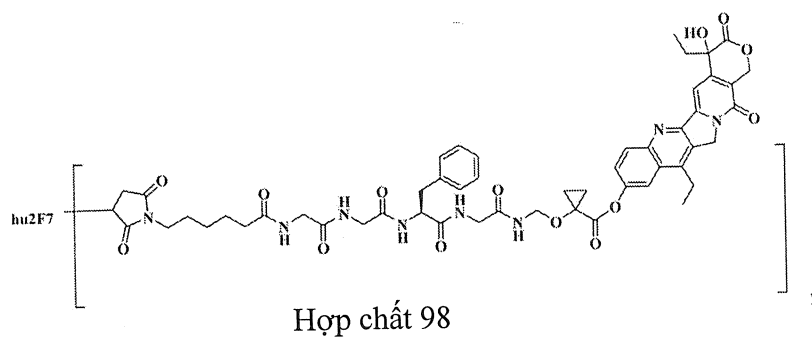
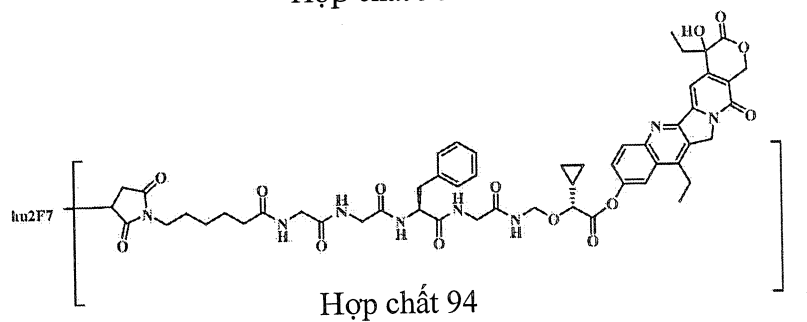
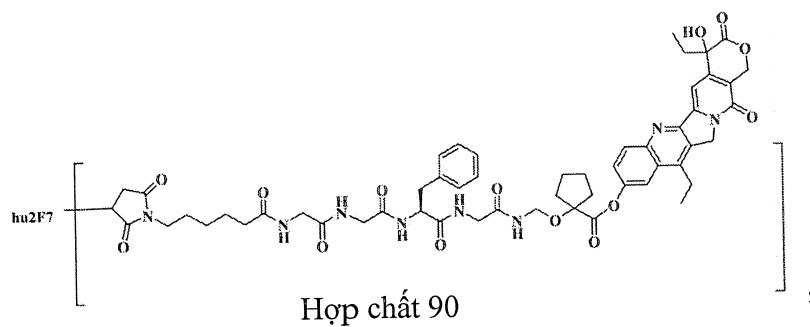


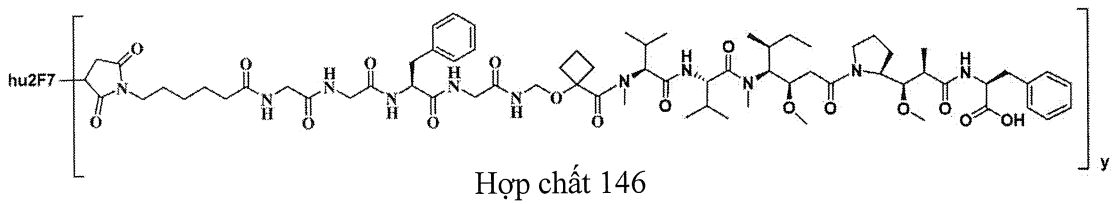
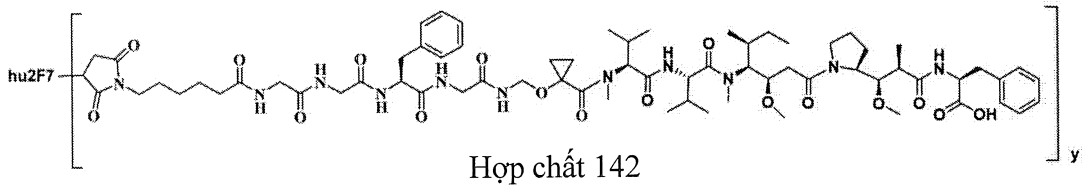
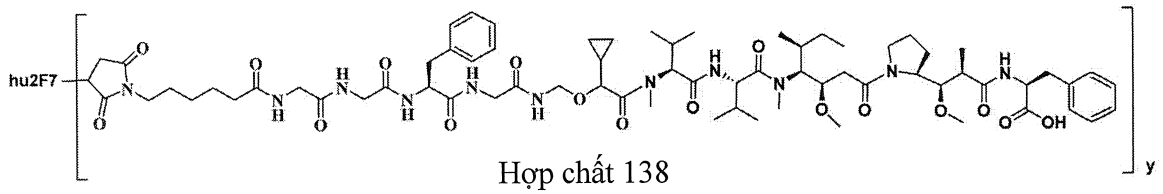
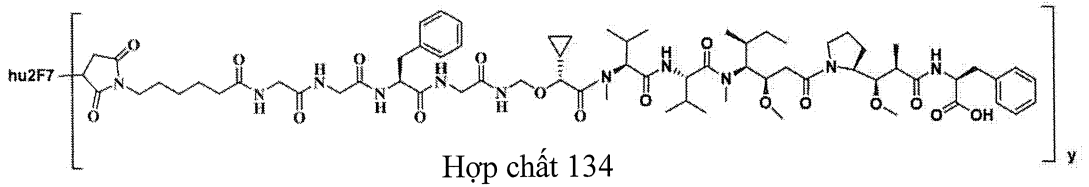
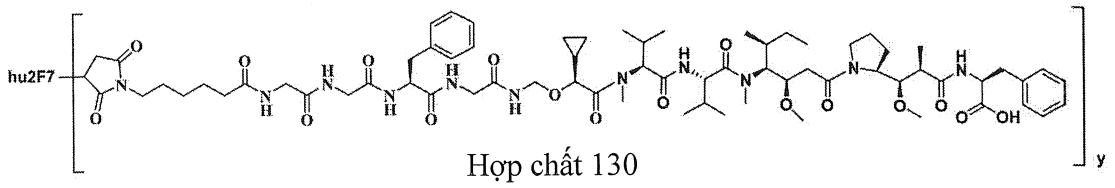
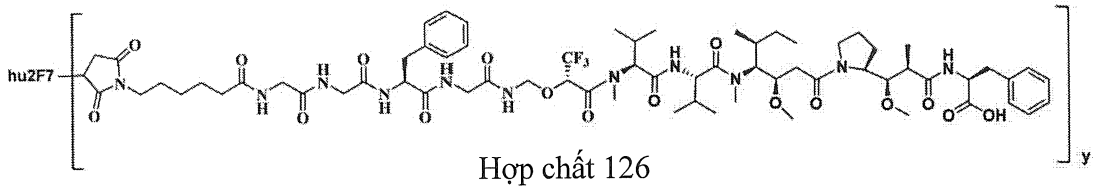
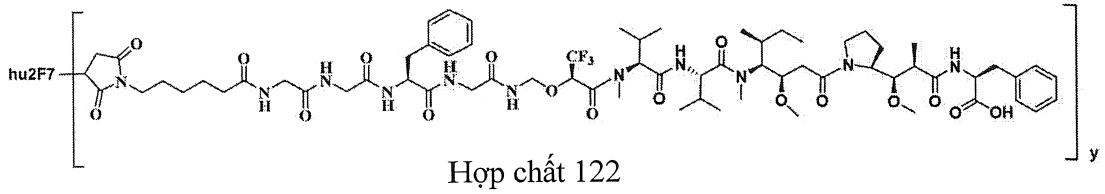
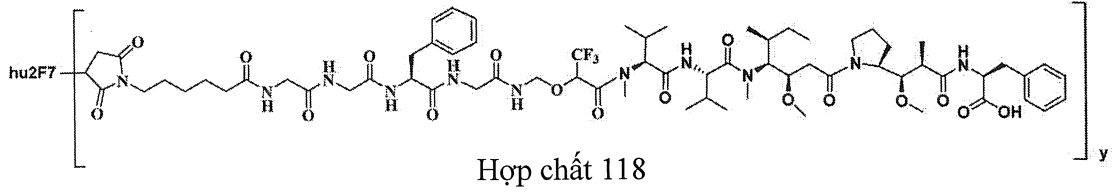
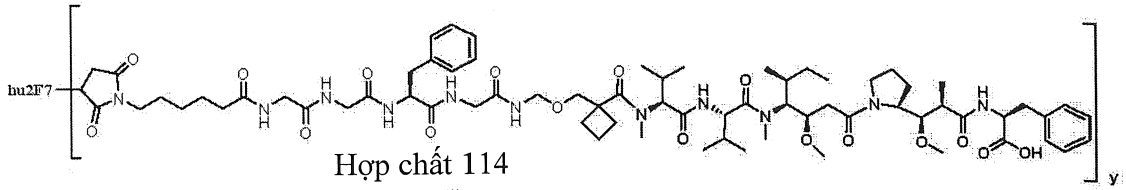
Hợp chất 22

