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

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

(11) **1-0047403**

(51)[2020.01] **C07K 16/28**; A61K 31/48; A61P 35/00; A61K 31/4745; A61K 39/395

(13) **B**

(21) 1-2021-02212
(22) 25/09/2019
(86) PCT/CN2019/107852 25/09/2019
(87) WO2020/063673 02/04/2020
(30) 201811156667.5 30/09/2018 CN
(45) 25/06/2025 447
(43) 26/07/2021 400A

(73) 1. Jiangsu Hansoh Pharmaceutical Group Co., Ltd. (CN)
Economic and Technological Development Zone, Lianyungang, Jiangsu 2220, 47, China
2. Shanghai Hansoh Biomedical Co., Ltd. (CN)
Building 2, No.3728 Jinke Road, Zhangjiang Hi-tech Park Shanghai 201203, China
3. Changzhou Hansoh Pharmaceutical Co., Ltd. (CN)
1028 Liaohe Road, Xinbei District Changzhou, Jiangsu, 213001, China

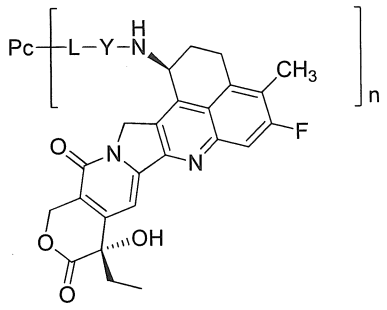
(72) YING, Hua (US); ZHANG, Ling (CN); ZHANG, Ting (CN); ZHANG, Lei (CN); XU, Jianyan (CN); TAO, Weikang (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) THỂ TIẾP HỢP PHỐI TỬ - DƯỢC CHẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY

(21) 1-2021-02212

(57) Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của kháng thể kháng B7H3 và chất tương tự exatecan, phương pháp điều chế thể tiếp hợp này và ứng dụng của thể tiếp hợp này trong việc điều trị khối u.



(Pc-L-Y-Dr)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của kháng thể kháng B7H3 và chất tương tự exatecan, phương pháp tạo ra thể tiếp hợp này, dược phẩm chứa thể tiếp hợp này, và việc dùng thể tiếp hợp này trong việc bào chế thuốc dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn do B7H3 gây ra, cụ thể là việc dùng nó trong việc bào chế thuốc điều trị ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T đóng một vai trò cực kỳ quan trọng trong quá trình trị khối u của một cơ thể. Tuy nhiên, quá trình kích hoạt và tăng sinh của các tế bào T không chỉ đòi hỏi tín hiệu kháng nguyên được TCR ghi nhận, mà còn cần tín hiệu thứ hai do các phân tử đồng kích thích cung cấp. Các phân tử họ B7 thuộc siêu họ globulin miễn dịch phân tử đồng kích thích. Ngày càng có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các phân tử thuộc họ này đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa chức năng miễn dịch bình thường và tình trạng bệnh lý ở sinh vật.

B7H3 là thành viên trong họ B7 và là protein xuyên màng loại I, mà chứa peptit tín hiệu ở đầu tận cùng amin, vùng thay đổi giống globulin miễn dịch ngoại bào (IgV) và vùng ổn định (IgC), vùng xuyên màng, và vùng đuôi bào chất có 45 axit amin (Tissue Antigens. 2007 August; 70(2): 96-104). B7H3 có hai loại biến thể ghép nối, B7H3a và B7H3b. Miền ngoại bào của B7H3a bao gồm hai miền globulin miễn dịch IgV-IgC (còn được gọi là 2IgB7H3), và miền ngoại bào của B7H3b bao gồm bốn miền globulin miễn dịch IgV-IgC-IgV-IgC (còn được gọi là 4IgB7H3).

B7H3 protein không được biểu hiện hoặc được biểu hiện kém trong các mô và tế bào bình thường, nhưng được biểu hiện nhiều trong các mô khối u khác nhau và và có tương quan chặt chẽ với sự tiến triển của khối u, sự sống còn và tiên lượng của bệnh nhân. Đã có báo cáo lâm sàng rằng B7H3 biểu hiện quá mức trong nhiều loại ung thư, cụ thể là ở ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư thận, ung thư biểu mô đường tiết niệu, ung thư kết trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, ung thư buồng trứng và ung thư tuyến tụy (Lung Cancer. 2009 November; 66(2): 245-249; Clin Cancer Res. 2008 Aug. 15; 14(16): 5150-5157). Ngoài ra, trong tài liệu chuyên ngành, cũng đã có báo cáo rằng trong ung thư tuyến tiền liệt, mức độ biểu hiện của B7H3 có tương quan tỷ lệ thuận với bệnh lý ác tính lâm sàng (như thể tích khối u, xâm lấn ngoài tuyến tiền liệt hoặc điểm Gleason), và cũng liên quan đến quá trình tiến triển của ung thư (Cancer Res. 2007 Aug. 15; 67(16):7893-7900). Tương tự, trong u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, sự biểu hiện của B7H3 có tương quan tỷ lệ nghịch với thời gian sống sót không có biến cố và trong ung thư tuyến tụy, sự biểu hiện của

B7H3 liên quan đến di căn hạch bạch huyết và sự tiến triển bệnh lý. Do đó, B7H3 được coi là chất đánh dấu khối u mới và đích điều trị tiềm năng.

Hiện nay, đã có các chiến lược điều trị dành riêng hướng đích B7H3 đối với các nghiên cứu tiền lâm sàng. Ví dụ, các kháng thể hướng đích B7H3 của chuột sẽ tăng cường các tế bào T dương tính với CD8 xâm nhập vào các khối u và ức chế sự phát triển của khối u (Mod Pathol. 2010 August; 23(8): 1104-1112). Hơn thế nữa, công bố đơn quốc tế WO 2008/066691 đã cho thấy rằng các kháng thể nhận biết biến thể B7H3, B7-H3a, đã thể hiện tác dụng trị khối u *in vivo* đối với ung thư biểu mô tuyến. Trong các nghiên cứu lâm sàng, thuốc chứa kháng thể B7H3 ở chuột được tiếp hợp với I^{131} phóng xạ đã ức chế đáng kể sự phát triển của u nguyên bào thần kinh ở bệnh nhân [J Neufooocol 97(3):409-18 (2010)]. Tuy nhiên, các dự án hiện đang được nghiên cứu là các kháng thể được làm giống như của người mà được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền bằng cách làm cho các kháng thể chuột tương thích với người. Các kháng thể được làm giống như của người khi được gây miễn dịch có nguy cơ sinh miễn dịch cao hơn, đây là một yếu tố không thuận lợi trong việc sử dụng cho người.

Công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn được dùng để chỉ việc dung hợp protein hoặc polypeptit ngoại sinh với protein ở vỏ thể thực khuẩn, để biểu hiện protein ngoại sinh trên bề mặt của các hạt thể thực khuẩn. Thư viện kháng thể của thể thực khuẩn là thư viện kháng thể được thiết lập bằng cách kết hợp công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn, công nghệ khuếch đại PCR và và công nghệ biểu hiện protein thông qua phương tiện kỹ thuật toàn diện.

Ưu điểm lớn nhất của thư viện kháng thể của thể thực khuẩn là để tạo ra kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn bằng cách bắt chước ba quá trình sinh kháng thể *in vivo* mà không cần gây miễn dịch cho động vật. Ngoài ra, thư viện kháng thể của thể thực khuẩn còn có các ưu điểm sau: 1) đạt được sự thống nhất về kiểu gen và kiểu hình; Ngoài ra, phương pháp thử nghiệm đơn giản và nhanh chóng; phương pháp sinh kháng thể truyền thống bằng công nghệ tế bào lai mất vài tháng, trong khi công nghệ thư viện kháng thể chỉ mất vài tuần; 2) Sản phẩm được biểu hiện là kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn, và kháng thể này chủ yếu được biểu hiện dưới dạng các đoạn Fab và scFv có hoạt tính. Với trọng lượng phân tử nhỏ, kháng thể được biểu hiện này có ưu điểm rõ ràng về khả năng thâm nhập mô so với kháng thể nguyên vẹn; 3) Khả năng sàng lọc lớn; công nghệ tế bào lai được sử dụng sàng lọc trong số hàng nghìn dòng vô tính, trong khi công nghệ thư viện kháng thể có thể được sử dụng để chọn từ hàng triệu hoặc thậm chí hàng trăm triệu phân tử; do đó, sẽ thu được các kháng thể đa dạng hơn; 4) ứng dụng rộng rãi; hệ biểu hiện sinh vật chưa có nhân điển hình được sử dụng, điều này dẫn đến ưu điểm rõ ràng hơn trong sản xuất quy mô lớn (Curr Opin Biotechnol. 2002 December; 13(6):598-602; Immunotechnology, 2013, 48(13) 48(13): 63-73).

Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC) cho phép kết hợp kháng thể đơn dòng hoặc đoạn kháng thể với độc tố tế bào có hoạt tính sinh học thông qua mối gắn kết ổn

định hoá học, tận dụng tối đa tính đặc hiệu của kháng thể gắn kết với kháng nguyên bề mặt của các tế bào bình thường hoặc tế bào khối u và hiệu quả cao của độc tố tế bào, đồng thời tránh được hiệu quả thấp của kháng thể và tác dụng phụ độc hại của độc tố tế bào. Điều đó có nghĩa là, so với các loại thuốc hóa trị thông thường, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có thể gắn kết một cách chính xác với tế bào khối u và giảm tác động đến các tế bào bình thường.

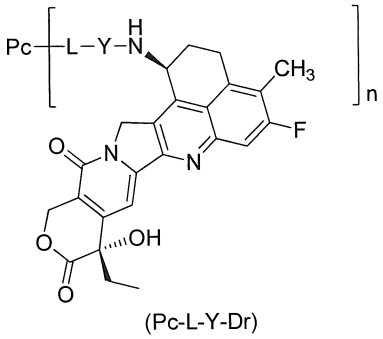
Hiện nay, nhiều loại thuốc ADC đã và đang được sử dụng trong nghiên cứu lâm sàng hoặc điều trị bệnh. Ví dụ, Kadcyla là một loại thuốc ADC được tạo ra bởi kháng thể trastuzumab để hướng đích Her2 và DM1. Đồng thời, cũng có các công bố đơn yêu cầu cấp patent đề cập đến các kháng thể và thuốc ADC hướng đích B7H3, như WO2008100934, WO2012147713, WO2014061277, WO2015184203 và WO2016044383.

Có một số loại phân tử gây độc tế bào được sử dụng trong thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, một trong số đó là dẫn xuất camptothexin, có tác dụng trị khối u bằng cách ức chế topoisomeraza I. Các tài liệu báo cáo việc sử dụng dẫn xuất camptothexin, exatecan (tên hoá học: (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-flo-2,3-đihyđro-9-hyđroxy-4-metyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]imiđazo[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-đion) trong thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC) kể cả WO2014057687, *Clinical Cancer Research* (2016) 22 (20): 5097-5108, và *Cancer Sci* (2016) 107: 1039-1046. Tuy nhiên, vẫn cần phát triển thêm các thuốc ADC có hiệu quả tốt hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến ADC chứa kháng thể kháng B7H3 và việc dùng nó, và đề xuất thuốc ADC được tạo ra bằng cách liên hợp kháng thể đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên với chất tương tự exatecan gây độc tế bào, trong đó kháng thể đơn dòng hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này gắn kết với trình tự axit amin hoặc cấu trúc ba chiều của vùng ngoại bào của B7H3.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó:



(Pc-L-Y-Dr)

trong đó:

Y được chọn từ nhóm bao gồm -O-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-, -O-CR^1R^2-$(CR^aR^b)_m$-, -O-CR^1R^2-, -NH-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)- và -S-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-;

R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, nguyên tử đơteri, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl đã được đơteri hóa, alkoxy, hyđroxy, amino, xyano, nitro, hyđroxyalkyl, xycloalkyl và heteroxyclyl;

hoặc, R^a và R^b cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxyclyl;

R^1 được chọn từ nhóm bao gồm halogen, haloalkyl, alkyl đã được đơteri hóa, xycloalkyl, xycloalkylalkyl, alkoxyalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl;

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, halogen, haloalkyl, alkyl đã được đơteri hóa, xycloalkyl, xycloalkylalkyl, alkoxyalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl;

hoặc, R^1 và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxyclyl;

hoặc, R^a và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxyclyl;

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

n nằm trong khoảng từ 1 đến 10, tuỳ ý được chọn từ khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; n có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

L là đơn vị gắn kết ;

Pc là kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

các chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs: 8, 9 và 10, hoặc các biến thể HCDR có 3, 2 hoặc 1 có khác biệt về axit amin so với HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs: 8, 9 và 10 ; và

các chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs: 11, 12 và 13, hoặc các biến thể LCDR có 3, 2 hoặc 1 có khác biệt về axit amin so với LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOs: 11, 12 và 13.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, vùng FR của chuỗi nhẹ trên vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó thu được từ trình tự chuỗi nhẹ dòng mầm ở người hoặc trình tự đột biến của nó, và/hoặc vùng FR của chuỗi nặng trên vùng thay đổi chuỗi nặng thu được từ trình tự của chuỗi nặng của dòng mầm ở người hoặc trình tự đột biến của nó.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công

thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có vùng thay đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ:

trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nặng có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc có mức độ giống về trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6, trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc có mức độ giống về trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có vùng ổn định kháng thể; vùng ổn định chuỗi nặng này của vùng ổn định kháng thể thu được từ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người hoặc có mức độ giống về trình tự ít nhất là 95% với chúng, vùng ổn định chuỗi nhẹ này của vùng ổn định kháng thể thu được từ chuỗi κ, λ kháng thể người hoặc có mức độ giống về trình tự ít nhất là 95% với chúng; và tốt hơn là, trình tự axit amin của vùng ổn định chuỗi nặng thu được từ IgG1 người hoặc có mức độ giống về trình tự ít nhất là 95% với nó.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, Pc là kháng thể có chiều dài đầy đủ; trong đó kháng thể có chiều dài đầy đủ này được chọn từ nhóm có các công thức sau:

kháng thể h1702 có trình tự chuỗi nặng có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14 và trình tự chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15, và

kháng thể h1702DS có trình tự chuỗi nặng có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14 và trình tự chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, đoạn gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')2, các kháng thể chuỗi đơn (scFv), các vùng V đã được đime hóa (kháng thể kép), các vùng V đã được làm ổn định bằng đisulfua (dsFv), và các đoạn gắn kết kháng nguyên của các peptit chứa các CDR.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, R^1 là haloalkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, R^2 là nguyên tử hyđro.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, R^1 là C_{3-6} xycloalkyl; và R^2 là nguyên tử hyđro.

Theo một số phương án của sáng chế, thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó,

trong đó:

Y là -O-(CR^aR^b)$_m$-CR^1R^2-C(O)-;

R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, nguyên tử đơteri, halogen và alkyl;

R^1 là haloalkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, haloalkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

hoặc, R^1 và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo ra C_{3-6} xycloalkyl;

m bằng 0 hoặc 1.

Theo một số phương án của sáng chế, thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó,

trong đó:

Y là -O-(CR^aR^b)$_m$-CR^1R^2-C(O)-;

R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, nguyên tử đơteri, halogen và alkyl;

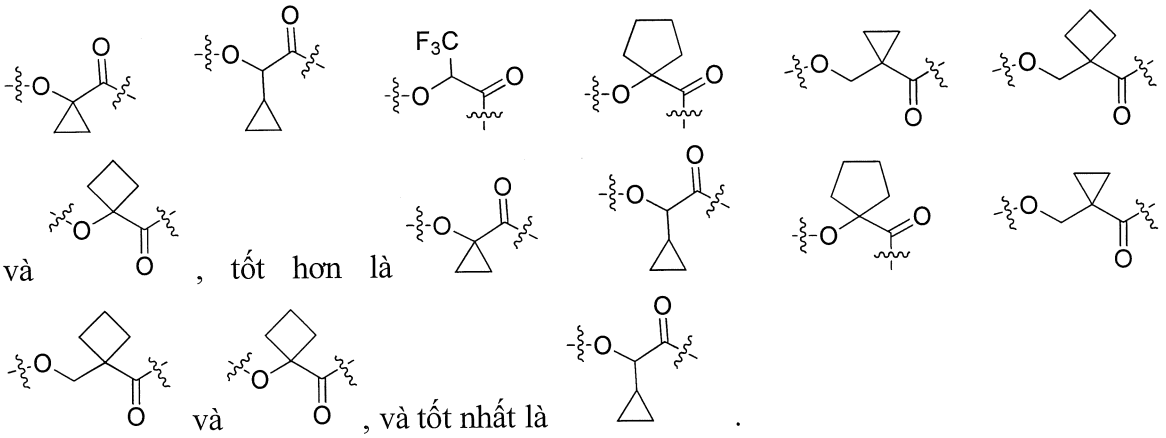
R^1 là C_{3-6} xycloalkyl;

R^2 là nguyên tử hyđro;

hoặc, R^1 và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo ra C_{3-6} xycloalkyl;

m bằng 0.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, Y được chọn từ nhóm có các công thức sau:



và , tốt hơn là

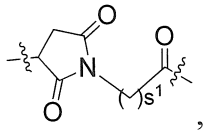
và , và tốt nhất là .

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, đầu tận cùng O của Y được nối với đơn vị gắn kết L.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, n nằm trong khoảng từ 2 đến 8, tốt hơn là 5 đến 9, và tốt nhất là 7,5; và các ví dụ không làm giới hạn phạm vi theo sáng chế bao gồm 3, 4, 5, 6, 7,2, 7,5, 8, 8,5, 9.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công

thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, đơn vị gắn kết -L- là $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

L^1 là  , và s^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

L^2 là gắn kết hoá học;

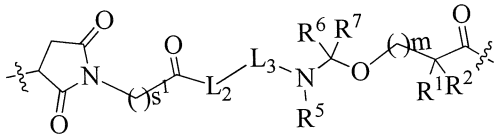
L^3 là gốc tetrapeptit;

L^4 là $-NR^5(CR^6R^7)t-$, R^5, R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro và alkyl, và t is 1 hoặc 2.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, đầu tận cùng L^1 của đơn vị gắn kết -L- được nối với phối tử, và đầu tận cùng L^4 của đơn vị gắn kết -L- được nối với Y.

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, gốc tetrapeptit của L^3 là gốc axit amin được cấu thành bởi hai hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin (E), glyxin (G), valin (V), lysin (K), xitrulin, serin (S), axit glutamic (E) và axit aspartic (N), và tốt hơn là gốc tetrapeptit của GGFG (glyxin-glyxin-phenylalanin-glyxin).

Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, -L-Y- có công thức cấu trúc như sau:



L^2 là gắn kết hoá học;

L^3 là gốc tetrapeptit của GGFG;

R^1 là haloalkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, haloalkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

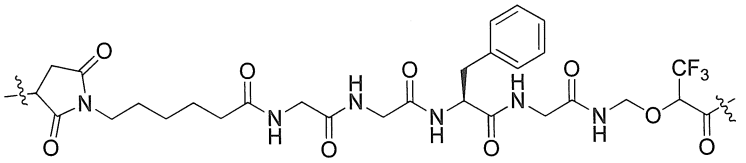
hoặc, R^1 và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo ra C_{3-6} xycloalkyl;

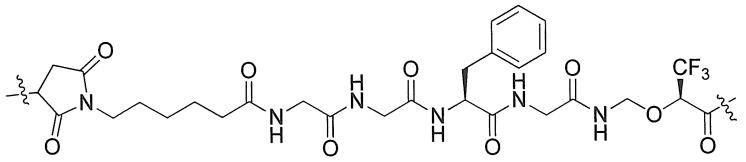
R^5, R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro và alkyl;

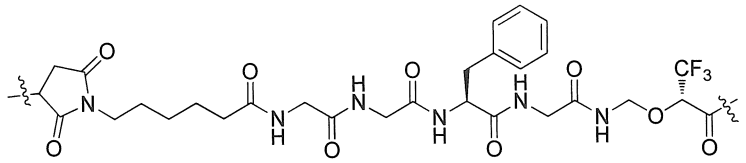
s^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

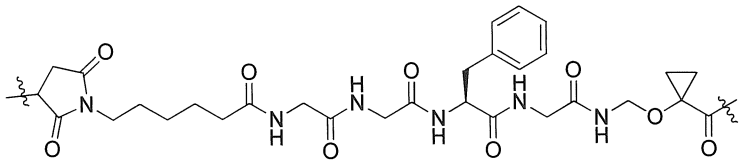
m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4.