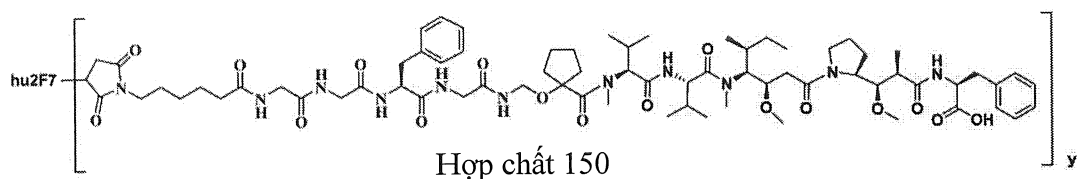












trong đó, y được chọn từ 2 đến 10, hu2F7 là kháng thể kháng B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

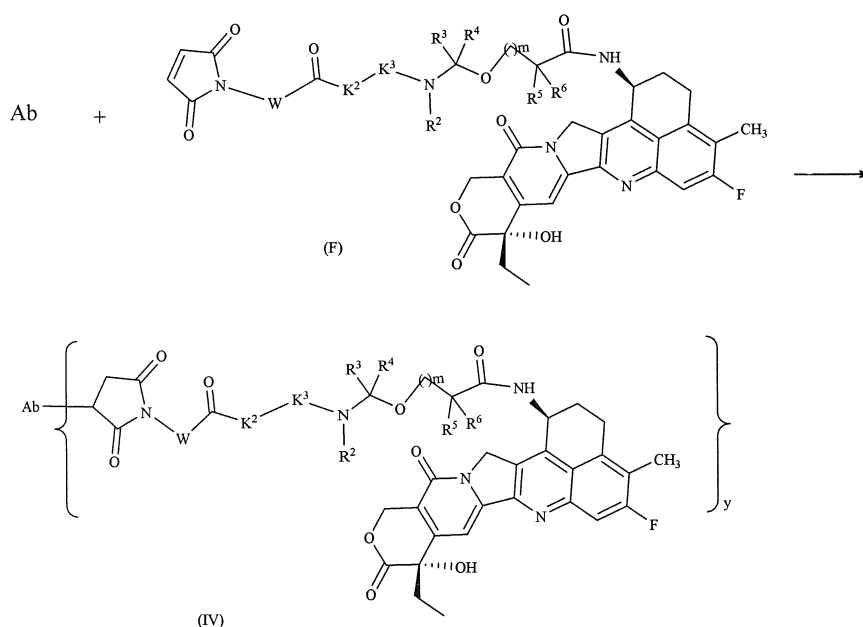
56. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 55, trong đó y được chọn từ 4 đến 8.

57. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 56, trong đó y được chọn từ 6 đến 8.

58. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 57, trong đó y được chọn từ 7 đến 8.

59. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (A) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo điểm 58, trong đó y là 8.

60. Phương pháp điều chế thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có công thức chung (IV) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng, mà bao gồm các bước sau:



một khi Ab được khử, nó được đưa vào phản ứng liên kết với hợp chất có công thức

chung (F) để thu được hợp chất có công thức chung (IV);

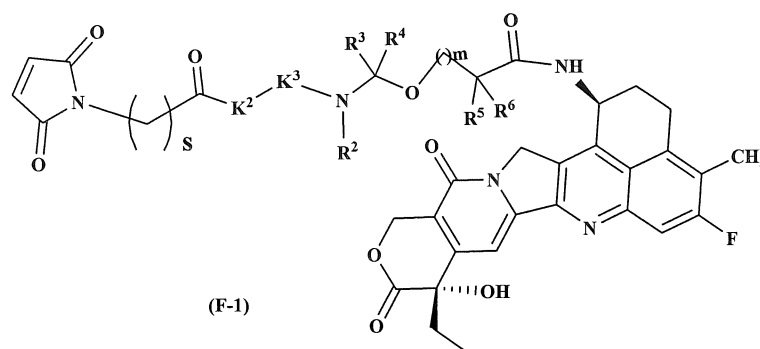
trong đó:

Ab là kháng thể B7-H4 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, mà bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể,

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:9, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:10 và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:11; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO:12, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO:13 và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO:14;

W, K^2 , K^3 , R^2 đến R^6 , m và y là như được nêu trong điểm 47.

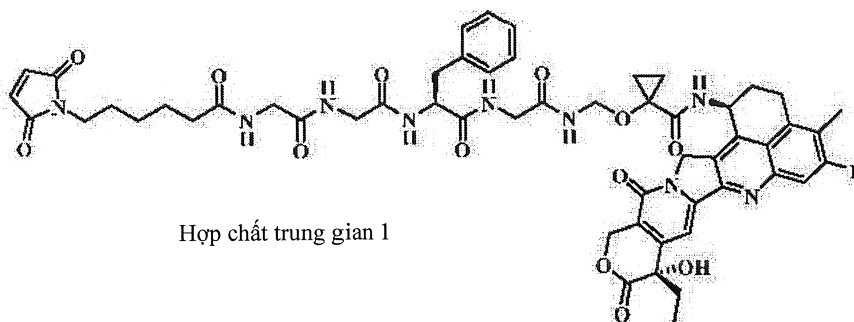
61. Phương pháp theo điểm 60, trong đó hợp chất có công thức chung (F) là hợp chất có công thức chung (F-1):



hoặc chất đồng phân hổ biến, mesome, raxemat, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang hoặc dạng hỗn hợp của chúng, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó

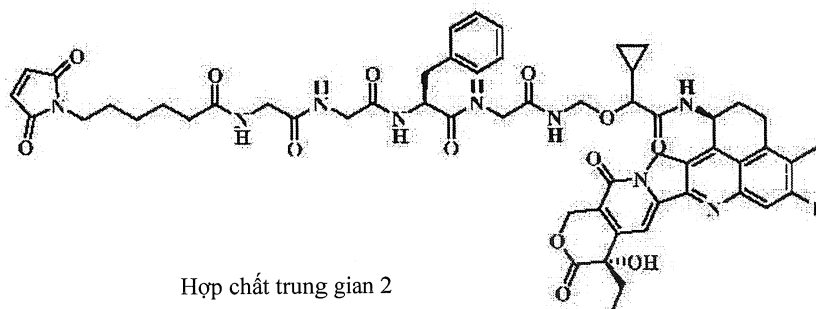
K^2 , K^3 , R^2 đến R^6 , s và m là như được nêu trong điểm 45.

62. Hợp chất có công thức chung (F) hoặc công thức chung (F-1), mà được chọn từ nhóm bao gồm:



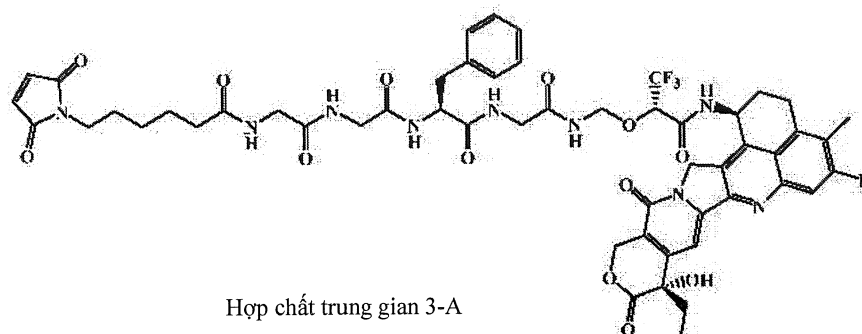
Hợp chất trung gian 1

2



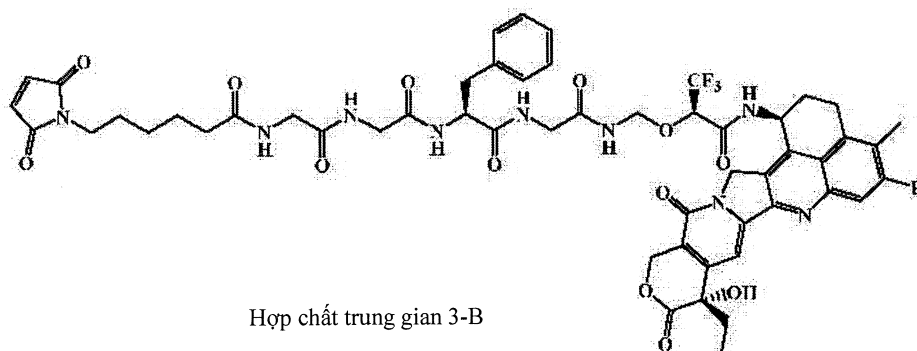
Hợp chất trung gian 2

2



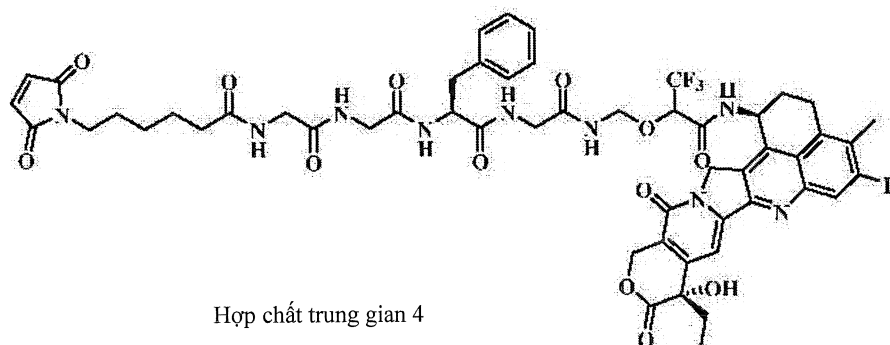
Hợp chất trung gian 3-A

2



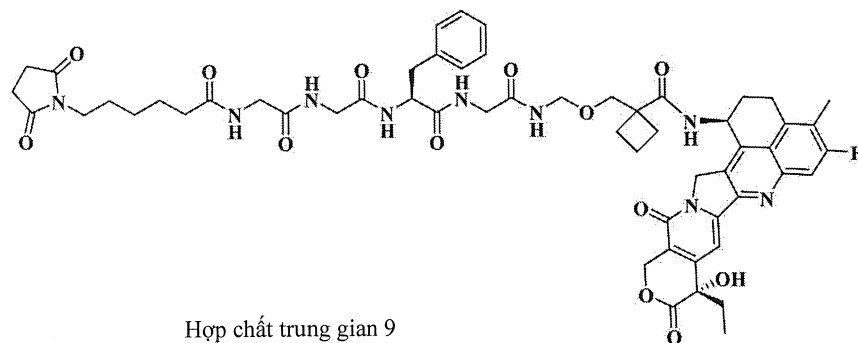
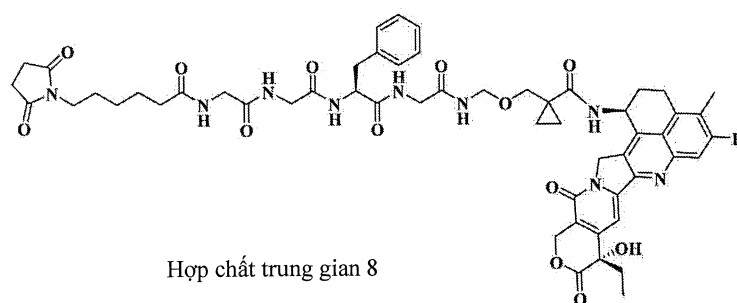
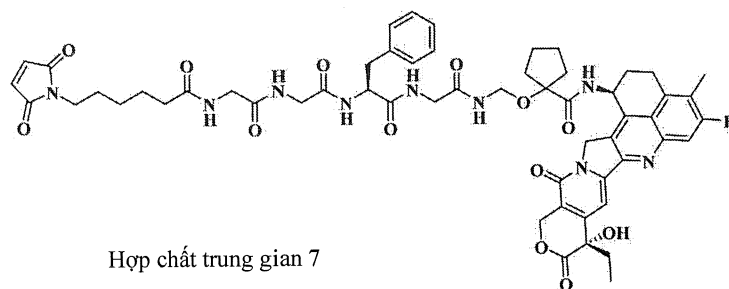
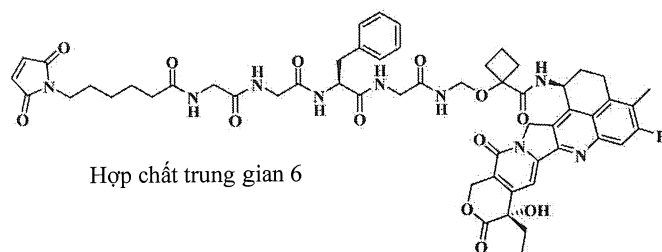
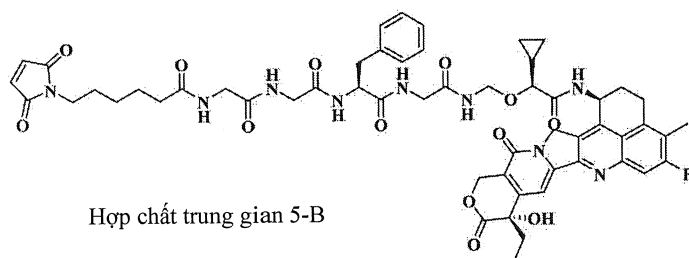
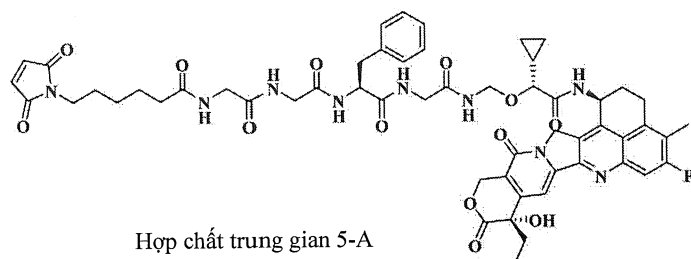
Hợp chất trung gian 3-B

2



Hợp chất trung gian 4

2



và

63. Dược phẩm chứa thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 59, hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng, và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