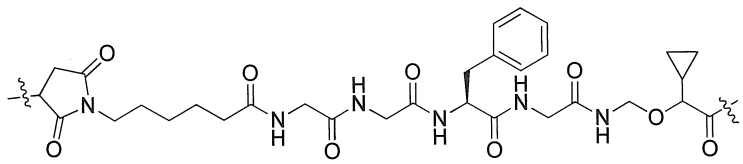
Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, -L-Y- được chọn từ nhóm có các công thức:

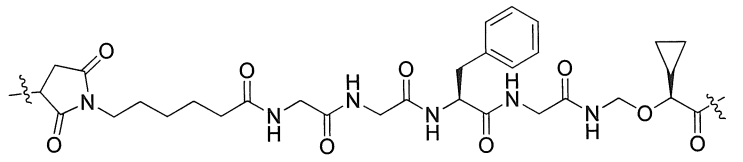


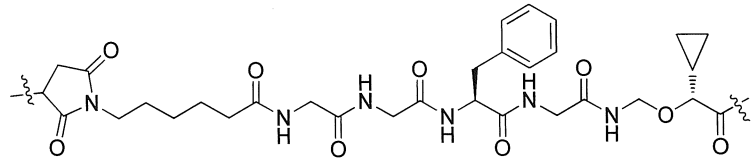


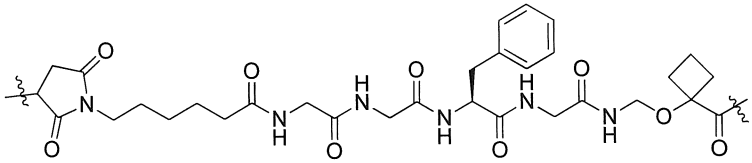


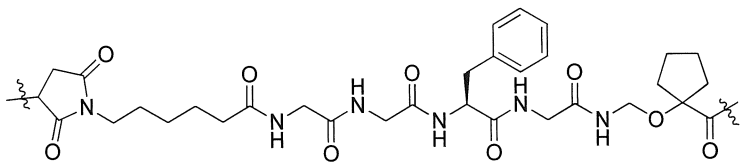


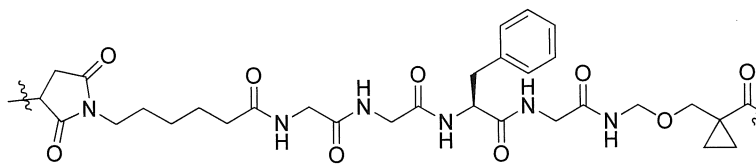




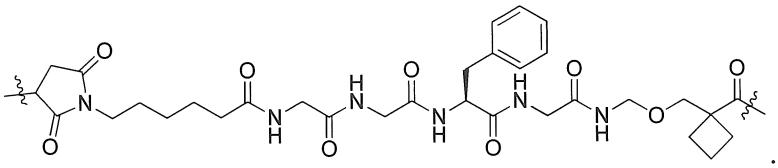




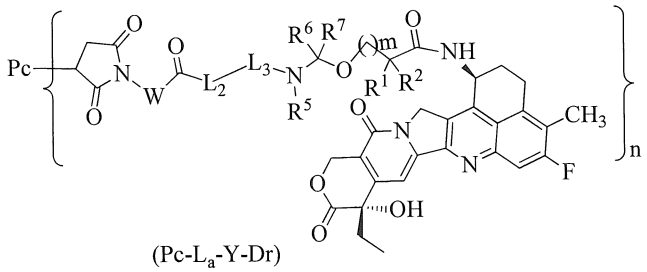




và



Theo một số phương án của sáng chế, thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó là thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L_a-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat:



(Pc-L_a-Y-Dr)

trong đó:

W được chọn từ nhóm bao gồm C_{1-8} alkyl, C_{1-8} alkyl-xycloalkyl và heteroalkyl mạch thẳng có 1 đến 8 nguyên tử, heteroalkyl có 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó mỗi gốc C_{1-8} alkyl, xycloalkyl và heteroalkyl mạch thẳng độc lập tuỳ ý còn được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hyđroxy, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl đã được đoteri hóa, alkoxy và xycloalkyl;

L^2 được chọn từ nhóm bao gồm $-NR^4(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$, $-NR^4(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$, $-S(CH_2)_{p1}C(O)-$ và gắn kết hoá học, p^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20, và tốt hơn là 1 đến 6;

L^3 là gốc peptit được cấu thành bởi 2 đến 7 axit amin, axit amin này có thể được thế hoặc không được thế, khi được thế, nhóm thế có thể được thế ở điểm kết nối sẵn có bất kỳ, nhóm thế này là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hyđroxy, xyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl đã được đoteri hóa, alkoxy và xycloalkyl;

R^1 được chọn từ nhóm bao gồm halogen, haloalkyl, alkyl đã được đoteri hóa, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl;

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, halogen, haloalkyl, alkyl đã được đoteri hóa, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl và heteroaryl;

hoặc, R^1 và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxyclyl;

R^4 và R^5 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, alkyl, haloalkyl, alkyl đã được đoteri hóa và hyđroxyalkyl;

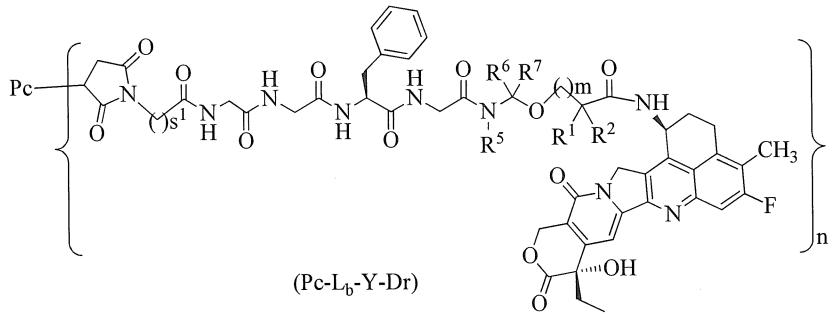
R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl đã được đoteri hóa và hyđroxyalkyl;

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

n nằm trong khoảng từ 1 đến 10, mà có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

Pc là kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án của sáng chế, thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó là thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L_b-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat:



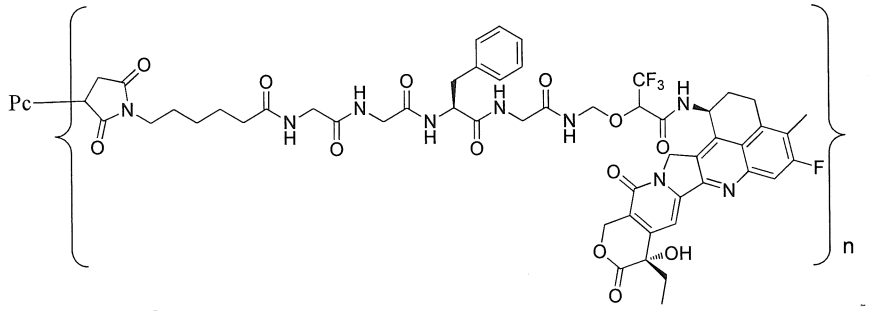
(Pc-L_b-Y-Dr)

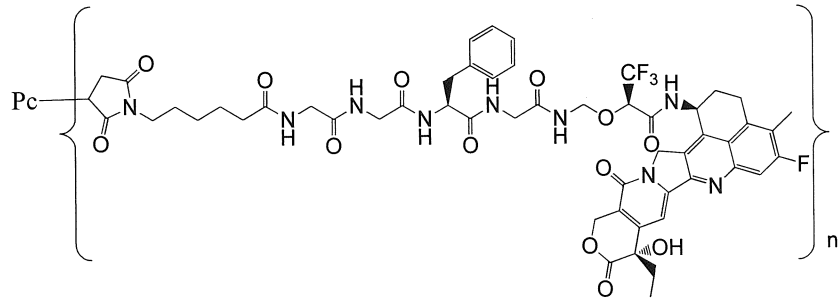
trong đó:

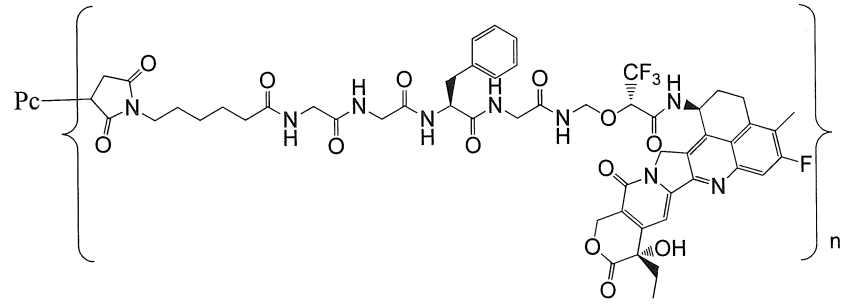
s^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8, và tốt hơn là 5;

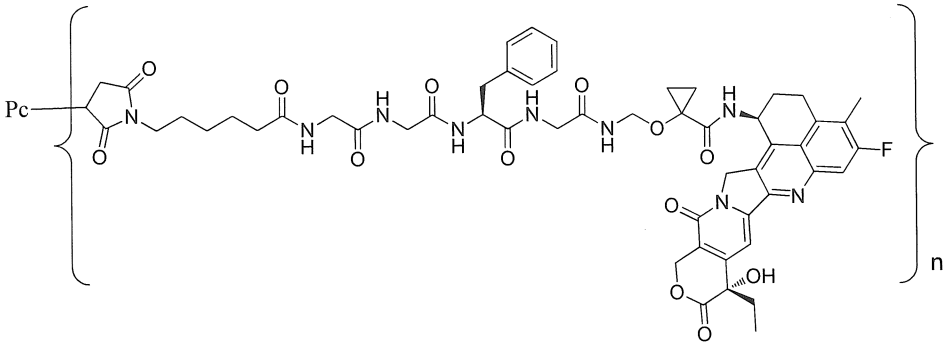
R^1, R^2, R^5~R^7, m và n là như được xác định trong công thức (Pc-L_a-Y-Dr).

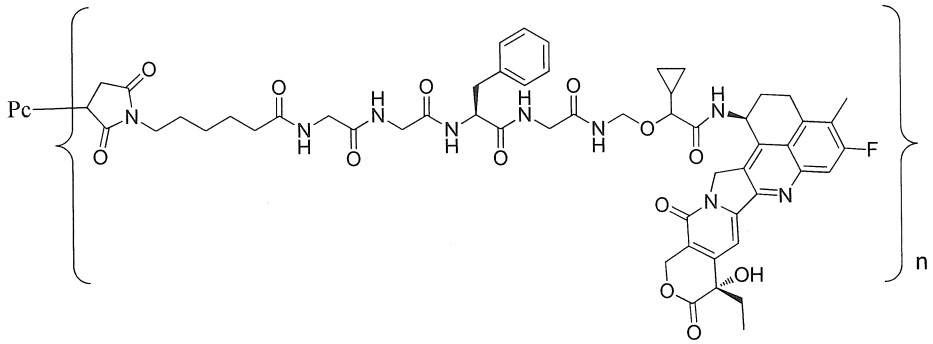
Theo một số phương án của sáng chế, trong thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, thể tiếp hợp phối tử-dược chất được chọn từ nhóm có các công thức sau:

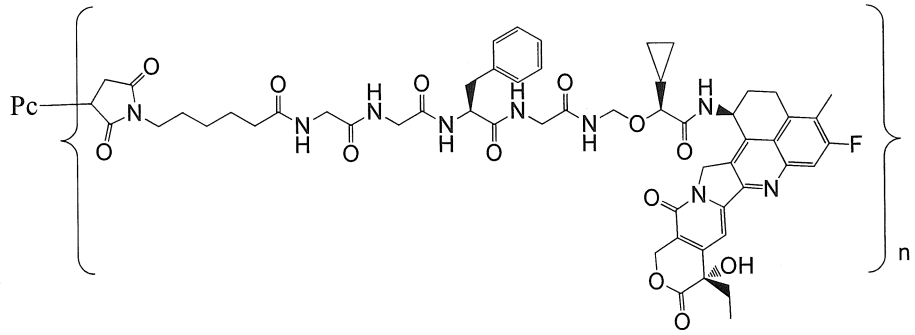


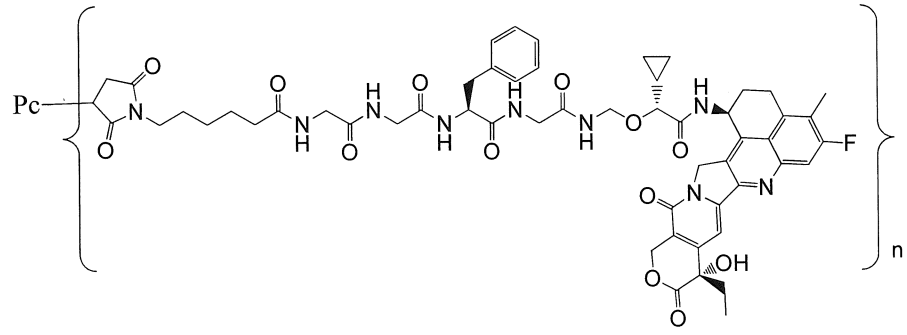


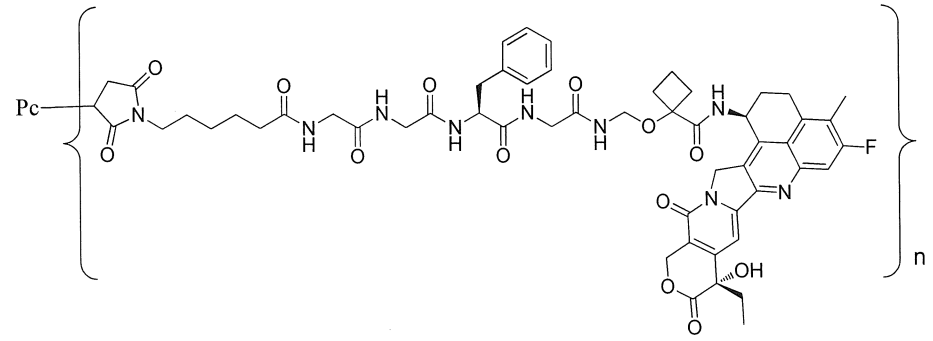


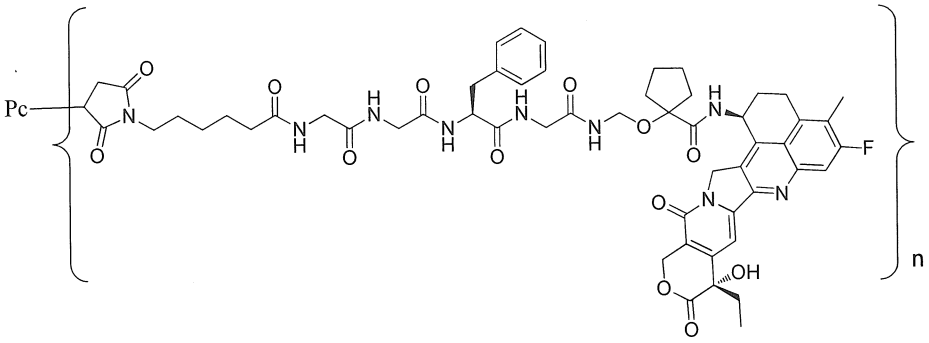

Pc
n

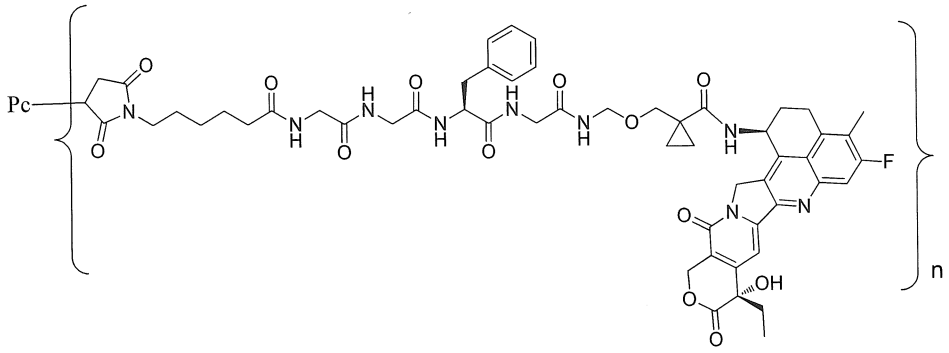

Pc
n


Pc
n

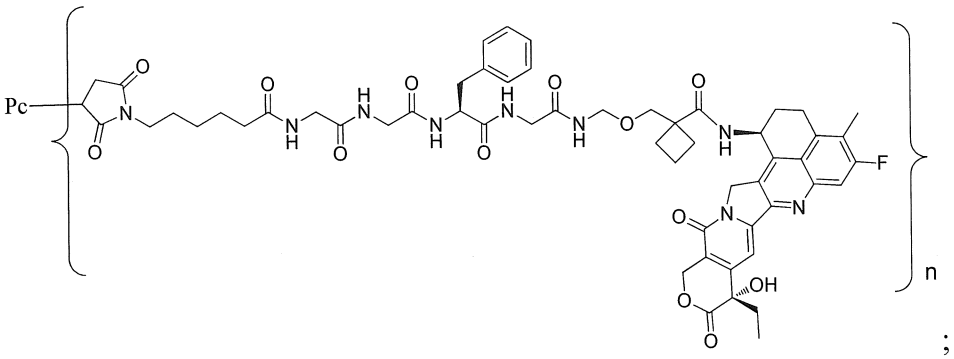

Pc
n


Pc
n





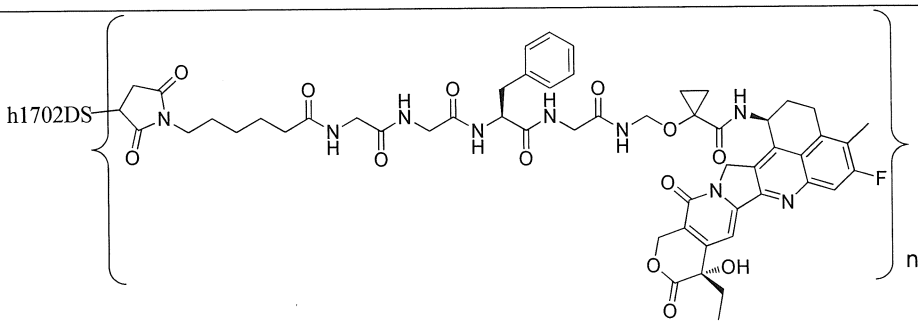
và

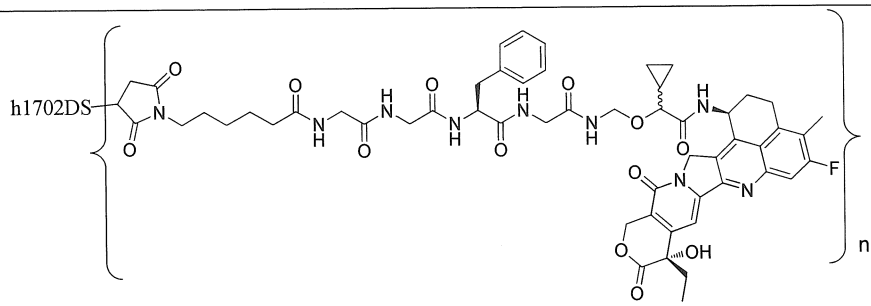
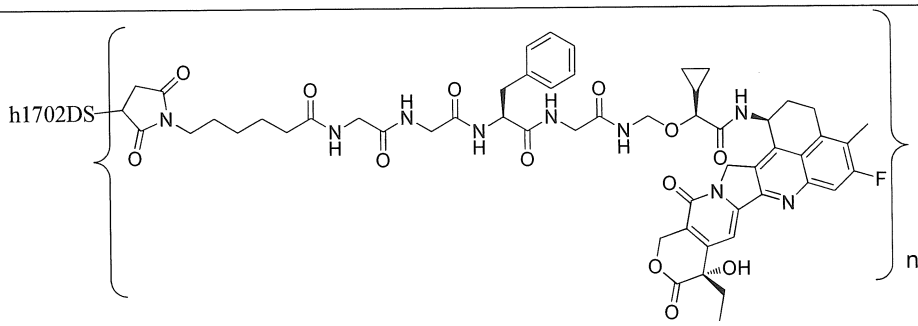
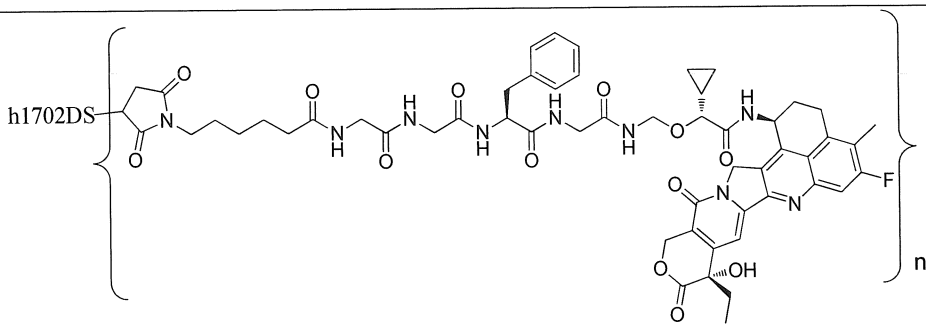
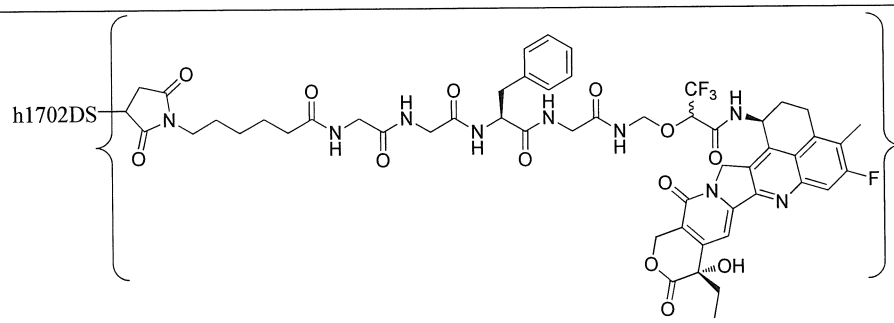
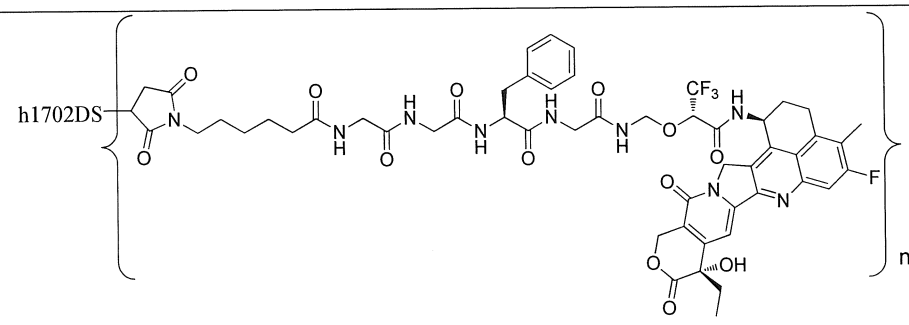


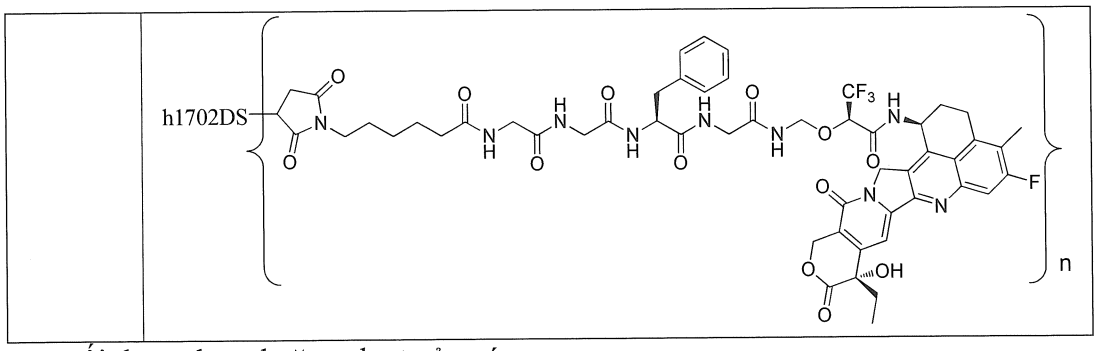
;

trong đó Pc và n là như được xác định trong công thức (Pc-L-Y-Dr).

Thể tiếp hợp phối tử-dược chất thông thường có công thức (Pc-L-Y-Dr) theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các thể tiếp hợp phối tử-dược chất sau:

Ví dụ số	Công thức cấu trúc của ADC
ADC-1	

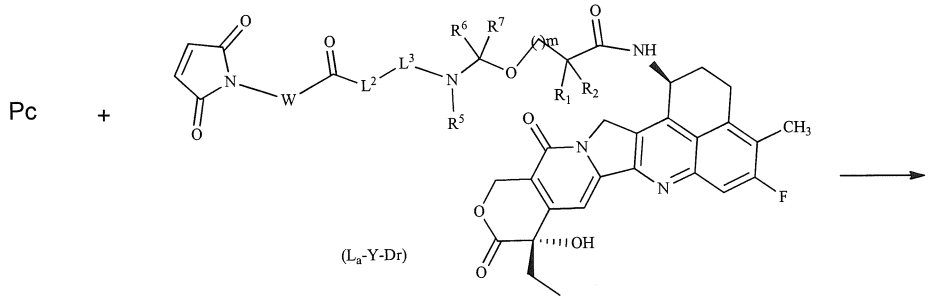
	
	
ADC-2	
ADC-3	
	

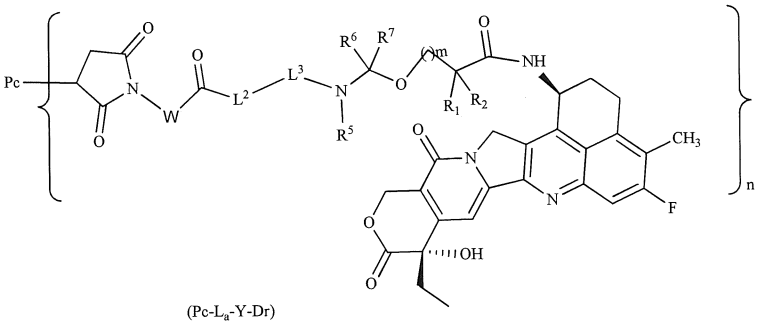


hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó;

trong đó, n có thể là số nguyên khác không hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 0 đến 10, tốt hơn là n là số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 1 đến 10; tốt hơn nữa là n nằm trong khoảng từ 2 đến 8, mà có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và tốt nhất là n nằm trong khoảng từ 3 đến 8, mà có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L_a-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, bao gồm các bước theo sơ đồ sau:





(Pc-L_a-Y-Dr)

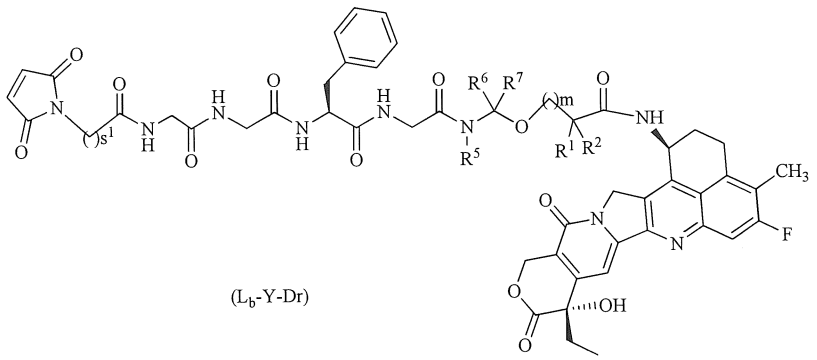
Pc được liên hợp với hợp chất có công thức (L_a-Y-Dr) sau khi khử để thu được hợp chất có công thức (Pc-L_a-Y-Dr); chất khử tốt hơn là TCEP;

trong đó:

Pc là kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó;

W, L^2, L^3, R^1, R^2, R^5~R^7, m và n là như được xác định trong công thức (Pc-L_a-Y-Dr).

Theo một phương án khác của phương pháp theo sáng chế, trong đó hợp chất có công thức L_a-Y-Dr là hợp chất có công thức L_b-Y-Dr:

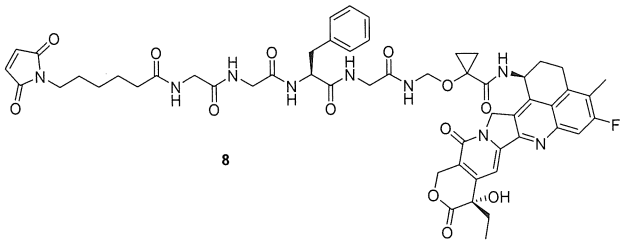


(L_b-Y-Dr)

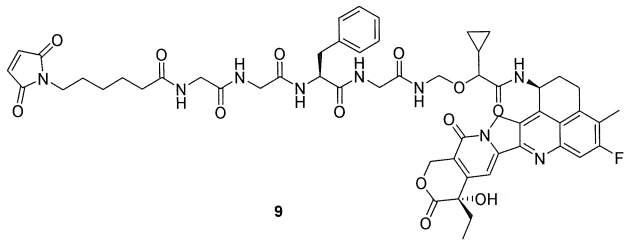
hoặc chất hỗ biến, mesome, chất triệt quang, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, hoặc muối dược dụng của nó,

trong đó R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 và m là như được xác định trong công thức Pc-L_b-Y-Dr.

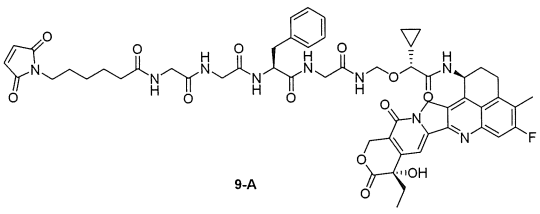
Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, trong phương pháp tạo ra thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (Pc-L_a-Y-Dr) hoặc (Pc-L_b-Y-Dr) hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, hợp chất có công thức (L_a-Y-Dr) hoặc hợp chất có công thức (L_b-Y-Dr) được chọn từ nhóm có các công thức sau:



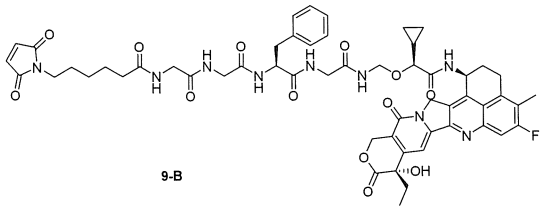
8 ,



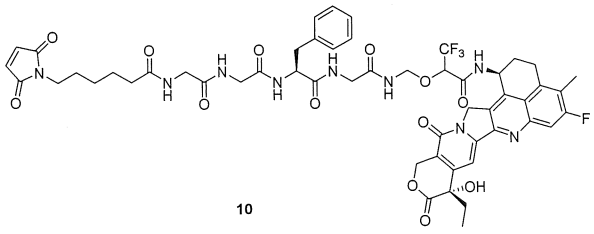
9 ,



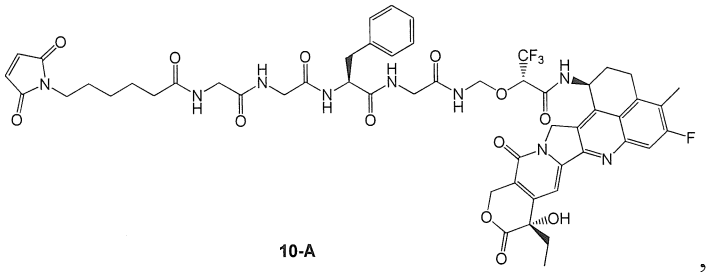
9-A



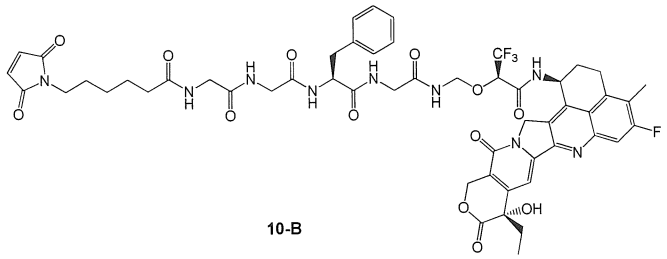
9-B



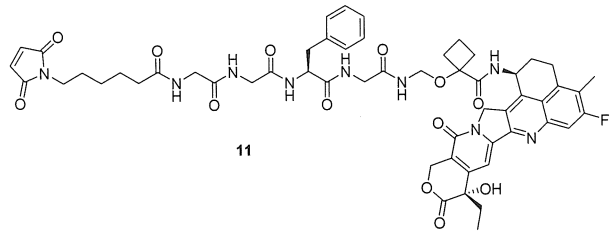
10 ,



10-A ,



10-B và



11 .

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó như được xác định trong bản mô tả này, và một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, hoặc dược phẩm chứa nó như được xác định trong bản mô tả để bào chế thuốc dùng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn do B7H3 gây ra; bệnh hoặc rối loạn do B7H3 gây ra là ung thư với biểu hiện B7H3 ở mức cao.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, hoặc dược phẩm chứa nó như được xác định trong bản mô tả để bào chế thuốc dùng để điều trị hoặc phòng ngừa khối u, trong đó tốt hơn là ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư phổi, ung thư tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư niệu đạo, ung thư bàng quang, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư dạ dày, ung thư màng trong tử cung, ung thư tuyến nước bọt, ung thư thực quản, ung thư hắc tố, u nguyên bào thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh, sarcoma, ung thư yết hầu, ung thư phổi, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư kết trực tràng, bệnh bạch cầu, ung thư xương, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư tuyến tụy và u bạch huyết.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa khối u bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, hoặc dược phẩm chứa nó như được xác định trong bản mô tả, trong đó tốt hơn là khối u là ung thư

liên quan đến sự biểu hiện B7H3 ở mức cao.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng mô tả phương pháp dùng để điều trị hoặc phòng ngừa ung thư bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, hoặc dược phẩm chứa nó như được xác định trong bản mô tả, trong đó tốt hơn là ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư phổi, ung thư tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư niệu đạo, ung thư bàng quang, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư dạ dày, ung thư màng trong tử cung, ung thư tuyến nước bọt, ung thư thực quản, ung thư hắc tố, u nguyên bào thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh, sarcoma, ung thư yết hầu, ung thư phổi, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư kết trực tràng, bệnh bạch cầu, ung thư xương, ung thư da, ung thư tuyến giáp, ung thư tuyến tụy và u bạch huyết.

Hoạt chất này có thể được bào chế thành dạng thích hợp để sử dụng qua đường thích hợp bất kỳ, và tốt hơn nếu hoạt chất này ở dạngliều đơn vị, hoặc mà bệnh nhân có thể tự sử dụng với một liều duy nhất. Dạng liều đơn vị của hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể là viên nén, viên nang, viên nén, ống thuốc tiêm, bột, cốm, viên ngậm, thuốc đạn, bột tái sinh hoặc chế phẩm dạng lỏng.

Liều lượng của hợp chất hoặc chế phẩm được dùng trong phương pháp điều trị theo sáng chế nói chung sẽ thay đổi tùy theo mức độ nghiêm trọng của bệnh, cân nặng của bệnh nhân và hiệu quả tương đối của hợp chất này. Tuy nhiên, theo hướng dẫn chung, liều đơn vị thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1000 mg.

Ngoài hoạt chất, dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất bổ trợ bao gồm chất độn (chất pha loãng), chất kết dính, chất thấm ướt, chất gây rã, tá dược và các chất tương tự. Tuỳ thuộc vào phương pháp sử dụng, chế phẩm này có thể chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 99% khối lượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Tác dụng nhập bào của kháng thể B7H3 đến các tế bào U87MG.

Fig.2A-2F: Các kết quả về tác dụng ức chế của ADC này đến quá trình tăng sinh của tế bào khối u khác nhau. Fig.2A là các kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế của các ADC khác nhau đến quá trình tăng sinh của các tế bào A498; Fig.2B là các kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế của các ADC khác nhau đến quá trình tăng sinh của các tế bào Calu-6; Fig.2C là các kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế của các ADC khác nhau đến quá trình tăng sinh của các tế bào U87; Fig. 2D là các kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế của các ADC khác nhau đến quá trình tăng sinh của các tế bào A375; Fig.2E là các kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế của các ADC khác nhau đến quá trình tăng sinh của các tế bào Detroit562; và Fig.2F là các kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế của các ADC khác nhau đến quá trình tăng sinh của các tế bào CHOK1.

Fig. 3: Tác dụng ức chế của ADC-8 (1 mpk, 3 mpk) và ADC-5 (1 mpk, 3 mpk) của

dược phẩm theo sáng chế đến khối u dị ghép U87MG ở chuột trụi lông khi tiêm trong màng bụng (IP) trong Ví dụ thử nghiệm 7.

Fig. 4: Tác dụng ức chế của ADC-2 (1 mpk, 3 mpk) và ADC-1 (1 mpk, 3 mpk) của dược phẩm theo sáng chế đến khối u dị ghép Detroit 562 ở chuột trụi lông khi tiêm trong màng bụng (IP) trong Ví dụ thử nghiệm 8.

Fig. 5A: Mức độ ức chế sự tăng sinh của ADC-4, ADC-6 và ADC-7 theo sáng chế đến các tế bào Detroit562 trong Ví dụ thử nghiệm 9.

Fig. 5B: Mức độ ức chế sự tăng sinh của ADC-4, ADC-6 và ADC-7 theo sáng chế đến các tế bào Calu-6 trong Ví dụ thử nghiệm 9.

Hình 5C: Mức độ ức chế sự tăng sinh của ADC-4, ADC-6 và ADC-7 theo sáng chế đến các tế bào CHOK1 trong Ví dụ thử nghiệm 9.

Fig. 6: Độ ổn định của huyết tương các kết quả thử nghiệm của ADC-4 theo sáng chế trong Ví dụ thử nghiệm 10.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Các thuật ngữ

Trừ khi có quy định cụ thể, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được dùng trong bản mô tả này là phù hợp với cách hiểu thông thường của chuyên gia có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này về các thuật ngữ mà sáng chế đề cập đến. Mặc dù phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong việc thực hiện hoặc thử nghiệm theo sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả trong bản mô tả này. Khi mô tả và yêu cầu bảo hộ sáng chế, các thuật ngữ dưới đây được sử dụng thích hợp với các định nghĩa sau.

Khi tên thương mại được sử dụng trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế được dự định để bao gồm các chế phẩm, thuốc gốc và các hoạt chất của sản phẩm này dưới tên thương mại.

Trừ khi có quy định cụ thể khác, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ có các nghĩa được mô tả dưới đây.

Thuật ngữ "thuốc" được dùng để chỉ thuốc gây độc tế bào, được ký hiệu bằng Dr, là phân tử hóa học có thể làm gián đoạn mạnh mẽ sự phát triển bình thường của tế bào u. Về nguyên tắc, tất cả thuốc gây độc tế bào có thể tiêu diệt tế bào u ở nồng độ đủ cao. Tuy nhiên, thuốc có thể gây ra quá trình chết tự nhiên của tế bào bình thường và các tác dụng phụ nghiêm trọng, đồng thời tiêu diệt tế bào u do không có tính đặc hiệu. Thuật ngữ này bao gồm các độc tố, như chất độc phân tử nhỏ hoặc chất độc có hoạt tính enzym thu được từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, đồng vị phóng xạ (Ví dụ, đồng vị phóng xạ của At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}và Lu), thuốc độc, thuốc hóa trị liệu, thuốc kháng sinh và enzym phân giải nhân, và tốt hơn là thuốc độc.

Thuật ngữ "đơn vị gắn kết (hoặc đoạn gắn kết)" được dùng để chỉ đoạn cấu trúc

hoặc gắn kết hoá học, mà được gắn kết với phối tử ở một đầu và được gắn kết với thuốc ở đầu khác, hoặc được gắn kết với thuốc qua phần tử gắn kết khác. Theo sáng chế, các phương án được ưu tiên có các đầu L và từ L^1 đến L^4, trong đó đầu L^1 được gắn kết với phối tử, và đầu L^4 được gắn kết với thuốc (Dr) này thông qua đơn vị cấu trúc Y.

Mối gắn kết, bao gồm đơn vị kéo dài, đơn vị đệm, và đơn vị axit amin, có thể được tổng hợp bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các phương pháp được mô tả trong US 2005-0238649A1. Gắn kết này có thể "gắn kết có thể cắt được" tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng thuốc trong tế bào. Ví dụ, gắn kết axit không bền (ví dụ, hydrazon), gắn kết nhạy với proteaza (Ví dụ, nhạy với peptiđaza), gắn kết không bền với ánh sáng, gắn kết đimetyl hoặc gắn kết chứa đisulfua (Chari et al, Cancer Research 52: 127-131 (1992); U.S. Pat. No. 5, 208,020) có thể được sử dụng.

Thuật ngữ "thể tiếp hợp phối tử-dược chất" có nghĩa là phối tử được gắn kết với thuốc có hoạt tính sinh học thông qua một đơn vị gắn kết ổn định. Trong bản mô tả này, tốt hơn là "thể tiếp hợp phối tử-dược chất" là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC), có nghĩa là có nghĩa là kháng thể đơn dòng hoặc đoạn kháng thể được gắn kết với thuốc độc có hoạt tính sinh học thông qua đơn vị gắn kết ổn định.

Mã ba chữ cái và mã một chữ cái đối với axit amin được sử dụng trong sáng chế như như mô tả trong J. biol. chem, 243, p3558 (1968).

Thuật ngữ "kháng thể" được dùng để chỉ globulin miễn dịch, cấu trúc chuỗi bốn-peptit được nối với nhau bằng gắn kết đisulfua liên chuỗi giữa hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau. Các vùng ổn định khác nhau trên chuỗi nặng globulin miễn dịch có thành phần và trình tự axit amin khác nhau, do đó thể hiện tính kháng nguyên khác nhau. Do vậy, globulin miễn dịch có thể được chia thành năm loại, hay được gọi là các isotyp globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, với chuỗi nặng lần lượt là μ, δ, γ, α và ε. Theo thành phần axit amin của vùng bản lề số lượng và vị trí của các gắn kết đisulfua chuỗi nặng, cùng một loại Ig còn có thể được chia thành nhiều loại phụ khác nhau, ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Chuỗi nhẹ có thể được chia thành chuỗi κ hoặc λ dựa trên vùng ổn định khác nhau. Mỗi năm loại Ig có thể có một chuỗi κ hoặc λ.

Khoảng 110 trình tự axit amin nằm kề đầu tận cùng N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể này rất dễ biến đổi, được gọi là vùng thay đổi (vùng Fv); phần còn lại của trình tự axit amin liền kề với đầu tận cùng C là tương đối ổn định, được gọi là vùng ổn định. Các vùng thay đổi này bao gồm ba vùng siêu biến (HVR) và bốn vùng khung tương đối ổn định (FR). Ba vùng siêu biến, xác định tính đặc hiệu của kháng thể này, còn được gọi là vùng xác định bổ thể (CDR). Mỗi vùng thay đổi chuỗi nhẹ (LCVR) hoặc mỗi vùng thay đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, với thứ tự tuần tự từ đầu amino đến đầu carboxyl như sau: 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 lượng và

vị trí của các gốc axit amin CDR trong các vùng LCVR và HCVR của đoạn gắn kết kháng thể hoặc kháng nguyên theo sáng chế phù hợp với đã biết Kabat numbering criteria (LCDR1-3, HCDR2-3), hoặc phù hợp với tiêu chí đánh số Kabat đã biết (LCDR1-3, HCDR2-3), hoặc phù hợp với tiêu chí đánh số Kabat và Chothia (HCDR1).

Thuật ngữ "kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn" còn được gọi là "kháng thể đơn dòng được làm giống như của người hoàn toàn", trong đó vùng thay đổi và vùng ổn định của kháng thể đều thu được từ người, loại trừ khả năng sinh miễn dịch và các tác dụng phụ.Sự phát triển của kháng thể đơn dòng trải qua 4 giai đoạn, đó là: kháng thể đơn dòng chuột, kháng thể đơn dòng thể ghép, kháng thể đơn dòng được làm giống như của người và kháng thể đơn dòng được làm giống như của người hoàn toàn. Các công nghệ liên quan của kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn điều chế chủ yếu bao gồm công nghệ tế bào lai ở người, công nghệ tế bào lympho B được biến nạp EBV, công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn, công nghệ tạo kháng thể chuột chuyển gen, công nghệ tạo kháng thể tế bào B đơn và các công nghệ tương tự. Thuật ngữ "kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn" theo sáng chế thu được bằng công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn. Công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn này bao gồm bước xây dựng thư viện kháng thể người thể thực khuẩn sợi đơn tự nhiên bằng cách phân lập các tế bào B từ PBMC, lá lách, mô hạch bạch huyết của người hoặc sàng lọc các kháng thể này bằng cách tạo miễn dịch chuột chuyển gen biểu hiện chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể người .

Thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên" được dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn của kháng thể vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Đã thấy rằng các đoạn của kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể được sử dụng để đạt được chức năng gắn kết với kháng nguyên. Ví dụ về đoạn gắn kết trong thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên" bao gồm (i) đoạn Fab, đoạn hoá trị một được cấu thành bởi miềnVL, VH, CL và CH1; (ii) đoạn $F(ab')_2$, đoạn hóa trị hai bao gồm hai đoạn Fab được nối với nhau bằng gắn kết đisulphua trong vùng bản lề; (iii) đoạn Fd, bao gồm các miền VH và CH1; (iv) đoạn Fv, bao gồm các miền VH và VL của kháng thể một nhánh; (v) miền đơn hoặc đoạn dAb (Ward *et al.* (1989) Nature 341:544-546) được cấu thành bởi miền VH; và (vi) vùng xác định bổ thể được phân lập (CDR) hoặc (vii) tổ hợp của hai hoặc nhiều CDR được phân lập tuỳ ý được nối bằng mối gắn kết tổng hợp. Ngoài ra, mặc dù miền VL và miền VH của đoạn Fv được mã hoá bởi hai gen riêng biệt, chúng có thể được nối bằng mối gắn kết tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, từ đó tạo ra chuỗi protein đơn, trong đó phân tử hoá trị một được tạo ra bằng cách ghép cặp miền VL và miền VH (được gọi là chuỗi đơn Fv (scFv); xem, *ví dụ* Bird *et al.* (1988) Science: 242:423-426, và Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883).

Kháng thể chuỗi đơn này cũng được dự định bao gồm trong thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên" của kháng thể này. Các đoạn kháng thể như vậy thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ

thuật này, và được sàng lọc đối với các đoạn chức năng bằng cách sử dụng phương pháp giống với phương pháp như đối với kháng thể nguyên vẹn. Vị trí kháng nguyên gắn kết có thể được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phá vỡ globulin miễn dịch nguyên vẹn bằng enzym hoặc bằng phương pháp hoá học. Kháng thể có thể là kháng thể thuộc các isotyp khác nhau, *ví dụ* kháng thể IgG (*ví dụ* IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 phân nhóm), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Fab là đoạn kháng thể thu được bằng cách xử lý phân tử kháng thể IgG bằng papain (nó cắt gốc axit amin này ở vị trí 224 của chuỗi H). Đoạn Fab có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, trong đó khoảng một nửa phía đầu tận cùng N của chuỗi H và toàn bộ chuỗi L được gắn kết với nhau thông qua liên kết đisulfua.

F(ab')2 là đoạn kháng thể thu được bằng cách phân hủy phần phía sau của hai liên kết đisulfua trong vùng bản lề của IgG bằng pepsin, mà có trọng lượng phân tử khoảng 100.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên và bao gồm hai vùng Fab mà được gắn kết ở vị trí bản lề.

Fab' là đoạn kháng thể thu được bằng cách phân cắt liên kết đisulfua ở vùng bản lề của F(ab')2 nêu trên, mà có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên.