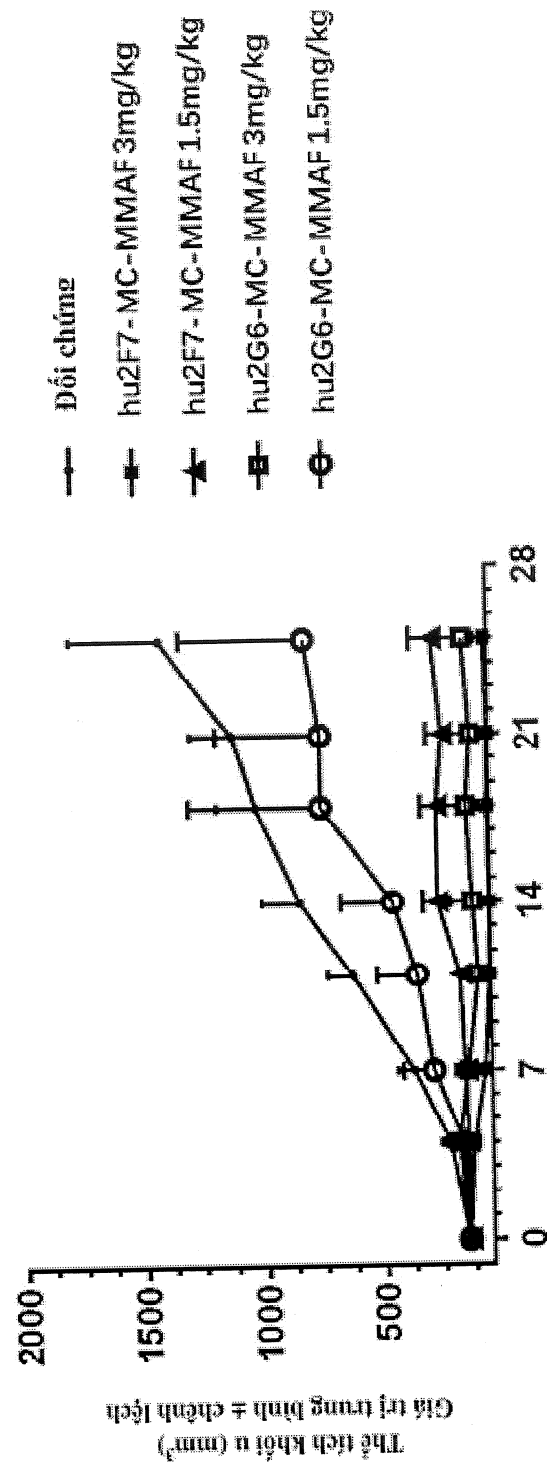


Fig.1

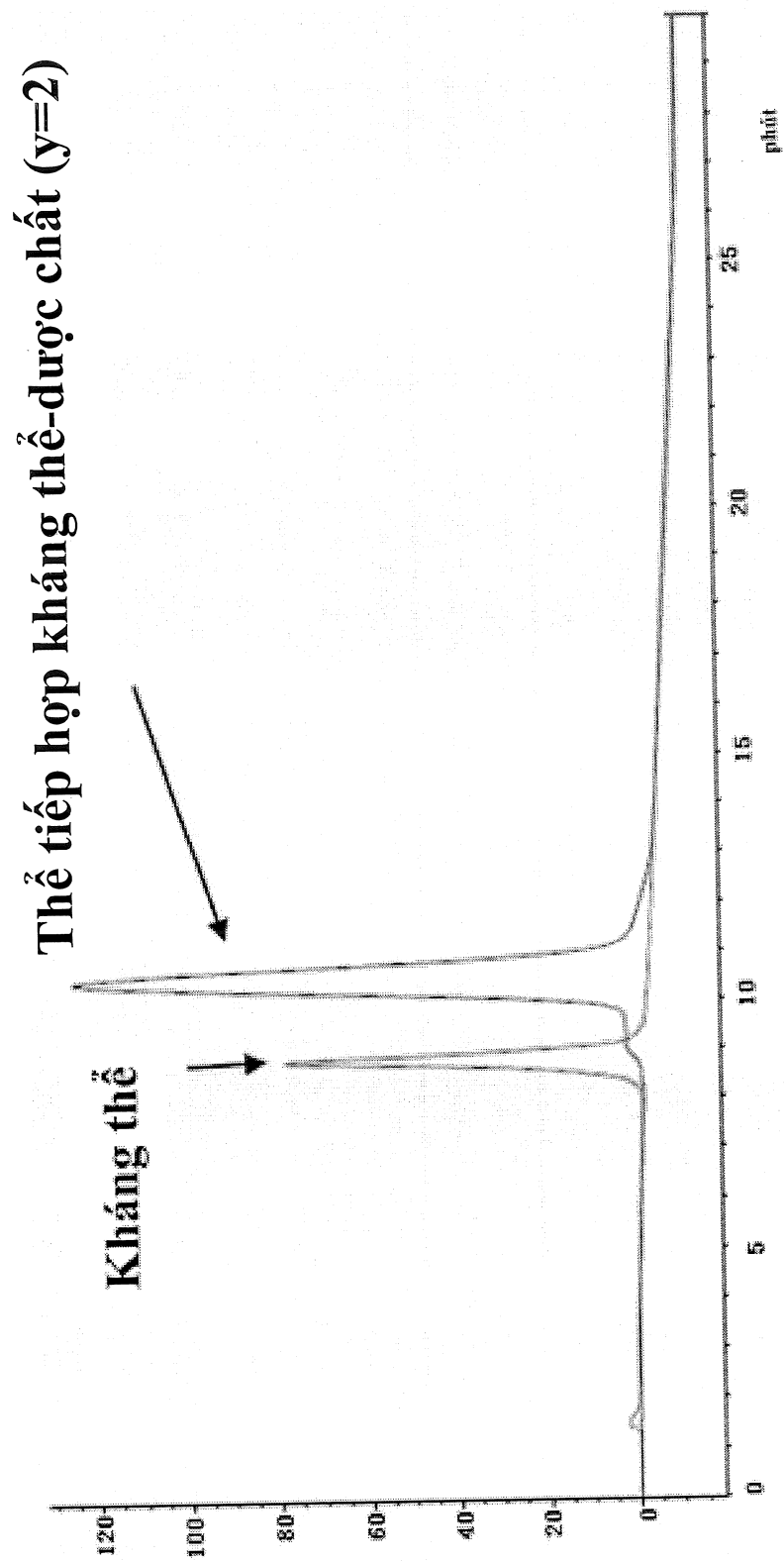


Fig.2

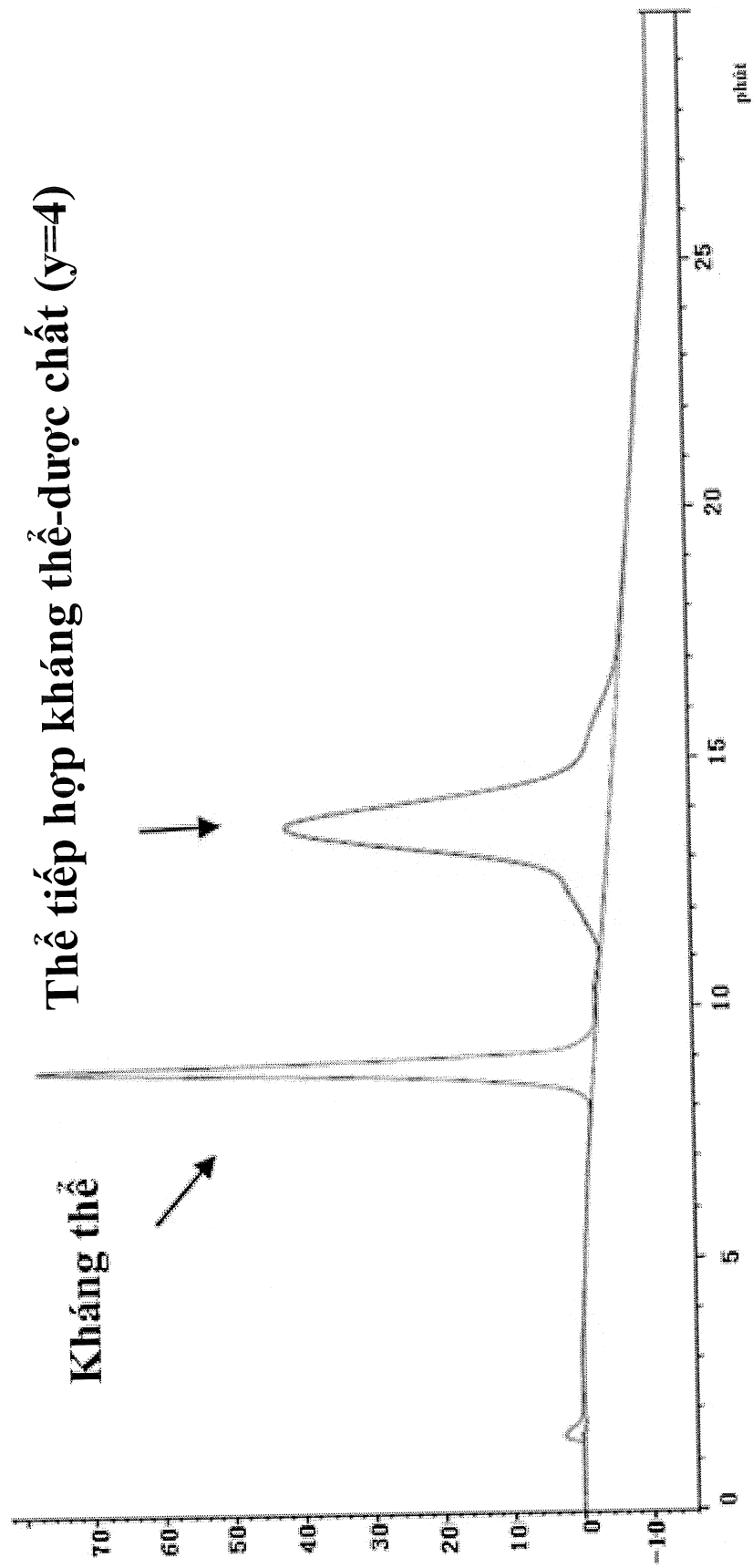


Fig.2 (tiếp)