Ngoài ra, Fab' có thể được tạo ra bằng cách chèn đoạn ADN mã hóa Fab' của kháng thể vào vectơ biểu hiện sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc vectơ biểu hiện sinh vật có nhân điển hình mà sau đó được đưa vào sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình để biểu hiện Fab'.

Thuật ngữ "chuỗi đơn kháng thể", "chuỗi đơn Fv" hoặc "scFv" được dùng để chỉ phân tử chứa vùng thay đổi chuỗi nặng kháng thể (hoặc vùng; VH) và vùng thay đổi chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc vùng; VL) được nối bằng mối gắn kết. Các phân tử scFv như vậy có thể có cấu trúc chung là NH_2-VL-liên kết-VH-COOH hoặc NH_2-VH-liên kết-VL-COOH. Mối liên kết thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm trình tự axit amin GGGGS lặp lại hoặc biến thể của nó, ví dụ, bằng cách sử dụng biến thể có các trình tự lặp lại 1-4 (Holliger *et al.* (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448). Các phần tử gắn kết khác mà có thể được sử dụng trong bản mô tả này được mô tả bởi Alfthan *et al.* (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi *et al.* (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu *et al.* (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov *et al.* (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 và Roovers *et al.* (2001), Cancer Immunol.

Thuật ngữ "CDR" được dùng để chỉ một trong số sáu vùng siêu biến trong vùng thay đổi của kháng thể mà chủ yếu góp phần vào việc gắn kết kháng nguyên. Một trong số định nghĩa thường được sử dụng nhất cho sáu CDR được đưa ra bởi Kabat E. A. et al. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242*. Như được sử dụng trong bản mô tả này, định nghĩa của Kabat về CDR chỉ áp dụng đối với CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng thay đổi chuỗi nhẹ (CDR L1, CDR L2, CDR L3 hoặc

L1, L2, L3), cũng như CDR2 và CDR3 của vùng thay đổi chuỗi nặng (CDR H2, CDR H3 hoặc H2, H3).

Thuật ngữ "vùng khung kháng thể" được dùng để chỉ phần của vùng thay đổi VL hoặc VH, đóng vai trò như một khung cho vùng lặp gắn kết kháng nguyên (CDR) của vùng thay đổi. Về cơ bản, nó là một vùng thay đổi mà không có CDR.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "quyết định kháng nguyên" được dùng để chỉ vị trí kháng nguyên liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc kháng thể. Thông thường, các epitop bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin liền kề hoặc không liền kề trong một cấu trúc không gian duy nhất. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Các thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu", "gắn kết chọn lọc", và "gắn kết đặc hiệu" được dùng để chỉ gắn kết giữa kháng thể với epitop trên kháng nguyên đã xác định trước. Thông thường, kháng thể này gắn kết với ái lực (KD) nhỏ hơn 10^{-7} M, như nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10}M hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" được dùng để chỉ phân tử ADN và phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi kép, nhưng tốt hơn nếu là ADN sợi kép. axit nucleic được "gắn kết hiệu quả" khi nó được đặt vào mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, nếu trình tự khởi động hoặc chất tăng cường ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự mã hóa, thì trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường được gắn hiệu quả với trình tự mã hóa.

Thuật ngữ "vectơ" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển một axit nucleic khác mà nó đã được gắn kết. Theo một phương án, vectơ này là "plasmit" được dùng để chỉ ADN sợi kép hình tròn, trong đó đoạn ADN bổ sung có thể được nối với nhau. Theo một phương án khác, vectơ này là vectơ virut, trong đó đoạn ADN bổ sung có thể được gắn kết với bộ gen của virut. Các vectơ được bộc lộ trong bản mô tả này có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng đã được đưa vào (ví dụ, vectơ vi khuẩn có nguồn gốc sao chép vi khuẩn và vectơ động vật có vú theo chu kỳ) hoặc có thể được tích hợp vào bộ gen của tế bào chủ, do đó được sao chép cùng với bộ gen của vật chủ (ví dụ: vectơ động vật có vú không phân đoạn).

Các phương pháp sản xuất và tinh sạch kháng thể và đoạn gắn kết kháng nguyên đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này, như Cold Spring Harbor Kháng thể Technical Guide, Chapters 5-8 and 15. Đoạn gắn kết kháng nguyên cũng có thể được chuẩn bị bằng các phương pháp thông thường. Các kháng thể hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được thiết kế di truyền để thêm một hoặc nhiều vùng FR của người trong vùng CDR không phải của người. (Các) trình tự mầm FR của người có thể thu được bằng cách sắp xếp cơ sở dữ liệu gen mầm biến đổi kháng thể IMGT ở người và phần mềm MOE từ trang web ImMunoGeneTics (IMGT) tại http://imgt.cines.fr hoặc từ Journal of Immunoglobulins 20011SBN012441351.

Thuật ngữ "tế bào chủ" được dùng để chỉ tế bào mà vectơ biểu hiện được đưa vào.

Tế bào chủ có thể bao gồm vi khuẩn, vi sinh vật, thực vật hoặc tế bào động vật. Vi khuẩn dễ được biến nạp bao gồm các thành viên của *Enterobacteriaceae*, như chủng *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; *Bacillaceae* như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và *Haemophilus influenzae*. Vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Các dòng tế bào động vật chủ thích hợp bao gồm CHO (dòng tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc) và tế bào NS0.

Kháng thể được được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được điều chế và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, (các) trình tự cDNA mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được nhân bản và tái tổ hợp thành vectơ biểu hiện GS. Vectơ biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định trong các tế bào CHO. Là một công nghệ hiện có được đề xuất nhiều hơn, hệ thống biểu hiện của động vật có vú có thể dẫn đến việc trình glycosyl hóa các kháng thể, đặc biệt là tại vị trí đầu tận cùng N được bảo toàn cao của vùng Fc. Các dòng vô tính dương tính được mở rộng trong môi trường không có huyết thanh trong lò phản ứng sinh học để tạo ra kháng thể. Môi trường nuôi cấy có chứa kháng thể tiết ra có thể được tinh sạch bằng kỹ thuật thông thường. Ví dụ, quá trình tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng cột A hoặc G Sepharose FF có chứa chất đệm đã điều chỉnh. Các thành phần không liên kết cụ thể được loại bỏ bằng cách rửa giải. Kháng thể liên kết được rửa giải bằng phương pháp gradient pH, và các đoạn kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE và được thu thập. Kháng thể có thể được lọc và cô đặc bằng phương pháp thông thường. Kết tập hòa tan và chất đa lượng cũng có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường như loại trừ kích thước hoặc trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được làm đông lạnh ngay lập tức, như ở -70° C, hoặc làm đông khô.

Thuật ngữ "peptit" dùng để chỉ đoạn hợp chất giữa axit amin và protein, bao gồm hai hoặc nhiều phân tử axit amin kết nối với nhau thông qua liên kết peptit. Peptit là các đoạn cấu trúc và chức năng của protein. Hormon, enzym và những thứ tương tự về bản chất là peptit.

Thuật ngữ "sacarit" được dùng để chỉ đại phân tử sinh học bao gồm ba nguyên tố C, H và O, mà có thể được chia thành monosacarit, đisacarit và polysacarit.

Thuật ngữ "đoạn dò huỳnh quang" dùng để chỉ một loại phân tử huỳnh quang có huỳnh quang đặc trưng trong vùng hồng ngoại gần-nhìn thấy được cực tím. Đặc tính huỳnh quang của đoạn dò huỳnh quang (bước sóng kích thích và phát xạ, cường độ, thời gian tồn tại và mức độ phân cực, v.v.) có thể thay đổi một cách nhạy cảm theo đặc tính của môi trường, như độ phân cực, chỉ số khúc xạ, độ nhớt, v.v. Tương tác không cộng hóa trị giữa đoạn dò huỳnh quang và axit nucleic (ADN hoặc ARN), protein hoặc cấu trúc đại phân tử khác cho phép thay đổi một hoặc nhiều đặc tính huỳnh quang, mà có thể được sử dụng để nghiên cứu đặc tính và hành vi của chất đại phân tử.

Thuật ngữ "dược chất độc" dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngừng chức năng của tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá hủy tế bào. Dược chất độc bao gồm các độc tố và các hợp

chất khác có thể được sử dụng trong điều trị khối u.

Thuật ngữ "alkyl" được dùng để chỉ nhóm hyđrocacbon béo bão hoà, mà làm nhóm mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 20 nguyên tử cacbon, tốt hơn là alkyl có 1 đến 12 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là alkyl có 1 đến 10 nguyên tử cacbon, và tốt nhất là alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon (có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon). Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế bao gồm metyl, etyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, *sec*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-đimetylpropyl, 1,2-đimetylpropyl, 2,2-đimetylpropyl, 1-etylpropyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, *n*-hexyl, 1-etyl-2-metylpropyl, 1,1,2-trimetylpropyl, 1,1-đimetylbutyl, 1,2-đimetylbutyl, 2,2-đimetylbutyl, 1,3-đimetylbutyl, 2-etylbutyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 2,3-đimetylbutyl, *n*-heptyl, 2-metylhexyl, 3-metylhexyl, 4-metylhexyl, 5-metylhexyl, 2,3-đimetylpentyl, 2,4-đimetylpentyl, 2,2-đimetylpentyl, 3,3-đimetylpentyl, 2-etylpentyl, 3-etylpentyl, *n*-octyl, 2,3-đimetylhexyl, 2,4-đimetylhexyl, 2,5-đimetylhexyl, 2,2-đimetylhexyl, 3,3-đimetylhexyl, 4,4-đimetylhexyl, 2-etylhexyl, 3-etylhexyl, 4-etylhexyl, 2-metyl-2-etylpentyl, 2-metyl-3-etylpentyl, *n*-nonyl, 2-metyl-2-etylhexyl, 2-metyl-3-etylhexyl, 2,2-đietylpentyl, *n*-đexyl, 3,3-đietylhexyl, 2,2-đietylhexyl, và các chất đồng phân mạch nhánh khác nhau của nó. Tốt hơn nữa là, nhóm alkyl này là alkyl thấp có 1 đến 6 nguyên tử cacbon, và các ví dụ không làm giới hạn phạm vi theo sáng chế bao gồm metyl, etyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, *sec*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-đimetylpropyl, 1,2-đimetylpropyl, 2,2-đimetylpropyl, 1-etylpropyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, *n*-hexyl, 1-etyl-2-metylpropyl, 1,1,2-trimetylpropyl, 1,1-đimetylbutyl, 1,2-đimetylbutyl, 2,2-đimetylbutyl, 1,3-đimetylbutyl, 2-etylbutyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 2,3-đimetylbutyl và các nhóm tương tự. Alkyl này có thể được thế hoặc không được thế. Khi được thế, nhóm thế có thể được thế ở điểm kết nối sẵn có bất kỳ. Tốt hơn là (các) nhóm thế là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, thiol, hyđroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio, heteroxyclylthio và oxo.

Thuật ngữ "heteroalkyl" được dùng để chỉ alkyl chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó alkyl là như được xác định ở trên đây.

Thuật ngữ "alkylen" được dùng để chỉ nhóm hyđrocacbon béo mạch thẳng hoặc mạch nhánh bão hoà có hai gốc thu được từ việc loại bỏ hai nguyên tử hyđro ra khỏi nguyên tử nguyên tử cacbon giống nhau hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau của alkan gốc.

Alkylen này là nhóm mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 20 nguyên tử cacbon, tốt hơn là có 1 đến 12 nguyên tử cacbon, và tốt hơn nữa là có 1 đến 6 nguyên tử cacbon (có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon). Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về alkylen bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metylen (-CH_2-), 1,1-etylen

(-CH(CH_3)-), 1,2-etylen (-CH_2CH_2)-, 1,1-propylen (-CH(CH_2CH_3)-), 1,2-propylen (-CH_2CH(CH_3)-), 1,3-propylen (-$CH_2CH_2CH_2$-), 1,4-butylen (-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-), 1,5-pentylen (-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-), và các nhóm tương tự. Alkylen có thể được thế hoặc không được thế. Khi được thế, nhóm thế có thể được thế ở điểm kết nối sẵn có bất kỳ. Tốt hơn là, (các) nhóm thế là một hoặc nhiều nhóm độc lập tuỳ ý được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, thiol, hyđroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroalkoxy, xycloalkylthio, heteroxyclylthio và oxo.

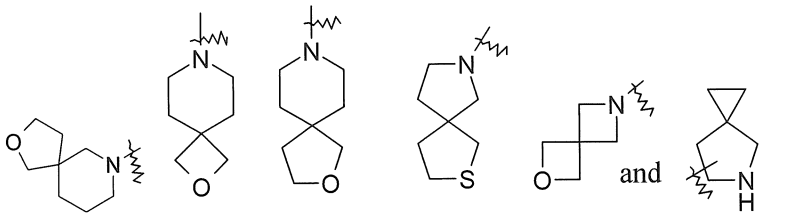
Thuật ngữ "alkoxy" được dùng để chỉ nhóm -O-(alkyl) hoặc -O-(xycloalkyl không được thế), trong đó alkyl và xycloalkyl là như được xác định ở trên đây. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về alkoxy bao gồm metoxy, etoxy, propoxy, butoxy, xyclopropyloxy, xyclobutyloxy, xyclopentyloxy, xyclohexyloxy. Alkoxy có thể tùy ý được thế hoặc không được thế. Khi được thế, tốt hơn là (các) nhóm thế là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, thiol, hyđroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio và heteroxyclylthio.

Thuật ngữ "xycloalkyl" được dùng để chỉ nhóm thế hyđrocacbon vòng đơn hoặc đa vòng bão hoà hoặc một phần không bão hoà có 3 đến 20 nguyên tử cacbon, tốt hơn là có 3 đến 12 nguyên tử cacbon, tốt hơn nữa là có 3 đến 10 nguyên tử cacbon, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 3 đến 8 nguyên tử cacbon (có 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 nguyên tử cacbon). Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về vòng đơn xycloalkyl bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclopentenyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, xyclohexađienyl, xycloheptyl, xycloheptatrienyl, xyclooctyl và tương tự. Xycloalkyl đa vòng bao gồm xycloalkyl có vòng spiro, vòng ngưng tụ hoặc vòng được liên kết cầu nối.

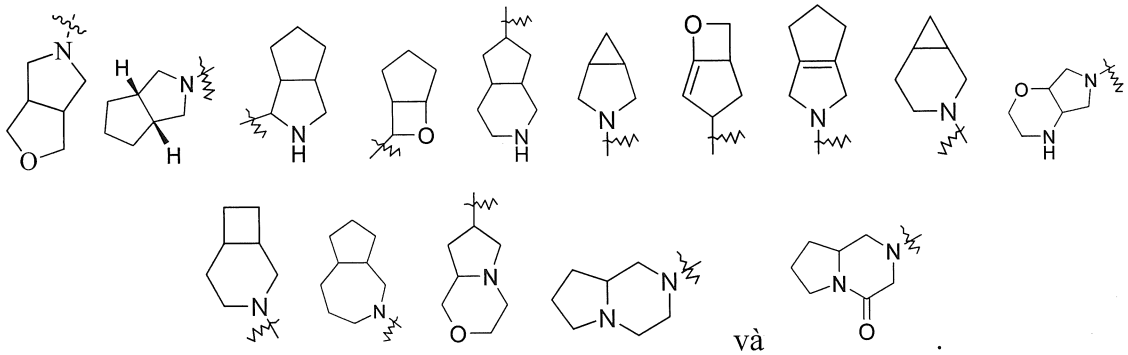
Thuật ngữ "heteroxyclyl" được dùng để chỉ nhóm hyđrocacbon vòng đơn hoặc đa vòng bão hoà hoặc một phần không bão hoà có từ 3 đến 20 cạnh, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử trên vòng là các nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên bằng 0, 1 hoặc 2), nhưng loại trừ -O-O-, -O-S- hoặc -S-S- trong vòng, với nguyên tử trên vòng còn lại là nguyên tử cacbon. Tốt hơn là, heteroxyclyl có từ 3 đến 12 nguyên tử trên vòng, trong đó 1 đến 4 nguyên tử là các nguyên tử khác loại (1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử khác loại); và tốt hơn nữa là, có 3 đến 10 nguyên tử trên vòng (có 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 nguyên tử trên vòng). Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về vòng đơn heteroxyclyl bao gồm pyroliđinyl, piperiđinyl, piperazinyl, morpholinyl, thiomorpholinyl, homopiperazinyl và vòng tương tự. Heteroxyclyl đa vòng bao gồm heteroxyclyl có vòng spiro, vòng ngưng tụ hoặc vòng được liên kết cầu nối.

Thuật ngữ "spiro heteroxyclyl" được dùng để chỉ nhóm heteroxyclyl đa vòng có 5 đến 20 cạnh với từng vòng nối qua một nguyên tử chung (được gọi là nguyên tử spiro), trong đó một hoặc nhiều nguyên tử trên vòng là nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm

bao gồm N, O và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 2), với nguyên tử trên vòng còn lại là nguyên tử cacbon, trong đó các vòng này có thể chứa một hoặc nhiều liên kết đôi, nhưng không có vòng nào trong số các vòng này có hệ điện tử π được liên hợp hoàn toàn. Tốt hơn là spiro heteroxyclyl là spiro heteroxyclyl có 6 đến 14 cạnh, và tốt hơn nữa là spiro heteroxyclyl có 7 đến 10 cạnh. Tùy theo số lượng các nguyên tử spiro chung giữa các vòng, spiro heteroxyclyl có thể được chia thành mono-spiro heteroxyclyl, đi-spiro heteroxyclyl, hoặc poly-spiro heteroxyclyl, và tốt hơn nếu spiro heteroxyclyl là mono-spiro heteroxyclyl hoặc đi-spiro heteroxyclyl, và tốt hơn nữa là spiro heteroxyclyl 4-cạnh/4-cạnh, 4-cạnh/5-cạnh, 4-cạnh/6-cạnh, 5-cạnh/5-cạnh, hoặc 5-cạnh/6-cạnh mono-spiro heteroxyclyl. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về spiro heteroxyclyl bao gồm:

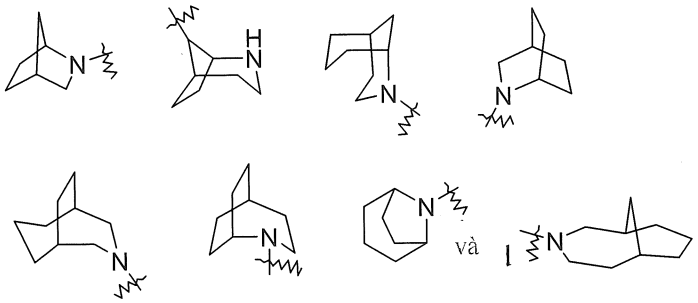


Thuật ngữ "heteroxyclyl ngưng tụ" được dùng để chỉ nhóm heteroxyclyl đa vòng có 5 đến 20 cạnh, trong đó mỗi vòng trong hệ vòng này có chung cặp nguyên tử liền kề với vòng khác, trong đó một hoặc nhiều vòng có thể chứa một hoặc nhiều liên kết đôi, nhưng không vòng nào trong số các vòng này có hệ điện tử π được liên hợp hoàn toàn, và trong đó một hoặc nhiều nguyên tử trên vòng là các nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên bằng 0, 1 hoặc 2), với nguyên tử trên vòng còn lại là nguyên tử cacbon. Tốt hơn là, heteroxyclyl ngưng tụ là heteroxyclyl ngưng tụ có 6 đến 14 cạnh, và tốt hơn nữa là heteroxyclyl ngưng tụ có 7 đến 10 cạnh (7, 8, 9 hoặc 10 cạnh). Tùy theo số lượng các vòng, heteroxyclyl ngưng tụ có thể được chia thành heteroxyclyl ngưng tụ có hai vòng, ba vòng, bốn vòng hoặc nhiều vòng, và heteroxyclyl ngưng tụ này tốt hơn là heteroxyclyl ngưng tụ có hai vòng hoặc ba vòng, và tốt hơn nữa là heteroxyclyl ngưng tụ có hai vòng 5-cạnh/5-cạnh hoặc 5-cạnh/6-cạnh. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về heteroxyclyl ngưng tụ bao gồm:

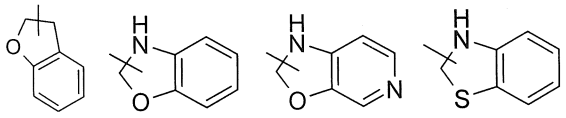


Thuật ngữ "heteroxyclyl được liên kết cầu nối" được dùng để chỉ nhóm

heteroxyclyl đa vòng có từ 5 đến 14 cạnh, trong đó mỗi hai vòng trong hệ này có chung hai nguyên tử không liên kết, trong đó các vòng này có thể có một hoặc nhiều liên kết đôi, nhưng không vòng nào trong số các vòng này có hệ điện tử π được liên hợp hoàn toàn, và trong đó một hoặc nhiều nguyên tử trên vòng là nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên bằng 0, 1 hoặc 2), với nguyên tử trên vòng còn lại là nguyên tử cacbon. Tốt hơn là, heteroxyclyl được liên kết cầu nối là heteroxyclyl được liên kết cầu nối có 6 đến 14 cạnh, và tốt hơn nữa là heteroxyclyl được liên kết cầu nối có 7 đến 10 cạnh (7, 8, 9 hoặc 10 cạnh). Tùy theo số lượng của các vòng, heteroxyclyl được liên kết cầu nối có thể được chia thành heteroxyclyl được liên kết cầu nối có hai vòng, ba vòng, bốn vòng hoặc nhiều vòng, và heteroxyclyl được liên kết cầu nối tốt hơn là heteroxyclyl được liên kết cầu nối có hai vòng, ba vòng hoặc bốn vòng, và tốt hơn nữa là heteroxyclyl được liên kết cầu nối có hai vòng, ba vòng hoặc bốn vòng. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về heteroxyclyl được liên kết cầu nối bao gồm:



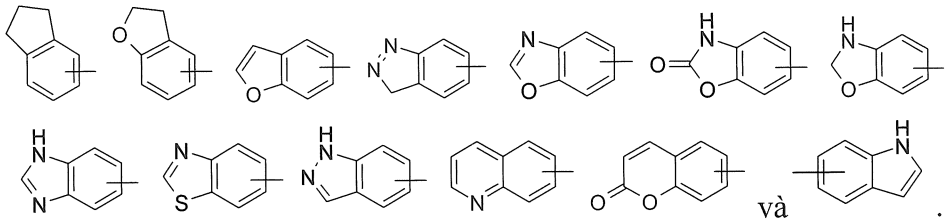
Vòng heteroxyclyl có thể được ngưng tụ thành vòng aryl, heteroaryl hoặc xycloalkyl, trong đó vòng liên kết với cấu trúc gốc là heteroxyclyl. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế của nó bao gồm:


và các vòng tương tự.

Heteroxyclyl có thể tùy ý được thế hoặc không được thế. Khi được thế, tốt hơn nếu (các) nhóm thế là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, thiol, hyđroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio, heteroxyclylthio và oxo.

Thuật ngữ "aryl" được dùng để chỉ vòng ngưng tụ có một vòng hoặc nhiều vòng tất cả đều là vòng cacbon có 6 đến 14 cạnh (tức là, mỗi vòng trong hệ này có chung cặp nguyên tử cacbon liền kề với vòng khác trong hệ này) có hệ điện tử π được liên hợp, tốt hơn là vòng aryl có 6 đến 10 cạnh (6, 7, 8, 9 hoặc 10 cạnh) ví dụ, phenyl và naphtyl, và tốt hơn là phenyl. Vòng aryl có thể được ngưng tụ thành vòng heteroaryl, heteroxyclyl hoặc xycloalkyl, trong đó vòng liên kết với cấu trúc gốc là vòng aryl. Các ví dụ không

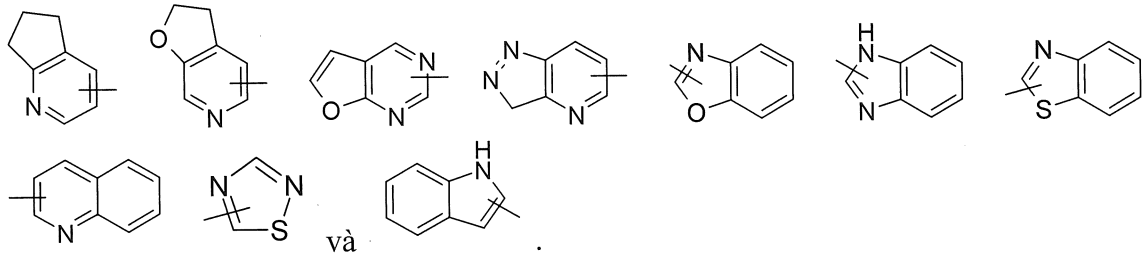
làm giới hạn phạm vi của sáng chế của các vòng này bao gồm:



và .

Aryl có thể được thế hoặc không được thế. Khi được thế, (các) nhóm thế này tốt hơn là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, thiol, hyđroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio và heteroxyclylthio.

Thuật ngữ "heteroaryl" được dùng để chỉ hệ dị thơm có 5 đến 14 cạnh có 1 đến 4 nguyên tử khác loại (1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử khác loại) được chọn từ nhóm bao gồm O, S và N. Heteroaryl tốt hơn là heteroaryl có 5 đến 10 cạnh (5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 cạnh), tốt hơn nữa là heteroaryl có 5 hoặc 6 cạnh, ví dụ furyl, thienyl, pyriđyl, pyrolyl, N-alkylpyrolyl, pyrimiđinyl, pyrazinyl, imiđazolyl, tetrazolyl và các hợp chất tương tự. Heteroaryl vòng có thể được ngưng tụ thành vòng aryl, heteroxyclyl hoặc xycloalkyl, trong đó vòng liên kết với cấu trúc gốc là vòng heteroaryl. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế của nó bao gồm:



và .

Heteroaryl có thể tùy ý được thế hoặc không được thế. Khi được thế, (các) nhóm thế này tốt hơn là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, thiol, hyđroxy, nitro, xyano, xycloalkyl, heteroxyclyl, aryl, heteroaryl, xycloalkoxy, heteroxycloalkoxy, xycloalkylthio và heteroxyclylthio.

Thuật ngữ "nhóm bảo vệ amino" được dùng để chỉ nhóm ngăn không cho nhóm amino phản ứng khi các thành phần khác của phân tử tham gia phản ứng, và có thể được loại bỏ một cách một cách dễ dàng. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế bao gồm 9-florenylmetyloxycarbonyl, *tert*-butoxycarbonyl, axetyl, benzyl, alyl, *p*-metoxybenzyl và tương tự. Các nhóm này có thể tùy ý được thế bằng từ 1 đến 3 phần tử thế (một, hai hoặc ba phần tử thế) được chọn từ nhóm bao gồm halogen, alkoxy và nitro. Nhóm bảo vệ amino tốt hơn là 9-florenylmetyloxycarbonyl.

Thuật ngữ "haloalkyl" được dùng để chỉ nhóm alkyl được thế bằng một hoặc nhiều

halogen, trong đó alkyl là như được xác định ở trên đây.

Thuật ngữ "alkyl đã được đoteri hóa" được dùng để chỉ nhóm alkyl được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử đoteri, trong đó alkyl là như được xác định ở trên đây.

Thuật ngữ "hyđroxyalkyl" được dùng để chỉ nhóm alkyl được thế bằng một hoặc nhiều hyđroxy, trong đó alkyl là như được xác định ở trên đây.

Thuật ngữ "hyđroxy" được dùng để chỉ nhóm -OH.

Thuật ngữ "halogen" được dùng để chỉ flo, clo, brom hoặc iot.

Thuật ngữ "amino" được dùng để chỉ nhóm $-NH_2$.

Thuật ngữ "nitro" được dùng để chỉ nhóm $-NO_2$.

Thuật ngữ "xyano" được dùng để chỉ nhóm -CN.

Thuật ngữ "amit" được dùng để chỉ nhóm -C(O)N(alkyl) hoặc -C(O)N(xycloalkyl), trong đó alkyl và xycloalkyl là như được xác định ở trên đây.

Thuật ngữ "alkoxycarbonyl" được dùng để chỉ nhóm -C(O)O(alkyl) hoặc -C(O)O(xycloalkyl), trong đó alkyl và xycloalkyl là như được xác định ở trên đây.

Sáng chế cũng bao gồm các hợp chất có công thức (I) ở các dạng đã được đoteri hóa khác nhau. Mỗi nguyên tử hyđro sẵn có được gắn vào nguyên tử cacbon có thể độc lập được thế bằng nguyên tử đoteri. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tổng hợp hợp chất có công thức (I) ở dạng đã được đoteri hóa với việc tham khảo các tài liệu liên quan. Hợp chất có công thức (I) ở dạng đã được đoteri hóa có thể được điều chế bằng cách sử dụng các nguyên liệu thô đã được đoteri hóa đang có trên thị trường, hoặc chúng có thể được tổng hợp bằng kỹ thuật thông thường với chất phản ứng đã được đoteri hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, boran đã được đoteri hóa, triboran đã được đoteri hóa trong tetrahyđrofuran, lithi nhôm hyđrua đã được đoteri hóa, iođoetan đã được đoteri hóa, iođometan đã được đoteri hóa và các hợp chất tương tự.

Thuật ngữ "tùy chọn" hoặc "tuỳ ý" có nghĩa là sự kiện hoặc trường hợp được mô tả sau đó có thể, nhưng không nhất thiết xảy ra, và mô tả như vậy bao gồm tình huống mà sự kiện hoặc trường hợp xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, "heteroxyclyl tùy ý được thế bằng alkyl" có nghĩa là nhóm alkyl có thể là, nhưng không nhất thiết, có mặt, và mô tả như vậy bao gồm tình huống heteroxyclyl được thế bằng alkyl và heteroxyclyl không được thế bằng alkyl.

Thuật ngữ "được thế" được dùng để chỉ một hoặc nhiều nguyên tử hyđro trong nhóm, tốt hơn là đến 5, và tốt hơn nữa là 1, 2 hoặc 3 nguyên tử hyđro, độc lập được thế bằng một số phần tử thế tương ứng. Không cần phải nói rằng các phần tử thế chỉ tồn tại ở vị trí hóa học có thể có của chúng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định liệu việc thay thế là có thể hoặc không thể bằng các thử nghiệm hoặc lý thuyết mà không cần nỗ lực quá nhiều. Ví dụ, sự kết hợp của amino hoặc hyđroxy có nguyên tử hyđro và cacbon tự do có liên kết không bão hoà (như olefin) có thể không ổn định.

Thuật ngữ "dược phẩm" được dùng để chỉ hỗn hợp chứa một hoặc nhiều hợp chất

được mô tả trong bản mô tả này hoặc các muối sinh lý/dược dụng hoặc tiền dược chất của nó với các thành phần hoá học khác, và các thành phần khác như các chất mang và các tá dược sinh lý/dược dụng. Mục đích của dược phẩm là để tạo điều kiện thuận lợi cho việc sinh vật dùng hợp chất, mà có lợi cho sự hấp thụ hoạt chất để thể hiện hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ "muối dược dụng" hoặc "muối có dược dính" được dùng để chỉ muối của thể tiếp hợp phối tử-dược chất theo sáng chế hoặc muối của hợp chất của sáng chế, mà an toàn và có hiệu quả ở động vật có vú và có hoạt tính sinh học mong muốn. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất theo sáng chế chứa ít nhất một amino, vì vậy nó có thể tạo ra muối với axit. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các muối dược dụng bao gồm hyđroclorua, hyđrobromua, hyđroiođua, sulfat, bisulfat, xitrat, axetat, sucxinat, ascorbat, oxalat, nitrat, sorbat, hyđro phosphat, đihyđro phosphat, salixilat, hyđro xitrat, tartrat , maleat, fumarat, format, benzoat, metansulfonat, etansulfonat, benzensulfonat, *p*-toluensulfonat.

Thuật ngữ "solvat" được dùng để chỉ solvat dược dụng được tạo ra bởi thể tiếp hợp phối tử-dược chất theo sáng chế với một hoặc nhiều phân tử dung môi. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các phân tử dung môi bao gồm nước, etanol, axetonitril, isopropanol, DMSO, etyl axetat.

Thuật ngữ "lượng dược chất" được dùng để chỉ số lượng trung bình của dược chất gây độc tế bào được nạp lên mỗi phối tử trong hợp chất có công thức (I), và cũng có thể được biểu thị bằng tỷ lệ giữa số lượng thuốc và số lượng kháng thể. Lượng dược chất này có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 12, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 10 dược chất gây độc tế bào (D) cho mỗi phối tử (Pc). Theo một phương án của sáng chế, lượng dược chất này được biểu thị bằng n, còn được gọi là giá trị DAR, và các giá trị được lấy làm ví dụ có thể là giá trị trung bình của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Số lượng trung bình của dược chất cho mỗi phân tử ADC sau phản ứng liên hợp có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường như phương pháp xác định đặc điểm bằng quang phổ UV/nhìn thấy được, phổ khối, thử nghiệm ELISA và HPLC.

Theo phương án của sáng chế, dược chất gây độc tế bào được tiếp hợp với amino đầu tận cùng N và/hoặc ε-amino của các gốc lysin của phối tử thông qua đơn vị liên kết. Thông thường, số lượng các phân tử dược chất được tiếp hợp với kháng thể trong phản ứng liên hợp sẽ nhỏ hơn so với số tối đa theo lý thuyết.

Các phương pháp không làm giới hạn phạm vi của sáng chế sau có thể được sử dụng để kiểm soát lượng thể tiếp hợp phối tử-dược chất gây độc tế bào:

(1) kiểm soát tỷ lệ mol giữa chất liên kết với kháng thể đơn dòng,

(2) kiểm soát thời gian và nhiệt độ phản ứng,

(3) lựa chọn các chất phản ứng khác nhau.

Việc điều chế dược phẩm thông thường có thể được tìm thấy ở dược điển Trung Quốc.

Thuật ngữ "chất mang" được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế được dùng để chỉ hệ thống có thể thay đổi cách thuốc đi vào và phân bổ trong cơ thể người, kiểm soát tốc độ giải phóng thuốc và phân phối thuốc đến cơ quan đích. Sự phóng thích chất mang thuốc và hệ thống đích có thể làm giảm sự suy giảm và hao hụt của thuốc, làm giảm tác dụng phụ và làm tăng sinh khả dụng. Ví dụ, chất hoạt động bề mặt polyme mà được dùng làm chất mang có thể tự lắp ráp để tạo ra các dạng kết tập khác nhau do cấu trúc lưỡng tính độc đáo của chúng. Các ví dụ được ưu tiên bao gồm mixen, vi nhũ tương, gel, tinh thể lỏng, túi và chất tương tự. Các dạng kết tập này có khả năng bao bọc các phân tử thuốc, đồng thời có tính thấm tốt đối với màng, và có thể được dùng làm chất mang thuốc tuyệt vời.

Thuật ngữ "tá dược" là một chất phụ gia trong công thức dược phẩm ngoài thuốc chính, cũng có thể được gọi là chất bổ trợ, như các chất kết dính, chất độn, tá dược rã, chất bôi trơn trong viên nén; thành phần chất nền trong chế phẩm bán rắn, thuốc mỡ và kem; chất bảo quản, chất chống oxy hoá, hương liệu, chất tạo hương vị, chất đồng dung môi, chất nhũ hoá, chất hòa tan, chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu, chất tạo màu trong các chế phẩm dạng lỏng và chất tương tự.

Thuật ngữ "chất pha loãng", còn được gọi là chất độn, chủ yếu nhằm mục đích gia tăng khối lượng và thể tích của viên nén. Việc bổ sungchất pha loãng đảm bảo một thể tích nhất định, làm giảm độ lệch liều của các thành phần chính, và làm tăng độ nén của thuốc. Khi viên nén chứa thành phần dầu, bổ sung chất hấp thụ để hấp thụ chất dầu này, nhờ đó giữ trạng thái "khô" để tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành viên nén. Ví dụ, chất pha loãng bao gồm tinh bột, lactoza, muối vô cơ của canxi, xenluloza dạng vi tinh thể và chất tương tự.

Dược phẩm này có thể ở dạng dung dịch nước vô trùng dùng để tiêm. Chất pha hoặc dung môi có thể sử dụng là nước, dung dịch Ringer hoặc dung dịch natri clorua đẳng trương. Chế phẩm vô trùng dùng để tiêm này có thể là vi nhũ tương dầu trong nước vô trùng dùng để tiêm, trong đó hoạt chất này được hoà tan trong pha dầu. Ví dụ, hoạt chất này được hòa tan trong hỗn hợp bao gồm dầu đậu nành và lexitin. Sau đó, dung dịch dầu này được bổ sung vào hỗn hợp gồm nước và glyxerin, và được xử lý để tạo ra vi nhũ tương. Dung dịch dùng để tiêm hoặc vi nhũ tương này có thể được đưa vào máu của bệnh nhân bằng cách tiêm nhanh tại chỗ. Ngoài ra, tốt hơn nếu dung dịch và vi nhũ tương này được dùng theo cách duy trì nồng độ tuần hoàn không đổi của hợp chất theo sáng chế. Để duy trì nồng độ không đổi này, có thể sử dụng thiết bị truyền tĩnh mạch liên tục. Ví dụ về thiết bị này là bơm tiêm tĩnh mạch Deltec CADD-PLUS. TM. 5400.

Dược phẩm này có thể ở dạng hỗn dịch nước hoặc dầu vô trùng dùng để tiêm tiêm bắp và tiêm dưới da. Hỗn dịch này có thể được bào chế với chất phân tán hoặc chất làm ướt và chất tạo huyền phù thích hợp như được mô tả nêu trên bằng các phương pháp đã biết. Chế phẩm vô trùng dùng để tiêm này cũng có thể là dung dịch vô trùng dùng để tiêm hoặc hỗn dịch được pha chế trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc dùng

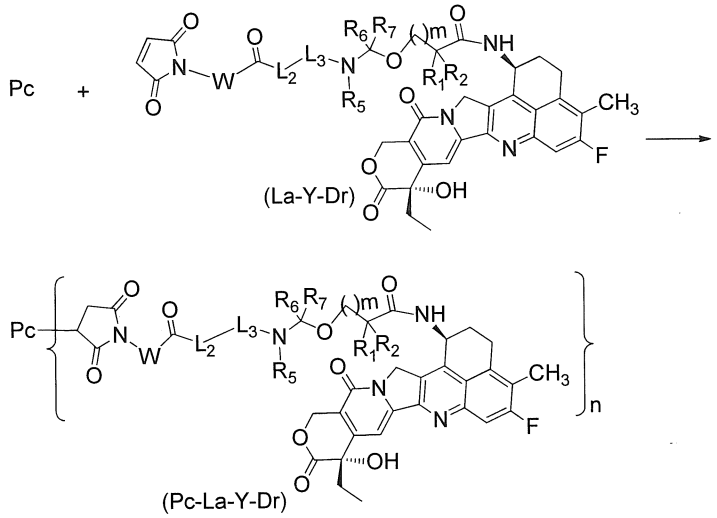
ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, dung dịch được pha trong 1, 3-butanđiol. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng có thể dễ dàng được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường huyền phù. Với mục đích này, có thể dùng dầu không bay hơi hỗn hợp bất kỳ bao gồm mono- hoặc đi-glyxerit tổng hợp. Ngoài ra, axit béo như axit oleic cũng có thể được sử dụng trong việc bào chế thuốc tiêm.

Sáng chế đề cập đến nhánh liên kết có thể cắt được có cấu trúc đặc trưng và hoạt tính hoạt chất có cấu trúc cụ thể, và thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC) bao gồm nhánh liên kết, hoạt chất và kháng thể. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất này là phức hợp được tạo ra bằng cách liên kết một chất độc hại với một kháng thể thông qua chất đệm. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC) này bị phân hủy trong cơ thể để giải phóng các phân tử hoạt tính, do đó có tác dụng trị khối u.

II. Phương pháp tổng hợp

Nhằm đạt được mục đích của sáng chế, các giải pháp kỹ thuật sau đây đã được áp dụng:

Phương pháp điều chế hợp chất có công thức (Pc-L_a-Y-Dr), bao gồm các bước sau:



Pc được liên hợp với hợp chất có công thức (L_a-Y-Dr) sau khi khử để thu được hợp chất có công thức (Pc-L_a-Y-Dr); chất khử tốt hơn là TCEP, cụ thể là, tốt hơn là để khử liên kết đisulfua trên kháng thể;

trong đó:

Pc, W, L^2, L^3, R^1, R^2, R^5~R^7, m và n là như được xác định trong công thức (Pc-L_a-Y-Dr).

Chi tiết một hoặc nhiều phương án theo sáng chế được trình bày trong phần mô tả trên đây. Mặc dù phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực tế hoặc thử nghiệm theo sáng chế, các phương pháp và vật liệu được ưu tiên được mô tả dưới đây. Qua phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, các dấu hiệu, đối tượng và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng. Trong bản mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ, trừ khi được

chỉ ra cụ thể, danh từ dạng số ít kể cả nghĩa số nhiều. Trừ khi có quy định cụ thể, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này đều phù hợp với cách hiểu thông thường theo các thuật ngữ của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế áp dụng. Tất cả các sáng chế và công bố được trích dẫn trong bản mô tả này đều được đưa đây bằng cách viện dẫn. Các ví dụ sau được trình bày để minh họa đầy đủ hơn các phương án được ưu tiên của sáng chế. Các phương án này không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ và phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ.

Các phương pháp thử nghiệm trong các ví dụ theo sáng chế mà không chỉ ra điều kiện cụ thể được thực hiện theo các điều kiện thông thường hoặc các điều kiện được khuyến nghị bởi nhà sản xuất vật liệu hoặc sản phẩm. Thuốc thử không ghi rõ nguồn cụ thể là thuốc thử thông thường mua ngoài chợ. Các chất phản ứng mà không chỉ ra nguồn cụ thể là các chất phản ứng thông thường được mua ngoài thị trường.

Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance - NMR) hoặc khối phổ (mass spectrometry - MS). NMR được xác định bằng máy Bruker AVANCE-400. Các dung môi để xác định là đimetyl sulfoxit đã được đoteri hóa (DMSO-d_6), cloform đã được đoteri hóa (đã đoteri hóa-cloform $CDCl_3$) và metanol đã được đoteri hóa (CD_3OD) và chất chuẩn nội là tetrametylxilan (TMS). Độ chuyển dịch hóa học được xác định là 10^{-6} (ppm).

MS được xác định bằng máy phân tích khối phổ FINNIGAN LCQAd (ESI) (nhà sản xuất: Thermo, mẫu: Finnigan LCQ advantage MAX).

UPLC được xác định bằng máy sắc ký lỏng/phân tích khối phổWaters Acquity UPLC SQD.

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được xác định trên máy sắc ký lỏng cao áp Agilent 1200DAD (cột sắc ký Sunfire C18 150×4, 6mM) và máy sắc ký lỏng cao áp Waters 2695-2996 (cột sắc ký Gimini C18 150×4, 6mM).

UV-HPLC được xác định trên máy quang phổ Thermo nanodrop2000 UV.

Mức độ ức chế sự tăng sinh và các trị số IC_{50} được xác định bằng máy đọc đĩa PHERA starFS (BMG Co., Đức).

Tấm silica gel Yantai Huanghai HSGF254 hoặc Qingdao GF254 được dùng làm sắc ký silica gel lớp mỏng (TLC). Kích cỡ của tấm silica gel được dùng trong TLC là nằm trong khoảng từ 0,15mM đến 0,2mM và kích cỡ của tấm silica gel được dùng trong tinh chế sản phẩm là nằm trong khoảng từ 0,4mM đến 0,5mM.

Nói chung, silica gel Yantai Huanghai có kích cỡ nằm trong khoảng từ 200 đến 300 mesh được dùng làm chất mang cho sắc ký cột.

Các chất liệu ban đầu đã biết theo sáng chế có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc có thể được mua từ ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organnics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc., Dari chemical Company, v.v.

Trừ khi có quy định cụ thể, các phản ứng này được thực hiện ở áp suất agon hoặc áp suất nitơ.

"Áp suất agon" hoặc "áp suất nitơ" có nghĩa là bình phản ứng được gắn thêm quả bóng khí agon hoặc nitơ (khoảng 1l).

"Áp suất hyđro" có nghĩa là bình phản ứng được gắn thêm quả bóng khí hyđro (khoảng 1l).

Phản ứng hyđro hóa có áp suất được thực hiện trên thiết bị hyđro hóa Parr 3916EKX và thiết bị tạo hyđro Qinglan QL-500 hoặc thiết bị hyđro hóa HC2-SS.

Trong phản ứng hyđro hóa, nói chung hệ phản ứng là chân không và chứa đầy hyđrogen và hoạt động trên được lặp lại ba lần.

Lò phản ứng vi sóng kiểu CEM Discover-S 908860 được dùng trong phản ứng vi sóng.

Trừ khi có quy định cụ thể, dung dịch phản ứng được dùng để chỉ dung dịch có nước.

Trừ khi có quy định cụ thể, nhiệt độ phản ứng của phản ứng là nhiệt độ phòng.

Nhiệt độ phòng nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C là nhiệt độ phản ứng thích hợp nhất.

Chuẩn bị dung dịch đệm PBS (pH = 6, 5) trong các ví dụ này: KH_2PO_4 với lượng 8, 5g, K_2HPO_4 với lượng 8, 56 g, $3H_2O$, NaCl với lượng 5, 85 g và EDTA với lượng 1, 5 g được chuẩn bị thành 2l trong bình, hỗn hợp này được siêu âm để hòa tan hoàn toàn và lắc kỹ để tạo dung dịch đệm.