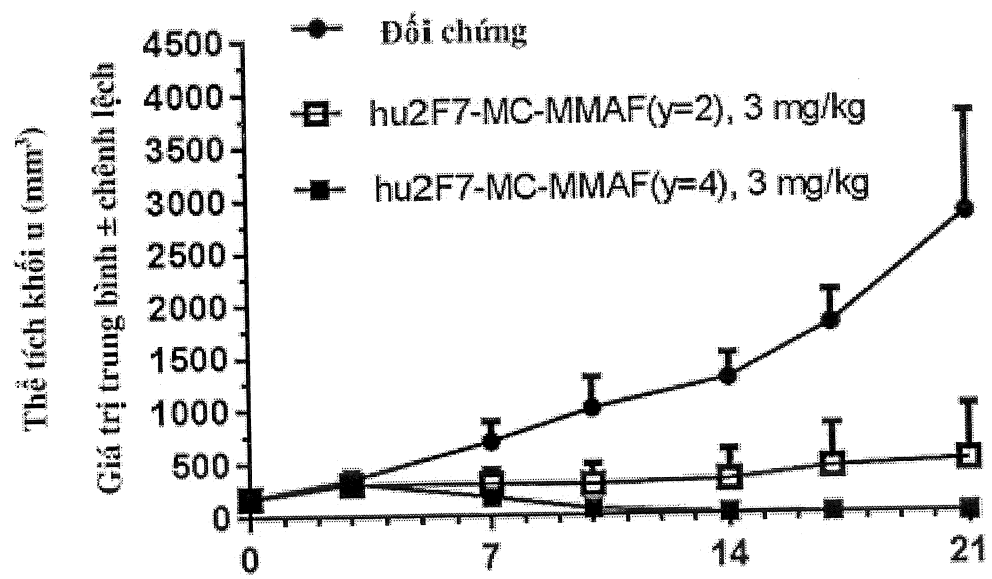


Fig.3

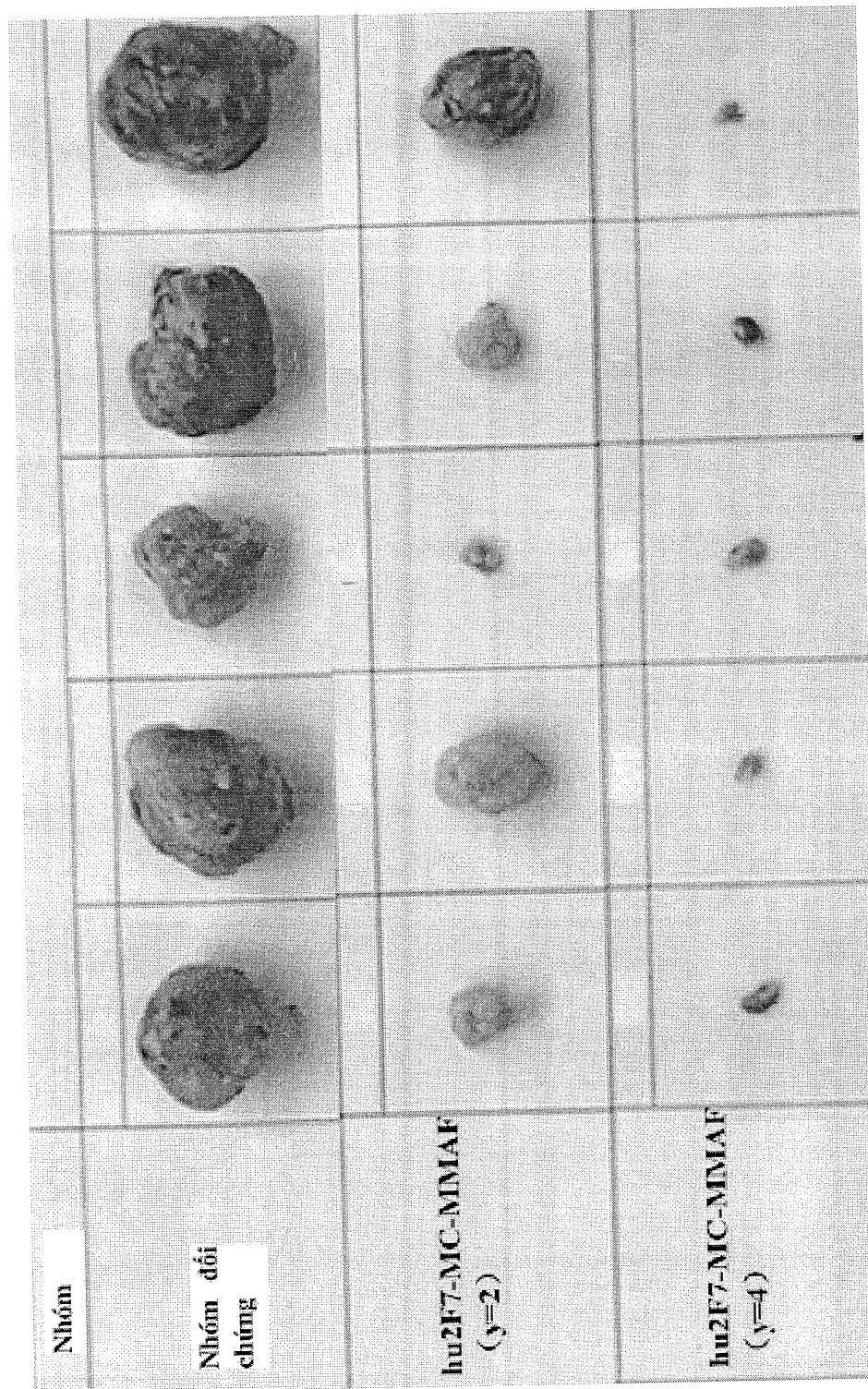


Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SHANGHAI HANSOH BIOMEDICAL CO., LTD.

JIANGSU HANSOH PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.

<120>THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ-DUỐC CHẤT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ THỂ TIẾP HỢP NÀY VÀ DUỐC PHẨM CHỨA NÓ

<130> 702041CPCT

<150> 201910498993.2

<151> 2019-06-06

<150> 202010215322.3

<151> 2020-03-24

<160> 55

<170> Danh mục trình tự SIPO 1.0

<210> 1

<211> 276

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> PEPTIT

<223> huB7-H4-His

<400> 1

Met	Ala	Ser	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Ile	Ser	Ile	Ile
1			5				10					15			
Ile	Ile	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly	Ile	Ser
		20					25					30			
Gly	Arg	His	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Ala	Ser	Ala	Gly	Asn	Ile
		35					40					45			
Gly	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Cys	Thr	Phe	Glu	Pro	Asp	Ile	Lys	Leu
	50					55				60					
Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Val
65					70					75				80	
His	Glu	Phe	Lys	Glu	Gly	Lys	Asp	Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Asp	Glu	Met
			85						90					95	
Phe	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Val	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Asn
			100						105					110	

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
 115 120 125
 Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
 130 135 140
 Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
 165 170 175
 Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
 180 185 190
 Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
 195 200 205
 Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
 210 215 220
 Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
 225 230 235 240
 Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
 245 250 255
 Lys Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser His His His His
 260 265 270
 His His His His
 275

<210> 2
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> PEPTIT
 <223> huB7-H4-Fc

<400> 2
 Phe Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro
 20 25 30
 Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val
 35 40 45
 Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu
 50 55 60
 Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val
 65 70 75 80
 Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp

137

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR1

<400> 3
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR2

<400> 4
 Gly Ile Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR3

<400> 5
 Gln Gly Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR1

<400> 6

His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn Ile Gly

1

5

10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR2

<400> 7

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR3

<400> 8

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr Thr

1

5

<210> 9

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR1

<400> 9
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR2

<400> 10
 Tyr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR3

<400> 11
 Glu Ser Tyr Ser Gln Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR1

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR2

<400> 13

Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR3

<400> 14

Gln Asn Gly His Ser Phe Ser Leu Thr

1 5

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221>MIỀN

<223> hu2G6 HCVR

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ser Gln Gly Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> hu2G6 LCVR