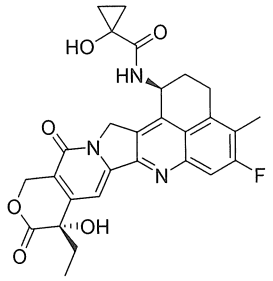
Hệ rửa giải trong sắc ký cột và hệ dung môi cải tiến trong sắc ký lớp mỏng để tinh chế các hợp chất này bao gồm: A: điclometan và isopropanol system, B: điclometan và metanol system, C: xăng và hệ etyl axetat. Tỷ lệ lượng dung môi này được điều chỉnh theo độ phân cực của hợp chất này và một lượng nhỏ chất axit hoặc chất kiềm như trietylamin cũng có thể được bổ sung vào để điều chỉnh.

Một số hợp chất theo sáng chế được mô tả đặc điểm bằng Q-TOF LC/MS. Liên quan đến Q-TOF LC/MS, Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole-Time của Flight Mass Spectrometer và Agilent 1290-Infinity UHPLC (cột Agilent Poroshell 300SB-C8 5 μm, 2, 1×75mM) được sử dụng.

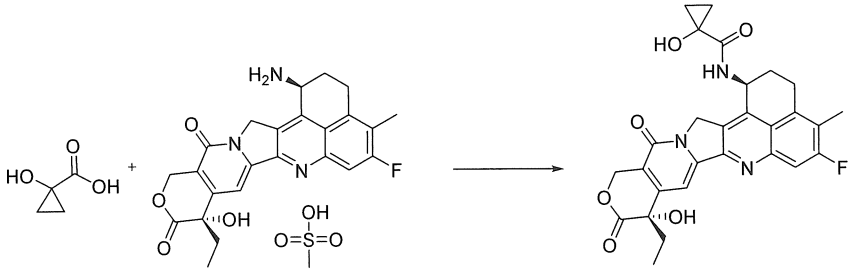
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

N-((1*S*,9*S*)-9-Etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-1-hyđroxyxyclopropan-1-carboxamit **1**



1



1a 1b 1

1 mL N,N-đimetylformamit được bổ sung vào exatecan metansulfonat 1b (2,0 mg, 3,76 μmol, được điều chế theo phương pháp đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent "EP0737686A1"), và dung dịch này được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. Trietylamin được bổ sung từng giọt vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy đến khi trong suốt. Axit 1-Hyđroxyxyclopropylcacboxylic 1a (1,4 mg, 3,7 μmol, được điều chế theo phương pháp đã biết đã được bộc lộ trong ấn phẩm "Tetrahedron Letters, 25(12), 1269-72; 1984") và 4-(4,6-đimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (3,8 mg, 13,7 μmol) được bổ sung lần lượt vào dung dịch phản ứng này. Sau khi bổ sung xong, dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 0-5°C trong thời gian 2 giờ. 5 mL nước được bổ sung vào dung dịch phản ứng để dập tắt phản ứng, và dung dịch phản ứng này được chiết bằng etyl axetat (8 mL×3). Các pha hữu cơ được kết hợp, được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hoà (5 mL×2), được làm khô trên khan natri sulfat và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm, và các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển B để thu được sản phẩm nêu ở đề mục 1 (1,6 mg, hiệu suất: 82,1%).

MS m/z (ESI): 520,2 [M+1].

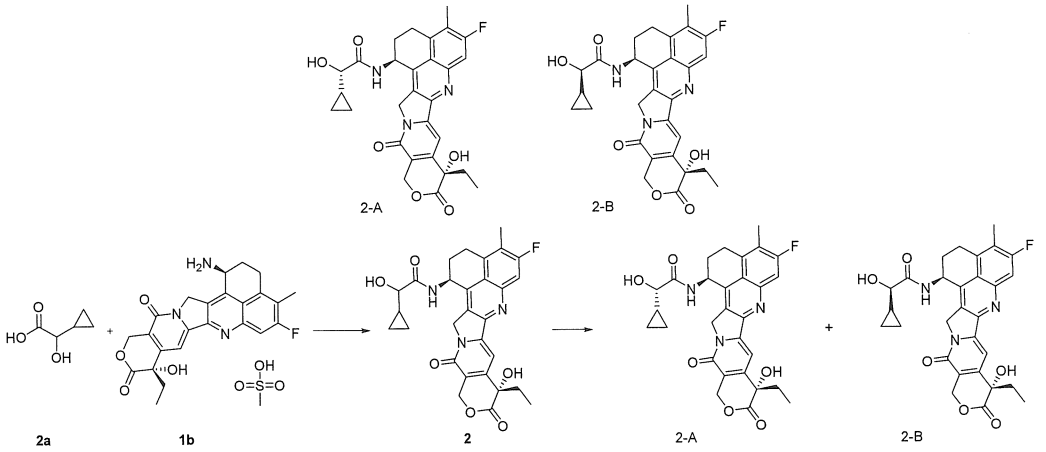
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,90-7,84 (m, 1H), 7,80-7,68(m,1H), 5,80-5,70 (m, 1H), 5,62-5,54(m, 2H), 5,44-5,32 (m, 2H), 5,28-5,10(m, 2H), 3,40-3,15 (m, 3H), 2,44 (s, 3H), 2,23(t, 1H), 2,06-1,75 (m, 2H), 1,68-1,56 (m, 1H), 1,22-1,18 (m, 2H), 1,04-0,98 (m, 2H), 0,89 (t, 3H).

Ví dụ 2

(*S*)-2-Xyclopropyl-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-1,2,3,9,10,12,13,15-octahyđrobenzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-2-hyđroxyaxetamit **2-A**

(*R*)-2-Xyclopropyl-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-1,2,3,9,10,12

,13,15-octahyđrobenzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-2-hyđroxyaxe tamit **2-B**



2 mL etanol và 0,4 mL *N*,*N*-đimetylformamit được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức **1b** (4 mg, 7,53 μmol). Dung dịch này được sục khí argon ba lần, và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. 0,3 mL *N*-metylmorpholin được bổ sung từng giọt vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy đến khi trong suốt. Axit 2-xyclopropyl-2-hyđroxy axetic có công thức **2a** (2,3 mg, 19,8 μmol, được điều chế theo phương pháp đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent "WO2013106717"), 1-hyđroxybenzotriazol (3 mg, 22,4 μmol) và 1-(3-đimetylaminopropyl)-3-etylcarbođiimit hyđroclorua (4,3 mg, 22,4 μmol) được bổ sung lần lượt vào dung dịch phản ứng này. Sau khi bổ sung xong, dung dịch phản ứng này được khuấy ở 0-5°C trong thời gian 1 giờ. Bể nước đá-nước được loại ra, và dung dịch phản ứng này được đun nóng đến 30°C và được khuấy trong thời gian 2 giờ. Dung dịch phản ứng này được cô dưới áp suất giảm, và hợp chất thô **2** thu được được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện tách: cột: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; pha động: A-nước (10mmol NH_4OAc), B-axetonitril, gradien rửa giải, tốc độ chảy: 18 mL/phút). Phân đoạn tương ứng được thu gom, và được cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm nêu ở đề mục (1,5 mg, 1,5 mg).

MS m/z (ESI): 534,0 [M+1].

Hợp chất 2-B với cấu hình đơn (có thời gian lưu ngắn hơn)

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,06 phút, độ tinh khiết: 88% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,37 (d, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,58-5,56 (m, 1H), 5,48 (d, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,32-5,29 (m, 1H), 3,60 (t, 1H), 3,19-3,13 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,20-2,14 (m, 1H), 1,98 (q, 2H), 1,87-1,83 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 1,34-1,28 (m, 1H), 0,86 (t, 3H), 0,50-0,39 (m, 4H).

Hợp chất 2-A với cấu hình đơn (có thời gian lưu dài hơn)

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,10 phút, độ tinh khiết: 86% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

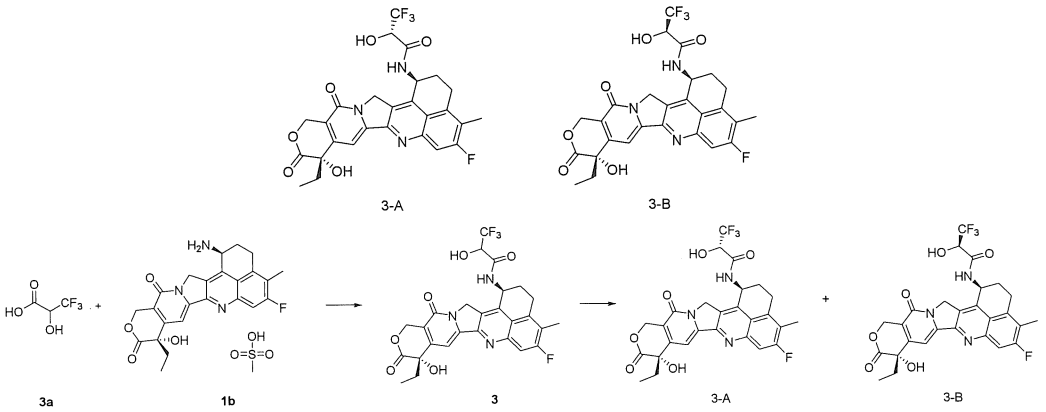
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,35 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,58-5,53 (m, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,37 (d, 1H), 5,32 (t, 1H), 3,62 (t, 1H), 3,20-3,15

(m, 2H), 2,40 (s, 3H), 2,25-2,16 (m, 1H), 1,98 (q, 2H), 1,87-1,82 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 1,21-1,14 (m, 1H), 0,87 (t, 3H), 0,47-0,35 (m, 4H).

Ví dụ 3

(*S*)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-Etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-1,2,3,9,10,12,13,15-octahyđ robenzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-3,3,3-triflo-2-hyđroxypropan amit **3-A**

(*R*)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-Etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-1,2,3,9,10,12,13,15-octahyđ robenzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-3,3,3-triflo-2-hyđroxypropan amit **3-B**



2 mL etanol và 0,4 mL *N*,*N*-đimetylformamit được bổ sung vào hợp chất có công thức **1b** (5,0 mg, 9,41 μmol), và dung dịch này được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. 0,3 mL *N*-metylmorpholin được bổ sung từng giọt vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy đến khi trong suốt. Axit 3,3,3-Triflo-2-hyđroxypropionic có công thức **3a** (4,1 mg, 28,4 μmol, supplier: Alfa), 1-hyđroxybenzotriazol (3,8 mg, 28,1 μmol) và 1-(3-đimetylaminopropyl)-3-etylcarbođiimit hyđroclorua (5,4 mg, 28,2 μmol) được bổ sung lần lượt vào dung dịch phản ứng này. Sau khi bổ sung xong, dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 0-5°C trong 10 phút. Bể nước đá-nước được loại ra, và dung dịch phản ứng này được đun nóng đến 30°C và được khuấy trong thời gian 8 giờ. Dung dịch phản ứng này được cô dưới áp suất giảm, và hợp chất thô **3** thu được được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện tách: cột: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; pha động: A-nước (10mmol NH_4OAc), B-axetonitril, gradien rửa giải, tốc độ chảy: 18 mL/phút). Các phân đoạn tương ứng được thu gom, và được cô dưới áp suất giảm để thu được các sản phẩm nêu ở đề mục này (1,5 mg, 1,5 mg).

MS m/z (ESI): 561,9 [M+1].

Hợp chất với cấu hình đơn (có thời gian lưu ngắn hơn)

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,11 phút, độ tinh khiết: 88% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,94 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,20 (d, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,61-5,55 (m, 1H), 5,45-5,23 (m, 3H), 5,15-5,06 (m, 1H), 4,66-4,57 (m, 1H), 3,18-3,12 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,26-2,20 (m, 1H), 2,16-2,08 (m, 1H), 2,02-1,94 (m, 1H), 1,89-1,82 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 0,87 (t, 3H).

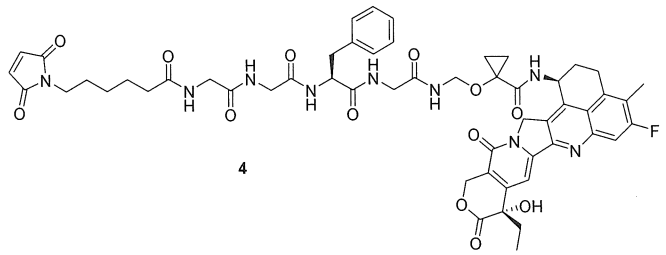
Hợp chất với cấu hình đơn (có thời gian lưu dài hơn)

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,19 phút, độ tinh khiết: 90% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

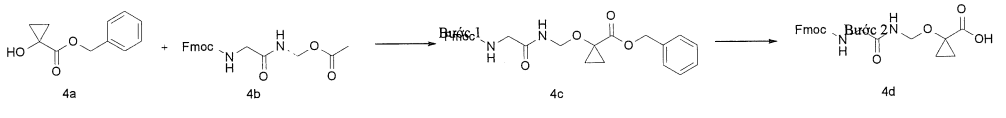
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,97 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,16 (d, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,63-5,55 (m, 1H), 5,45-5,20 (m, 3H), 5,16-5,07 (m, 1H), 4,66-4,57 (m, 1H), 3,18-3,12 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,22-2,14 (m, 1H), 2,04-1,95 (m, 2H), 1,89-1,82 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 0,87 (t, 3H).

Ví dụ 4

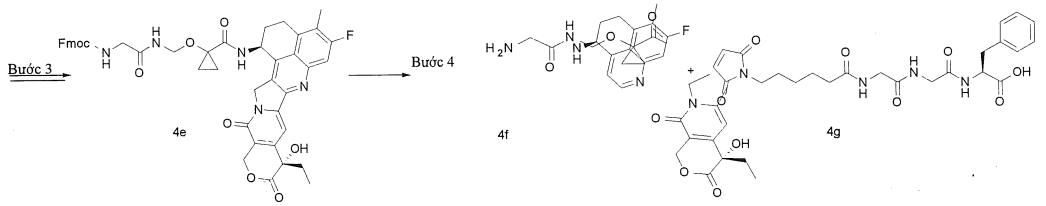
1-(((*S*)-7-Benzyl-20-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,5,8,11,14-pentaazaicosyl)oxy)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)xyclopropan-1-carboxamit **4**



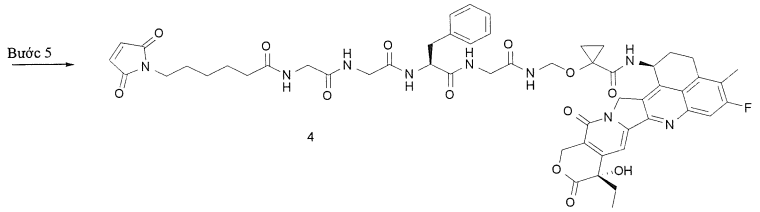
4



4a 4b 4c 4d



4e 4f 4g



4

Bước 1

Benzyl 1-((2-((((9*H*-floren-9-yl)metoxy)carbonyl)amino)axetamiđo)metoxy)xyclopropan-1-cacboxylat **4c**

Benzyl 1-hyđroxyxyclopropan-1-cacboxylat **4a** (104 mg, 0,54mmol, được điều chế theo phương pháp đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent "US2005/20645") và (2-((((9*H*-floren-9-yl)metoxy)carbonyl)amino)axetamiđo)metyl axetat **4b** (100 mg, 0,27mmol, được điều chế theo phương pháp đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent "CN105829346A") được bổ sung vào bình phản ứng, sau đó là bổ sung 5 mL

tetrahyđrofuran. Dung dịch phản ứng này được sục khí argon ba lần và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước, sau đó là bổ sung kali *tert*-butoxit (61 mg, 0,54mmol). Bể nước đá-nước được loại ra, và dung dịch phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 10 phút. 20 mL nước đá được bổ sung vào dung dịch phản ứng này, sau đó dung dịch này được chiết bằng etyl axetat (5 mL×2) và cloform (5 mL×5). Các pha hữu cơ được kết hợp và được cô. Các gốc thu được được hòa tan trong 3 mL 1,4-đioxanvà sau đó được bổ sung 0,6 mL nước, natri bicarbonat (27 mg, 0,32mmol) và 9-floren metyl cloformat (70 mg, 0,27mmol), và dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. 20 mL nước được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được chiết bằng etyl axetat (8 mL×3). Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hoà (20 mL), được làm khô trên khan natri sulfat và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm, và các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi khai triển B để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **4c** (100 mg, hiệu suất: 73,6%).

MS m/z (ESI): 501,0 [M+1].

Bước 2

Axit

1-((2-((((9*H*-Floren-9-yl)metoxy)carbonyl)amino)axetamiđo)metoxy)xyclopropan-1-cacboxylic **4d**

Hợp chất có công thức **4c** (50 mg, 0,10mmol) được hòa tan trong 3 mL hỗn hợp dung môi chứa tetrahyđrofuran và etyl axetat (V:V=2:1), sau đó là bổ sung paladi trên cacbon (25 mg, hàm lượng: 10%). Dung dịch phản ứng này được sục hyđro ba lần và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng này được lọc qua xelit, và bánh lọc được rửa bằng tetrahyđrofuran. Phần lọc được cô để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **4d** (41 mg, hiệu suất: 100%).

MS m/z (ESI): 411,0 [M+1].

Bước 3

(9*H*-Floren-9-yl)metyl (2-(((1-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)carbamoyl)xyclopropoxy)metyl)amino)-2-oxoetyl)carbamat **4e**

1b (7 mg, 0,013mmol) được bổ sung vào bình phản ứng, sau đó là bổ sung 1 mL N,*N*-đimetylformamit. Dung dịch này được sục khí argon ba lần, và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. Một giọt trietylamin, **4d** (7 mg, 0,017mmol) trong 0,5 mL *N*,*N*-đimetylformamit, và 4-(4,6-đimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (7 mg, 0,026mmol) được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy trong bể đá trong thời gian 35 phút. 10 mL nước được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được chiết bằng etyl axetat (5 mL×3). Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hoà (10 mL), được làm khô trên khan natri sulfat và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm, và các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển B để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **4e** (8,5 mg, hiệu suất: 78,0%).

MS m/z (ESI): 828,0 [M+1].

Bước 4

1-((2-Aminoaxetamiđo)metoxy)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)xyclopropan-1-carboxamit **4f**

4e (4 mg, 4,84 μmol) được hòa tan trong 0,2 mL điclometan, sau đó là bổ sung 0,1 mL đietylamin. Dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Dung dịch phản ứng này được cô dưới áp suất giảm. 2 mL toluen được bổ sung và dung dịch này được cô dưới áp suất giảm, việc này được lặp lại hai lần. 3 mL *n*-hexan được bổ sung để tạo huyền phù đặc, và lớp trên chứa hexan được đổ vào, việc này được lặp lại ba lần. Hỗn hợp này được cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm nêu ở đề mục ở dạng thô **4f** (2,9 mg), sản phẩm này được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

MS m/z (ESI): 606,0 [M+1].

Bước 5

1-(((*S*)-7-Benzyl-20-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,5,8,11,14-pentaazaicosyl)oxy)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)xyclopropan-1-carboxamit **4**

Hợp chất thô có công thức **4f** (2,9 mg, 4,84 μmol) được hòa tan trong 0,5 mL *N*,*N*-đimetylformamit. Dung dịch này được sục khí argon ba lần, và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. Axit (*S*)-2(-2-(-2-(6-(2,5-đioxo-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamiđo)axetamiđo)axetamiđo)-3-phenylpropionic **4g** (2,7 mg, 5,80 μmol, được điều chế theo phương pháp đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent "EP2907824") trong 0,3 mL *N*,*N*-đimetylformamit, và 4-(4,6-đimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (2,7 mg, 9,67 μmol) được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy trong bể đá trong thời gian 30 phút . Bể đá được loại ra, và dung dịch phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong thời gian 15 phút. Dung dịch phản ứng này được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện tách: cột: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; pha động: A-nước (10mmol NH_4OAc), B-axetonitril, gradien rửa giải, tốc độ chảy: 18 mL/phút). Các phân đoạn tương ứng được thu gom, và được cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **4** (2 mg, hiệu suất: 39,0%).

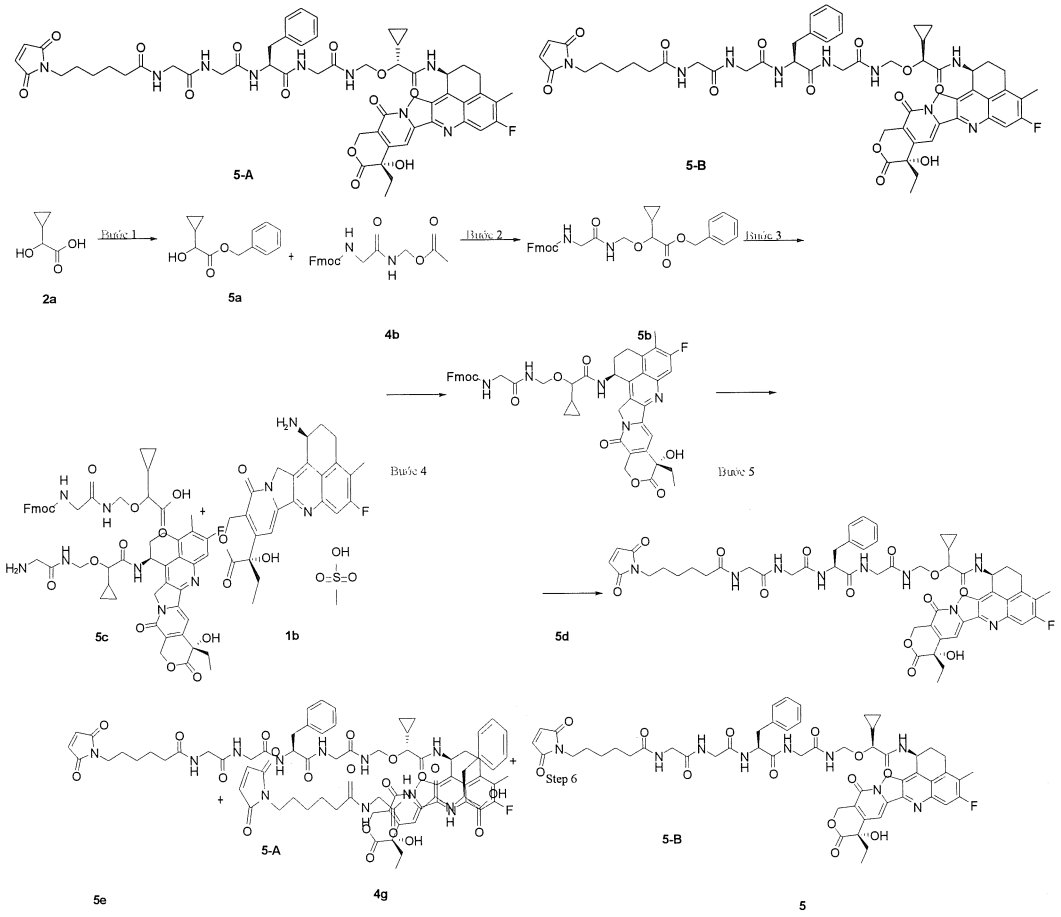
MS m/z (ESI): 1060,0 [M+1].

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 9,01 (d, 1H), 8,77 (t, 1H), 8,21 (t, 1H), 8,08-7,92 (m, 2H), 7,73 (d, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,24-7,07 (m, 4H), 6,98 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 5,61 (q, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,32 (t, 1H), 5,12 (q, 2H), 4,62 (t, 1H), 4,52 (t, 1H), 4,40-4,32 (m, 1H), 3,73-3,47 (m, 8H), 3,16-3,04 (m, 2H), 2,89 (dd, 1H), 2,69-2,55 (m, 2H), 2,37-2,23 (m, 4H), 2,12-1,93 (m, 4H), 1,90-1,74 (m, 2H), 1,52-1,38 (m, 4H), 1,33-1,11 (m, 5H), 0,91-0,81 (m, 4H).

Ví dụ 5

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzyl-2-xyclopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **5-A**

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzyl-2-xyclopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **5-B**



Bước 1

Benzyl 2-xyclopropyl-2-hyđroxyaxetat **5a**

Hợp chất có công thức **2a** (1,3 g, 11,2mmol, được điều chế theo phương pháp đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent "WO2013/106717") được hòa tan trong 50 mL axetonitril, và sau đó được lần lượt bổ sung kali cacbonat (6,18 g, 44,8mmol), benzyl bromua (1,33 mL, 11,2mmol) và tetrabutylamoni iođua (413 mg, 1,1mmol) vào. Dung

dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 48 giờ, và được lọc qua xelit. Bánh lọc được rửa bằng etyl axetat (10 ml), và các phần lọc được kết hợp và được cô dưới áp suất giảm. Các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi khai triển C để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **5a** (2 g, hiệu suất: 86,9%).

Bước 2

Benzyl 10-xyclopropyl-1-(9*H*-floren-9-yl)-3,6-đioxo-2,9-dioxa-4,7-điazaundecan-11-oat **5b**

5a (120,9 mg, 0,586mmol) và **4b** (180 mg, 0,489mmol) được bổ sung vào bình phản ứng, sau đó là bổ sung 4 mL tetrahyđrofuran. Dung dịch phản ứng này được sục khí argon ba lần và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. Kali *tert*-butoxit (109 mg, 0,98mmol) được bổ sung và bể nước đá-nước được loại ra. Dung dịch phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong thời gian 40 phút. 10 mL nước đá được bổ sung vào dung dịch phản ứng này, sau đó dung dịch này được chiết bằng etyl axetat (20 mL×2) và cloform (10 mL×5). Các pha hữu cơ được kết hợp và được cô. Các gốc thu được được hòa tan trong 4 mL đioxan và sau đó được bổ sung 2 mL nước, natri bicarbonat (49,2 mg, 0,586mmol) và 9-floren metyl cloformat (126 mg, 0,49mmol), và dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. 20 mL nước được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được chiết bằng etyl axetat (10 mL×3). Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hoà (20 mL), được làm khô trên khan natri sulfat và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm. Các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi khai triển C để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **5b** (48 mg, hiệu suất: 19%).

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

Bước 3

10-Xyclopropyl-1-(9*H*-floren-9-yl)-3,6-đioxo-2,9-dioxa-4,7-điazaundecan-11-oic axit **5c**

5b (20 mg, 0,038mmol) được hòa tan trong 4,5 mL hỗn hợp dung môi chứa tetrahyđrofuran và etyl axetat (V:V=2:1), sau đó là bổ sung paladi trên cacbon (12 mg, hàm lượng: 10%, khô). Dung dịch phản ứng này được sục hyđro ba lần và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng này được lọc qua xelit, và bánh lọc được rửa bằng etyl axetat. Phần lọc được cô để thu được sản phẩm nêu ở đề mục ở dạng thô **5c** (13 mg), sản phẩm này được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

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

Bước 4

(9*H*-Floren-9-yl)metyl (2-(((1-xyclopropyl-2-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-2-oxoetoxy)metyl)amino)-2-oxoetyl)carbamat **5d**

Hợp chất có công thức **1b** (10 mg, 18,8 μmol) được bổ sung vào bình phản ứng, sau đó là bổ sung 1 mL N,*N*-đimetylformamit. Dung dịch này được sục khí argon ba lần, và

được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. Một giọt trietylamin, hợp chất thô **5c** (13 mg, 30,6 μmol) và 4-(4,6-đimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (16,9 mg, 61,2 μmol) được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy trong bể đá trong thời gian 40 phút. 10 mL nước được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được chiết bằng etyl axetat (10 mL×3). Các pha hữu cơ được kết hợp. Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hoà (10 mL×2), được làm khô trên khan natri sulfat và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm. Các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển B để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **5d** (19 mg, hiệu suất: 73,6%).

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

Bước 5

2-((2-Aminoaxetamiđo)metoxy)-2-xyclopropyl-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)axetamit **5e**

Hợp chất có công thức **5d** (19 mg, 22,6 μmol) được hòa tan trong 2 mL điclometan, sau đó là bổ sung 1 mL đietylamin. Dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Dung dịch phản ứng này được cô dưới áp suất giảm. 1 mL toluen được bổ sung và dung dịch này được cô dưới áp suất giảm, việc này được lặp lại hai lần. 3 mL *n*-hexan được bổ sung vào các gốc để tạo huyền phù đặc, và dịch nổi trên bề mặt được lấy ra sau khi để yên. Chất rắn được giữ lại. Phần chất rắn còn lại này được cô dưới áp suất giảm bằng bơm dầu đến khi khô để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **5e** ở dạng thô (17 mg), sản phẩm này được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

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

Bước 6

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzyl-2-xyclopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **5-A**

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzyl-2-xyclopropyl-1-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **5-B**

Hợp chất thô **5e** (13,9 mg, 22,4 μmol) được hòa tan trong 0,6 mL *N*,*N*-đimetylformamit. Dung dịch này được sục khí argon ba lần, và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. **4g** (21,2 mg, 44,8 μmol) trong 0,3 mL *N*,*N*-đimetylformamit và 4-(4,6-đimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (18,5 mg, 67,3 μmol) được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy trong bể đá trong 10 phút. Bể đá được loại ra, và dung dịch phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong thời gian 1 giờ để thu được hợp chất **5**. Dung dịch phản ứng này được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện tách: cột:

XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; pha động: A-nước (10mmol NH_4OAc), B-axetonitril, građien rửa giải, tốc độ chảy: 18 mL/phút). Các phân đoạn tương ứng được thu gom, và được cô dưới áp suất giảm để thu được các sản phẩm nêu ở đề mục (2,4 mg, 1,7 mg).

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

Hợp chất 5-A với cấu hình đơn (có thời gian lưu ngắn hơn):

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,14 phút, độ tinh khiết: 85% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), 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 5-B với cấu hình đơn (có thời gian lưu dài hơn):

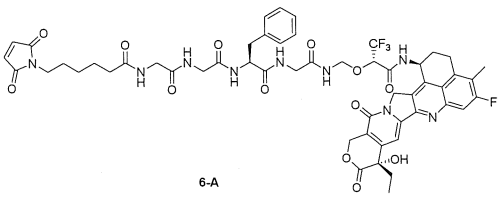
Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,16 phút, độ tinh khiết: 89% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

^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).

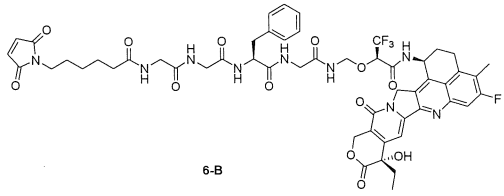
Ví dụ 6

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzyl-2-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)carbamoyl)-1,1,1-triflo-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **6-A**

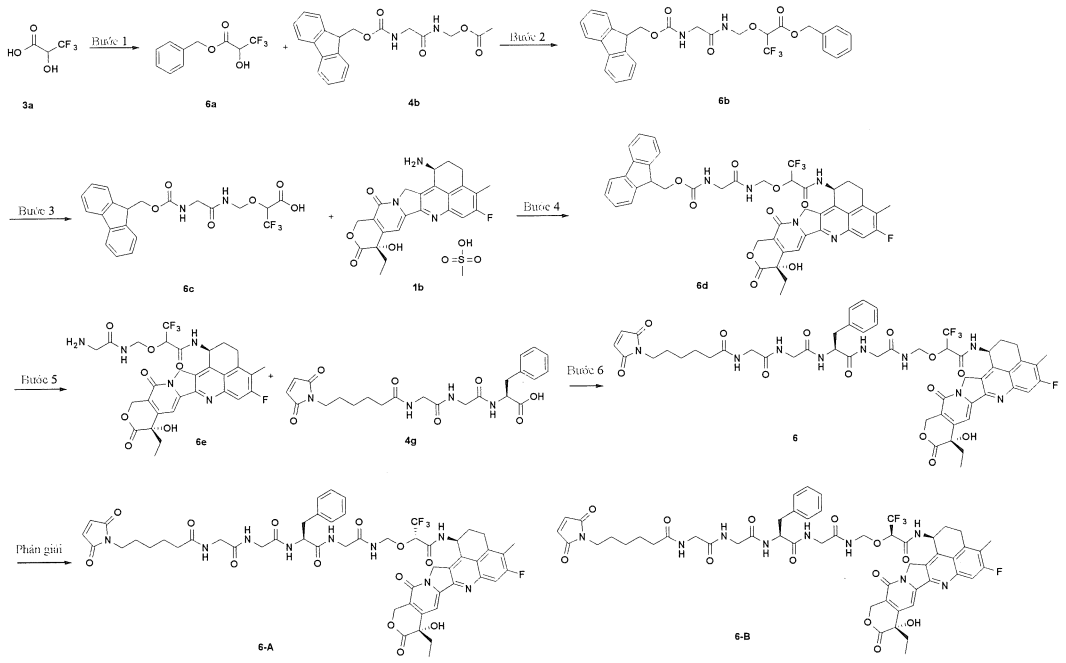
N-((2*R*,10*S*)-10-Benzyl-2-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)carbamoyl)-1,1,1-triflo-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **6-B**



6-A



6-B



Bước 1

Benzyl 3,3,3-triflo-2-hyđroxypropanoat **6a**

3a (1,80 g, 12,5mmol) được hòa tan trong 100 mL axetonitril, và sau đó được lần lượt bổ sung kali cacbonat (5,17 g, 37,5mmol), benzyl bromua (4,48 mL, 37,5mmol) và tetrabutylamoni iođua (231 mg, 0,63mmol). Dung dịch phản ứng này được đun nóng đến nhiệt độ 60°C và được khuấy trong thời gian 5 giờ. Dung dịch phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm, và các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi khai triển C để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **6a** (980 mg, hiệu suất: 33,5%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,43-7,36 (m, 5H), 5,34 (s, 2H), 4,53 (s, 1H), 3,44 (s, 1H).

Bước 2

Benzyl 1-(9*H*-floren-9-yl)-3,6-đioxo-10-(triflometyl)-2,9-dioxa-4,7-điazaundecan-11-oat **6b**

Hợp chất có công thức **4b** (63 mg, 0,17mmol) và **6a** (80 mg, 0,34mmol) được bổ sung vào bình phản ứng, sau đó là bổ sung 3 mL tetrahyđrofuran. Dung dịch phản ứng này được sục khí argon ba lần và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. Kali *tert*-butoxit (38 mg, 0,34mmol) được bổ sung và bể nước đá-nước được loại ra. Dung dịch phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong thời gian 20 phút. 10 mL nước đá được bổ sung vào dung dịch phản ứng này, sau đó dung dịch này được chiết bằng etyl axetat (20 mL×2) và cloform (10 mL×5). Các pha hữu cơ được kết hợp và được cô, và các gốc thu được được hòa tan trong 2 mL đioxan. 0,4 mL nước, natri bicarbonat (19 mg, 0,23mmol) và 9-floren metyl cloformat (49 mg, 0,19mmol) được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. 20 mL nước được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được chiết bằng etyl axetat (10 mL×3). Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hoà

(20 mL), được làm khô trên khan natri sulfat và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm. Các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi khai triển C để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **6b** (51 mg, hiệu suất: 55,3%).

MS m/z (ESI): 559,9 [M+18].

Bước 3

Axit 1-(9*H*-Floren-9-yl)-3,6-đioxo-10-(triflometyl)-2,9-dioxa-4,7-điazaundecan-11-oic **6c**

6b (15 mg, 0,28mmol) được hòa tan trong 3 mL hỗn hợp dung môi chứa tetrahyđrofuran và etyl axetat (V:V=2:1), sau đó là bổ sung paladi trên cacbon (15 mg, hàm lượng: 10%). Dung dịch phản ứng này được sục hyđro ba lần và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng này được lọc qua xelit, và bánh lọc được rửa bằng tetrahyđrofuran. Phần lọc được cô để thu được sản phẩm nêu ở đề mục ở dạng thô **6c** (13 mg).

MS m/z (ESI): 452,9 [M+1].

Bước 4

(9*H*-Floren-9-yl)metyl (2-((((3-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)amino)-1,1,1-triflo-3-oxopropan-2-yl)oxy)metyl)amino)-2-oxoetyl)carbamat **6d**

1b (10 mg, 18,8 μmol) được bổ sung vào bình phản ứng, sau đó là bổ sung 1 mL N,*N*-đimetylformamit. Dung dịch này được sục khí argon ba lần, và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. Một giọt trietylamin, **6c** (13 mg, 28,7 μmol) trong 0,5 mL *N*,*N*-đimetylformamit, và 4-(4,6-đimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (11 mg, 39,7 μmol) được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy trong bể đá trong thời gian 30 phút. 10 mL nước được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được chiết bằng etyl axetat (10 mL×3). Pha hữu cơ được kết hợp, được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hoà (10 mL×2), được làm khô trên khan natri sulfat và được lọc. Phần lọc được cô dưới áp suất giảm, và các gốc thu được được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển B để thu được sản phẩm nêu ở đề mục **6d** (16 mg, hiệu suất: 97,8%).

MS m/z (ESI): 870,0[M+1].

Bước 5

2-((2-Aminoaxetamiđo)metoxy)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)-3,3,3-triflopropanamit **6e**

6d (16 mg, 18,4 μmol) được hòa tan trong 0,6 mL điclometan, sau đó là bổ sung 0,3 mL đietylamin. Dung dịch phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Dung dịch phản ứng này được cô dưới áp suất giảm. 2 mL toluen được bổ sung và dung dịch này được cô dưới áp suất giảm, việc này được lặp lại hai lần. 3 mL *n*-hexan được bổ sung vào các gốc để tạo huyền phù đặc, và dịch nổi trên bề mặt được lấy ra sau khi để yên một thời gian để giữ được chất rắn này, việc này được lặp lại ba lần.

Phần chất rắn còn lại được cô dưới áp suất giảm bằng bơm dầu đến khi khô để thu được sản phẩm nêu ở đề mục ở dạng thô **6e** (12 mg), sản phẩm này được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

MS m/z (ESI): 647,9 [M+1].

Bước 6

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzyl-2-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)carbamoyl)-1,1,1-triflo-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **6-A**

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzyl-2-(((1*S*,9*S*)-9-etyl-5-flo-9-hyđroxy-4-metyl-10,13-đioxo-2,3,9,10,13,15-hexahyđro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pyrano[3',4':6,7]inđolizino[1,2-*b*]quinolin-1-yl)carbamoyl)-1,1,1-triflo-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexađecan-16-yl)-6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1*H*-pyrol-1-yl)hexanamit **6-B**

Hợp chất thô **6e** (12 mg, 18,5 μmol) được hòa tan trong 1,0 mL *N*,*N*-đimetylformamit. Dung dịch này được sục khí argon ba lần, và được làm lạnh ở nhiệt độ 0-5°C trong bể nước đá-nước. **4g** (14 mg, 29,6 μmol) trong 0,3 mL *N*,*N*-đimetylformamit, và 4-(4,6-đimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholin clorua (15 mg, 54,2 μmol) được bổ sung vào, và dung dịch phản ứng này được khuấy trong bể đá trong thời gian 30 phút. Bể đá được loại ra, và dung dịch phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong thời gian 1 giờ để thu được hợp chất **6**. Dung dịch phản ứng này được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (các điều kiện tách: cột: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; pha động: A-nước (10mmol NH_4OAc), B-axetonitril, građien rửa giải, tốc độ chảy: 18 mL/phút). Các phân đoạn tương ứng được thu gom, và được cô dưới áp suất giảm để thu được các sản phẩm nêu ở đề mục (2,7 mg, 2,6 mg).

MS m/z (ESI): 1102,0 [M+1].

Hợp chất với cấu hình đơn (có thời gian lưu ngắn hơn):

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,18 phút, độ tinh khiết: 91% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,97 (d, 1H), 8,85-8,76 (m, 1H), 8,37-8,27 (m, 1H), 8,12-8,02 (m, 1H), 8,02-7,95 (m, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,10 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,65-5,54 (m, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,37-5,25 (m, 3H), 5,23-5,13 (m, 1H), 4,81-4,68 (m, 2H), 4,51-4,41 (m, 1H), 3,78-3,45 (m, 6H), 3,21-3,13 (m, 1H), 3,02-2,93 (m, 1H), 2,77-2,63 (m, 2H), 2,45-2,29 (m, 3H), 2,24-2,05 (m, 3H), 2,04-1,93 (m, 5H), 1,90-1,75 (m, 2H), 1,52-1,38 (m, 4H), 0,90-0,78 (m, 5H).

Hợp chất với cấu hình đơn (có thời gian lưu dài hơn):

Phân tích UPLC: thời gian lưu: 1,23 phút, độ tinh khiết: 90% (cột: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, pha động: A-nước (5mmol NH_4OAc), B-axetonitril).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 9,05 (d, 1H), 8,97-8,88 (m, 1H), 8,35-8,27 (m, 1H), 8,11-8,03 (m, 1H), 8,02-7,95 (m, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,29-7,13 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,54 (s, 1H), 5,64-5,55 (m, 1H), 5,43 (s, 1H), 5,36-5,20 (m,

3H), 4,92-4,85 (m, 1H), 4,82-4,72 (m, 2H), 4,52-4,42 (m, 1H), 3,77-3,48 (m, 6H), 3,21-3,14 (m, 1H), 3,03-2,95 (m, 1H), 2,79-2,65 (m, 2H), 2,47-2,28 (m, 3H), 2,25-2,05 (m, 3H), 2,05-1,94 (m, 5H), 1,91-1,76 (m, 2H), 1,52-1,37 (m, 4H), 0,92-0,77 (m, 5H).

Ví dụ 7: Chuẩn bị các kháng thể liên quan và các protein phát hiện của nó

Ví dụ 7-1. Kháng nguyên B7H3 và protein phát hiện

Trình tự B7H3 ở người có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 được sử dụng làm khuôn mẫu đối với B7H3 theo sáng chế, và trình tự axit amin của kháng nguyên và protein phát hiện được bao gồm trong bản mô tả này được thiết kế. Trừ khi có quy định cụ thể, kháng nguyên B7H3 sau là B7H3 ở người.

1.1 Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ B7H3 ở người: B7H3 (SEQ ID NO: 1):

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFS
PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLR
LQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTIT
CSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGT
YSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPE
PGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQ
RVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCS
SYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTY
SCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFV*CWRK*
IKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

Lưu ý:

Phần có 2 gạch chân là peptit tín hiệu (Peptit tín hiệu: 1-28);

Phần có 1 gạch chân là miền ngoại bào B7H3 (Miền ngoại bào: 29-466), trong đó 29-139 là miền typ-V 1 giống Ig, và 145-238 là miền typ-C2 1 giống Ig; 243-357 là miền typ-V 2 giống Ig, và 363-456 là miền typ-C2 2 giống Ig;

Phần có đường chấm chân là phần thuộc miền xuyên màng (Miền xuyên màng: 467-487);

Phần in nghiêng là miền nhập bào (miền bào chất: 488-534).

1.2 trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của B7H3 ở chuột (SEQ ID NO: 2)

MLRGWGGPSVGVCVRTALGVLCLCLTGAVEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFS
PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYSNRTALFPDLLVQGNASL
RLQRVRVTDEGSYTCFVSIQDFDSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMV
TITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGA
NGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPLTFPPEALWVTVGLSVCLVVLLVALAF
V*CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGDGEGSKTALRPLKPSENKEDDGQEIA*

Lưu ý:

Phần có 2 gạch chân là peptit tín hiệu (Peptit tín hiệu: 1-28);

Phần có 1 gạch chân là miền ngoại bào B7H3 (Miền ngoại bào: 29-248), trong đó 29-139 là miền typ-V giống Ig, và 145-238 là miền typ-C2 giống Ig;

Phần có đường chấm chân là phần miền xuyên màng (Miền xuyên màng: 249-269);

Phần in nghiêng là miền nhập bào (Miền bào chất: 270-316).

1.3 Kháng nguyên B7H3 ở người để sàng lọc và phát hiện (SEQ ID NO: 3)

Nó là sản phẩm thương mại (R&D cat# 1949-B3-050/CF, được viết tắt là 2Ig-B7H3), và trình tự là như sau:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG
QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSL
QVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGN
VTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSP
TG-*HHHHHH*

Lưu ý:

Phần có 1 gạch chân là vùng ngoại bào B7H3;

Phần in nghiêng là chất đánh dấu His-tag.

1.4 Kháng nguyên B7H3 ở người để phát hiện (SEQ ID NO: 4)

Nó là sản phẩm thương mại (SinoBiological cat# 11188-H08H, được viết tắt là 4Ig-B7H3), và trình tự là như sau:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG
QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSL
QVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGN
VTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSP
TGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSF
TEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAA
VSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLT
GNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQ
PMT-*HHHHHH*

Lưu ý: Phần có 1 gạch chân là vùng ngoại bào B7H3;

Phần in nghiêng là chất đánh dấu His-tag.

1.5 Chuột kháng nguyên B7H3 để sàng lọc và phát hiện (SEQ ID NO: 5)

Nó là sản phẩm thương mại (R&D cat# 1397-B3-050/CF), và trình tự là như sau:

VEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGR
DQGSAYSNRTALFPDLLVQGNASLRLQRVRVTDEGSYTCFVSIQDFDSAAVSLQ
VAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNV
TTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPLTF
-*HHHHHH*

Lưu ý: Phần có 1 gạch chân là vùng ngoại bào B7H3;

Phần in nghiêng là chất đánh dấu His-tag.