<400> 16

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> hu2F7 HCVR

<400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Ser Tyr Ser Gln Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> hu2F7 LCVR

<400> 18
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> hu2G6 HC

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ser Gln Gly Ser Asn Tyr Tyr 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	Lys	Thr				
	210					215					220								
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser				
225					230				235						240				
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg				
			245						250					255					
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro				
		260						265				270							
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala				
	275						280					285							
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val				
	290					295					300								
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr				
305					310				315					320					
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr				
			325					330				335							
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu				
		340					345					350							
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys				
	355						360					365							
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser				
	370					375					380								
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp				
385				390					395					400					
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser				
			405						410				415						
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala				
		420					425					430							
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
	435						440					445							

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<223> hu2G6 LC

<400> 20

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 21

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<223> hu2F7 HC

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

147

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 22
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> hu2F7 LC

<400> 22
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR1

<400> 23
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn
 1 5 10

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR2

<400> 24
 Gly Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR3

<400> 25

Asp Ser Arg Phe Ser Tyr

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR1

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR2

<400> 27

Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> LCDR3

<400> 28

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> HCDR1

<400> 29

Gly Asp Thr Phe Thr Thr Tyr

1

5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> HCDR2

<400> 30

Tyr Leu Asn Ser Gly Ser

1

5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> HCDR3

<400> 31

Asp Ser Arg Phe Ser Tyr

1

5

<210> 32

<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> LCDR1

<400> 32
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> LCDR2

<400> 33
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> MIỀN
<223> LCDR3

<400> 34
Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 35
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> hu2F8 HCVR

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Arg Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala 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 Asp Ser Arg Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> hu2F8 LCVR

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> hu1C9 HCVR

<400> 37
 Glu 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 Asp Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Leu Asn Arg Gly Ser Ser Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala 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 Asp Ser Arg Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 38
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> hu1C9 LCVR

<400> 38
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
                20                25                30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35                40                45
Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                70                75                80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu
                85                90                95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                100                105

```

```

<210> 39
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> hu2F8 HC

```

```

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1             5             10             15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
                20                25                30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
                35                40                45
Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Arg Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50                55                60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala 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 Asp Ser Arg Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
                100                105                110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
                115                120                125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130                135                140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                150                155                160

```

```

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
      165                      170                      175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
      180                      185                      190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
      195                      200                      205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
      210                      215                      220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                      230                      235                      240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
      245                      250                      255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
      260                      265                      270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      275                      280                      285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      290                      295                      300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                      310                      315                      320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325                      330                      335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
      340                      345                      350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
      355                      360                      365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
      370                      375                      380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385                      390                      395                      400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      405                      410                      415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      420                      425                      430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435                      440                      445

```

```

<210> 40
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> hu2F8 LC

```

<400> 40

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala
          20           25           30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Ser Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 41

<211> 445

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<223> hu1C9HC

<400> 41

```

Glu 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	Asp	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr	20	25	30
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45
Gly	Gly	Ile	Tyr	Leu	Asn	Arg	Gly	Ser	Ser	Glu	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	50	55	60
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Asp	Ser	Arg	Phe	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	100	105	110
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	115	120	125
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	130	135	140
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	145	150	155
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	165	170	175
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	180	185	190
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	195	200	205
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	210	215	220
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	260	265	270
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	290	295	300
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	305	310	315
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	325	330	335
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	340	345	350
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	355	360	365
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln			

```

      370              375              380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385              390              395              400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      405              410              415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      420              425              430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435              440              445

```

```

<210> 42
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> CHUỖI
<223> hulC9 LC

```

```

<400> 42
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
      20              25              30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu
      85              90              95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100             105             110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115             120             125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130             135             140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145             150             155             160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165             170             175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180             185             190

```

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR1 được tối ưu hóa

<400> 43
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Met Asn
 1 5 10

<210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR2 được tối ưu hóa

<400> 44
 Gly Ile Tyr Pro Asn Arg Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 45
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> HCDR2 được tối ưu hóa

<400> 45

Tyr Leu Asn Arg Gly Ser

1 5

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> 2G6 HCVR

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Gly Ile Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Gln Gly Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> 2G6 LCVR

<400> 47

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

1 5 10 15

```

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
      20                      25                      30
Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Ala Leu Ile
      35                      40                      45
Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
      65                      70                      75                      80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Tyr
      85                      90                      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                      105

```

```

<210> 48
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> MIỀN
<223> 2F7 HCVR

```

```

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1                      5                      10                      15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
      20                      25                      30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45
Ala Tyr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
      50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Thr Arg Glu Ser Tyr Ser Gln Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
      100                      105                      110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
      115                      120

```

```

<210> 49
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

<220>

<221> MIỀN

<223> 2F7 LCVR

<400> 49

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
          20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45
Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65           70           75           80
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Ser Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100           105

```

<210> 50

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> 2F8 HCVR

<400> 50

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
          20           25           30
Trp Met Asn Trp Ala Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Ile Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
          50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Asp Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

```

Ala Arg Asp Ser Arg Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala
 115

<210> 51
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> 2F8 LCVR

<400> 51
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ile Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 52
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> 1C9 HCVR

<400> 52
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Thr Tyr

	20		25		30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Gly Ile Tyr Leu Asn Ser Gly Ser Ser Glu Tyr Asn Glu Lys Phe					
	50		55		60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
65		70		75	80
Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Asp Ser Arg Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr					
	100		105		110
Val Ser Ala					
	115				

<210> 53
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> MIỀN
 <223> 1C9 LCVR

<400>	53
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly	
1	5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala	
	20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile	
	35 40 45
Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
	50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala	
65	70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu	
	85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Gln Leu Glu Leu Lys	
	100 105

<210> 54
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> MIỀN

<223> IgG1 C

<400> 54

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115				120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195				200						205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr

```

<400>      55
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1              5              10              15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
              20              25              30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
              35              40              45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
              50              55              60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65              70              75              80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
              85              90              95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
              100              105

```