Ví dụ 7-2. Chuẩn bị kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn

2.1 Sàng lọc trình tự dương tính

Các tế bào B được phân lập từ PBMC, lá lách và các mô hạch bạch huyết của người, và ARN được chiết để xây dựng thư viện kháng thể của thể thực khuẩn chuỗi đơn nguyên vẹn (dung lượng $3,2\times10^{10}$). Thư viện kháng thể của thể thực khuẩn chuỗi đơn

nguyên vẹn được xây dựng được đóng gói để tạo ra các hạt thể thực khuẩn, và sau đó được quay bằng phương pháp pha lỏng. Thể thực khuẩn được gắn kết với B7H3 được biotinyl hóa trong pha lỏng, và sau đó được tách bằng các hạt từ tính streptaviđin. Để thu được các trình tự dương tính mà có thể lần lượt liên kết chéo với B7H3 người (R&D cat# 1949-B3-050/CF) và B7H3 chuột (R&D cat# 1397-B3-050/CF), B7H3 người được biotinyl hóa và B7H3 chuột được biotinyl hóa được sử dụng để quay luân phiên một cách riêng biệt. 2 µg/mL B7H3 người được biotinyl hóa được sử dụng trong vòng quay thứ nhất. 2 µg/mL B7H3 chuột được biotinyl hóa được sử dụng trong vòng quay thứ hai. 0,5 µg/mL B7H3 người được biotinyl hóa được sử dụng trong vòng quay thứ ba. Sau khi ba vòng quay, 500 kháng thể đơn dòng được chọn và được đóng gói thành thể thực khuẩn để thử nghiệm ELISA thể thực khuẩn. Hoạt tính gắn kết của thể thực khuẩn đơn dòng với B7H3 người (R&D cat# 1949-B3-050/CF) và B7H3 chuột (R&D cat# 1397-B3-050/CF) được thử nghiệm một cách riêng biệt. Đĩa ELISA được phủ bằng 1 µg/mL B7H3 người hoặc B7H3 chuột, và được bổ sung dịch nổi trên bề mặt thể thực khuẩn được pha loãng với tỷ lệ 1:1 với chất đệm phong bế, và sau đó được phát hiện bằng HRP kháng M13. Các dòng vô tính có giá trị ELISA OD450 lớn hơn 0,5, và với các tỷ lệ giữa các giá trị ELISA OD450 để gắn kết với B7H3 người hoặc chuột và các giá trị ELISA OD450 để gắn kết với 1% BSA lớn hơn 2,0 được giải trình tự và trình tự cụ thể 1702 thu được (trong bản mô tả này, còn được gọi là h1702, các kháng thể h1702 và h1702DS được đề cập trong bản mô tả này là giống với h1702 và h1702-1 trong đơn yêu cầu cấp patent PCT/CN2018/081249, toàn bộ nội dung của đơn yêu cầu cấp patent PCT/CN2018/081249 được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

2.2 Xây dựng kháng thể nguyên vẹn đơn dòng

Trình tự cụ thể 1702 thu được bằng cách sàng lọc thư viện thể thực khuẩn, và quá trình xây dựng kháng thể nguyên vẹn đơn dòng của nó là như sau.

Dựa vào trình tự kháng thể chuỗi đơn thu được bằng cách giải trình tự, các đoạn mồi được thiết kế để xây dựng đoạn gen VH/VK/VL của mỗi trình tự kháng thể chuỗi đơn bằng PCR. Vùng thay đổi chuỗi nặng của 1702 thu được.

> trình tự biến đổi chuỗi nặng 1702

*QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAAS*GFIFSSSA*MHWVRQAPGKGLEWVAV*ISYDGSN*KYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC*ARSARLYASFDY*WGQGAL VTVSS*

SEQ ID NO: 6

> trình tự biến đổi chuỗi nhẹ 1702

*QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLS*SGSVSTSHY*PSWYQQTPGQAPRMLIY*NTN*TRSS GVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC*AIHVDRDIWV*FGGGTKLTVL*

SEQ ID NO: 7

Lưu ý: Thứ tự là FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Các phần in nghiêng trong trình tự là các trình tự FR, và phần có 1 gạch chân là các trình tự CDR.

Các trình tự CDR trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của mỗi kháng thể được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự vùng CDR của từng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Kháng thể	Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ	
1702	HCDR1	GFIFSSSA SEQ ID NO: 8	LCDR1	SGSVSTSHY SEQ ID NO: 11
	HCDR2	ISYDGSNK SEQ ID NO: 9	LCDR2	NTN SEQ ID NO: 12
	HCDR3	ARSARLYASFDY SEQ ID NO: 10	LCDR3	AIHVDRDIWV SEQ ID NO: 13

Sau đó vùng thay đổi kháng thể được tái tổ hợp đồng nhất với đoạn gen vùng ổn định (CH1-FC/CL) để xây dựng kháng thể nguyên vẹn VH-CH1-FC/VK-CL/VL-CL.

Trình tự kháng thể nguyên vẹn có chiều dài đầy đủ 1702 được xây dựng là như sau.

Trình tự axit amin chuỗi nặng (IgG1) 1702: (SEQ ID NO: **14**)

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYAS
FDYWGQGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ 1702: Lamada (SEQ ID NO: **15**)

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYN
TNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKL
TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG
VETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Để cải thiện hơn nữa độ ổn định của kháng thể, các amin axit của trình tự chuỗi nhẹ 1702 được gây đột biến. Đột biến đặc hiệu liên quan đến việc gốc axit amin thứ nhất Q ở đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:**15**) được thay thế bằng D, gốc axit amin thứ nhất S ở đầu tận cùng C đã được loại bỏ, để thu được kháng thể 1702DS đơn dòng ổn định hơn và đồng đều hơn (trong bản mô tả này, còn được gọi là h1702DS).

Trình tự chuỗi nặng của 1702DS sau khi sửa đổi đột biến là SEQ ID NO: 14, và trình tự axit amin chuỗi nhẹ như sau: (SEQ ID NO: 16).

Trình tự chuỗi nặng 1702DS sau khi cải biến đột biến là SEQ ID NO: **14**, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ là như sau: (SEQ ID NO: 16).

DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYN
TNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKL

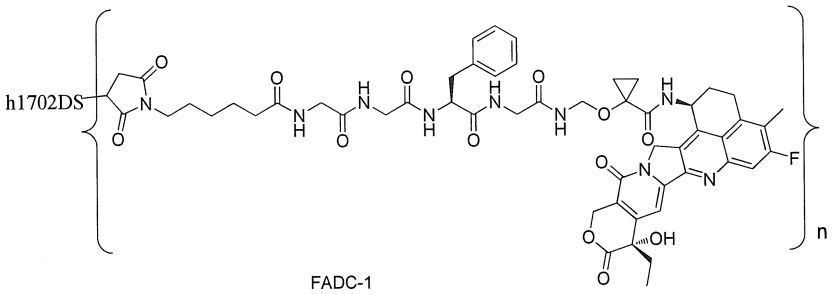
TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG
VETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

2.3 Biểu hiện và tinh chế kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn

Các plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể lần lượt được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293E với tỷ lệ 1,5:1. Dịch nổi trên bề mặt được thu gom sau 6 ngày, và các mảnh vụn được loại bỏ bằng cách ly tâm tốc độ cao, và việc tinh chế được thực hiện bằng cách cột protein A. Cột được rửa bằng PBS đến khi số đọc A280 giảm xuống mức cơ bản. Protein đích được rửa giải bằng dung môi rửa giải có tính axit với độ pH nằm trong khoảng 3,0-3,5, và được trung hòa bằng dung dịch Tris-HCl 1M (pH 8,0-9,0). Mẫu đã được rửa giải được cô một cách thích hợp và còn được tinh chế bằng sắc ký gel Superdex200 (GE) mà được làm cân bằng bởi PBS để loại bỏ kết tập. Pic monome được thu gom và được đóng gói để sử dụng sau này.

Ví dụ điều chế thể tiếp hợp kháng thể-dược chất B7H3

Ví dụ 8 ADC-1



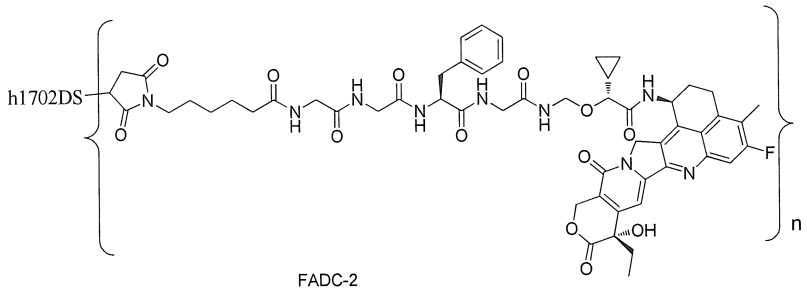
FADC-1

Dung dịch nước đã được bào chế chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (10 mM, 0,347 mL, 3,47 μmol) được bổ sung vào dung dịch nước đệm PBS chứa kháng thể 1702DS (dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5; 7,3 ml, 13,8 mg/ml, 0,681 μmol) ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ 25°C trong nồi cách thủy, và được pha loãng thành 14,0 ml. 3,3 mL dung dịch này được lấy để dùng cho phản ứng tiếp theo.

Hợp chất **4** (3,0mg, 2,75 μmol) được hòa tan trong 0,15 mL DMSO, và sau đó được bổ sung vào 3,3 mL dung dịch nêu trên. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng được khử muối và được tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với pH=6,5, chứa 0,001 M EDTA) để thu được dung dịch được đệm PBS của sản phẩm được lấy làm ví dụ ADC-1 có công thức FADC-1 (1,35 mg/mL, 13 mL), được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C.

Giá trị trung bình được tính toán bằng UV-HPLC: n=7,50.

Ví dụ 9 ADC-2



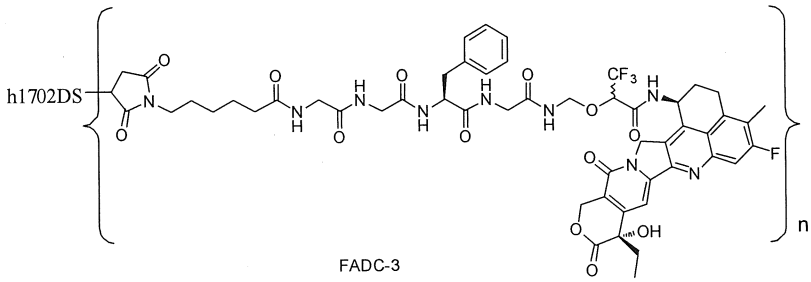
FADC-2

Dung dịch nước đã được bào chế chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (10 mM, 0,050 mL, 0,50 μmol) được bổ sung vào dung dịch nước đệm PBS chứa kháng thể 1702DS (dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5; 1,0 ml, 13,8 mg/ml, 0,093 μmol) ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ 25°C trong bể nước, và được pha loãng đến 2,0 ml. 1,15 mL dung dịch này được lấy để dùng cho phản ứng tiếp theo.

Hợp chất có công thức **5** có thời gian lưu ngắn hơn, hợp chất 5-A (1,29 mg, 1,02 μmol) được hòa tan trong 0,10 mL DMSO, và sau đó được bổ sung vào 1,15 mL dung dịch nêu trên. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được khử muối và được tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5, chứa 0,001 M EDTA) để thu được dung dịch được đệm PBS chứa sản phẩm được lấy làm ví dụ ADC-2 có công thức FADC-2 (2,63 mg/mL, 2,4 mL), được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C.

Giá trị trung bình được tính toán bằng UV-HPLC: n=7,24.

Ví dụ 10 ADC-3



FADC-3

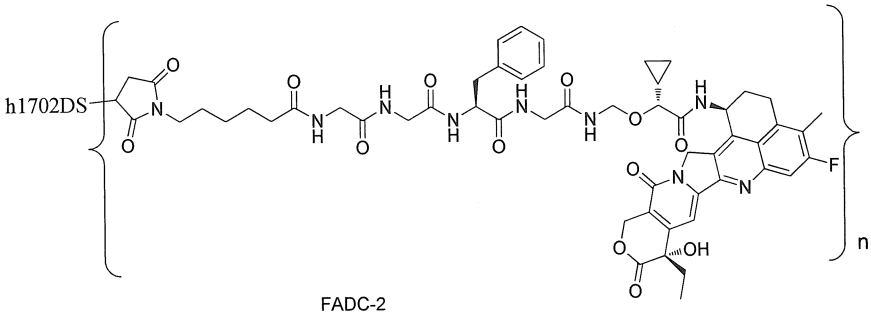
Dung dịch nước đã được bào chế chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (10 mM, 0,347 mL, 3,47 μmol) được bổ sung vào dung dịch nước đệm PBS chứa kháng thể 1702DS (dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5; 7,3 ml, 13,8 mg/ml, 0,681 μmol) ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ 25°C trong nồi cách thủy, và được pha loãng đến 14,0 ml. 3,3 mL dung dịch được lấy để dùng cho phản ứng tiếp theo.

Hợp chất **6** là hợp chất có thời gian lưu dài hơn (3,0 mg， 2,75 μmol) được hòa tan trong 0,15 mL DMSO, và sau đó được bổ sung vào 3,3 mL dung dịch nêu trên. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 25°C trong

thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được khử muối và được tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5, chứa 0,001 M EDTA) để thu được dung dịch được đệm PBS chứa sản phẩm được lấy làm ví dụ ADC-3 có công thức FADC-3 (1,28 mg/mL, 13 mL), được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C.

Giá trị trung bình được tính toán bằng UV-HPLC: n=7,58.

Ví dụ 11 ADC-4



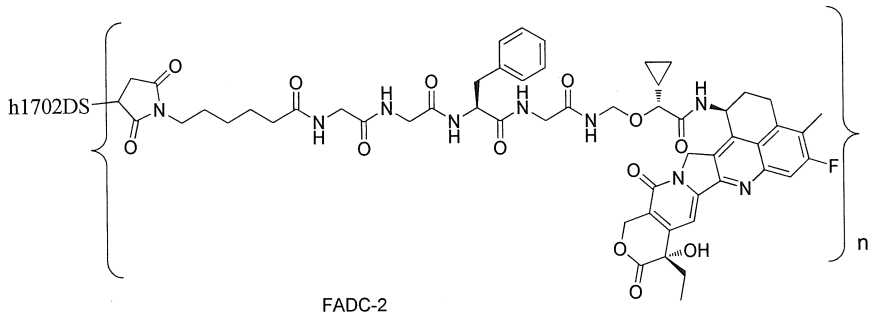
FADC-2

Dung dịch nước đã được bào chế chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) (10 mM, 73,7 µL, 740 nmol) được bổ sung vào dung dịch nước đệm PBS chứa kháng thể 1702DS (dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5; 10,0 mg/ml, 2,14 mL, 144,60 nmol) ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ 25°C trong bể nước.

Hợp chất 5 có thời gian lưu ngắn hơn, hợp chất **5-A** (3,0 mg, 2793 nmol) được hòa tan trong 150 µl of DMSO, và sau đó được bổ sung vào dung dịch nêu trên. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được khử muối và được tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: 0,05*M* dung dịch nước đệm PBS với độ pH=6,5, chứa 0,001 M EDTA) để thu được dung dịch được đệm PBS chứa sản phẩm được lấy làm ví dụ ADC-4 có công thức FADC-2 (1,28 mg/mL, 13,0 mL), được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C.

Giá trị trung bình được tính toán bằng UV-Vis: n=6,87.

Ví dụ 12 ADC-5



FADC-2

Dung dịch nước đã được bào chế chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) (10 mM,

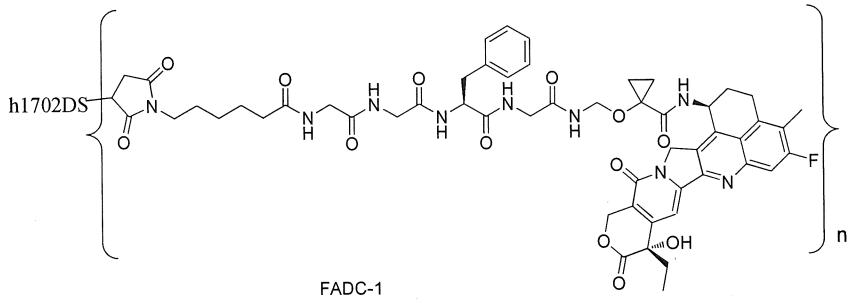
30,1 µL, 300 nmol) được bổ sung vào dung dịch nước đệm PBS chứa kháng thể 1702DS (dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,89 mL, 60,14 nmol) ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ 25°C trong bể nước.

Hợp chất 5 ó thời gian lưu ngắn hơn, hợp chất **5-A** (1,02 mg, 950 nmol) được hòa tan trong 100 µl of DMSO, và sau đó được bổ sung vào dung dịch nêu trên. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được khử muối và được tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: 0,05*M* dung dịch nước đệm PBS với độ pH=6,5, chứa 0,001 M EDTA) để thu được dung dịch được đệm PBS chứa sản phẩm được lấy làm ví dụ ADC-5 có công thức FADC-2 (1,94 mg/mL, 3,5 mL), được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C.

Giá trị trung bình được tính toán bằng UV-Vis: n=6,11.

Theo các quy trình phản ứng nêu trên và các phương tiện kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực này, các điều kiện phản ứng được điều chỉnh để thu được các sản phẩm được lấy làm ví dụ có công thức FADC-2 với các giá trị n lần lượt là 2,97 và 4,8: ADC-6 (n=2,97); ADC-7 (n=4,8).

Ví dụ 13 ADC-8



FADC-1

Dung dịch nước đã được bào chế chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) (10 mM, 30,1 µL, 300 nmol) được bổ sung vào dung dịch nước đệm PBS chứa kháng thể 1702DS (dung dịch nước được đệm 0,05M PBS với độ pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,89 mL, 60,14 nmol) ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ 25°C trong bể nước.

Hợp chất **4** (1,0 mg, 943 nmol) được hòa tan trong 100 µl DMSO, và sau đó được bổ sung vào dung dịch nêu trên. Dung dịch phản ứng này được đặt trong máy lắc cách thủy, và được lắc ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 3 giờ trước khi dừng phản ứng. Dung dịch phản ứng này được khử muối và được tinh chế bằng cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: 0,05*M* dung dịch nước đệm PBS với độ pH=6,5, chứa 0,001 M EDTA) để thu được dung dịch được đệm PBS chứa sản phẩm được lấy làm ví dụ ADC-8 có công thức FADC-1 (1,47 mg/mL, 4,5 mL), được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C.

Giá trị trung bình được tính toán bằng UV-Vis: n=6,33.

Thử nghiệm sinh học

Ví dụ thử nghiệm 1. Thử nghiệm Biacore đối với ái lực kháng thể

Ái lực phản ứng của kháng thể kháng B7H3 và B7H3-ADC với kháng nguyên 2Ig-B7H3 của người và kháng nguyên 4Ig-B7H3 của người được xác định bằng thiết bị Biacore, GE. Chip cảm biến sinh học Protein A (Cat.# 29127556, GE) được sử dụng để thu ái lực lượng nhất định kháng thể /ADC cần được thử nghiệm. Một loạt kháng nguyên 2Ig-B7H3 người (Cat.# 1949-B3-050/CF, R&D) và kháng nguyên 4Ig-B7H3 người đã được pha loãng (Cat.# 11188-H08H, Sino Biological) được cho chảy qua bề mặt của chip này. Tín hiệu phản ứng thời gian thực được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Biacore (Biacore T200, GE) để thu được các đường cong liên kết và phân ly. Sau khi hoàn thành mỗi chu trình phân ly, chip sinh học này được rửa và được tái sinh bằng dung dịch tái sinh glyxin-axit clohyđric (pH 1,5) (Cat.# BR-1003-54, GE). Chất đệm này được sử dụng trong thử nghiệm là dung dịch đệm HBS-EP (pH 7,4) (Cat.# BR-1001-88, GE).

Các dữ liệu thử nghiệm được làm khớp với phần mềm BIAđánh giá phiên bản 4.1 GE theo mô hình Langmuir (1:1) để thu được các giá trị ái lực. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Ái lực phản ứng giữa kháng thể h1702 và các kháng nguyên khác nhau (đơn vị: M)

Bảng 2. Ái lực phản ứng giữa kháng thể h1702 và các kháng nguyên khác nhau (đơn vị : M)

Kháng thể	2Ig-B7H3 người	4Ig-B7H3 người
h1702	7,97E-7	8,55E-9
ADC-2		7,55E-9

Kết luận: kháng thể h1702 có ái lực mạnh với các kháng nguyên. Đồng thời, thử nghiệm ái lực Biacore với 2Ig-B7H3 người và 4Ig-B7H3 người cho thấy rằng ái lực của ADC là tương tự như ái lực của kháng thể trần.

Ví dụ thử nghiệm 2. Thử nghiệm nhập bào *in vitro*

Trong thử nghiệm này, hiệu quả nhập bào của kháng thể được đánh giá dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang của kháng thể nhập bào. Kháng thể B7-H3 và IgG Fc người kháng APC (Biolegend, 409306) được trộn với tỷ lệ mol 1:2 và được ủ trên nước đá trong thời gian 15 phút. Hỗn hợp kháng thể này được ủ với 2×10^5 tế bào U87MG (u nguyên bào hình sao não người, Chinese Academy of Sciences cell bank, Catalog # TCHu138) trên nước đá trong thời gian 30 phút, và kháng thể dư được loại ra bằng cách rửa. Các tế bào được chuyển đến môi trường đã được làm ấm trước có nhiệt độ 37°C, và được ủ lần lượt ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 0, 15, 30, 60 và 120 phút. Các tế bào này được ly tâm và tái tạo huyền phù trong dung dịch rửa giải kháng thể (0,05M glyxin,

0,1M NaCl, độ pH = 2,45).

Sau khi ủ trong thời gian 7 phút ở nhiệt độ trong phòng, dung dịch rửa giải kháng thể được loại ra bằng cách rửa, và tín hiệu huỳnh quang nhập bào được đọc bằng cách sử dụng BD Verse (các kết quả được thể hiện trên Fig.1). Các kết quả này cho thấy rằng h1702 đã nhập bào một cách hiệu quả vào các tế bào sau khi gắn kết với các tế bào U87MG.

Ví dụ thử nghiệm 3. Đánh giá $T_{1/2}$ trên chuột SD

4 con chuột SD (được mua từ Shanghai JieSiJie Laboratory Animal Co.,Ltd., một nửa đực và một nửa cái) được duy trì trong chu kỳ sáng/tối được điều chỉnh ở 12/12 giờ, với nhiệt độ không đổi 24±3°C, độ ẩm 50-60%, và được cho tự do dùng thực phẩm và nước. Vào ngày thử nghiệm, chuột SD lần lượt được tiêm chất thử nghiệm là kháng thể B7H3/ADC vào tĩnh mạch đuôi với liều lượng 3 mg/kg và lượng tiêm 5 ml/kg.

Thời điểm để lấy máu: Vào ngày đầu tiên dùng, máu được lấy từ tĩnh mạch mắt ở thời điểm 5 phút, 8 h, 24 h (Ngày 2), Ngày 3, Ngày 5, Ngày 8, Ngày 11 và Ngày 15 sau khi tiêm, mỗi 200 µL (tương đương với 100 µL huyết thanh). Các mẫu máu thu gom được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian nửa giờ đến khi đông lại, và sau đó được ly tâm ở tốc độ 10.000×g ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút. Dịch nổi trên bề mặt được thu gom và ngay lập tức được lưu giữ ở nhiệt độ -80°C.

Nồng độ kháng thể B7H3 trong huyết thanh được đo bằng ELISA, và việc phân tích PK được thực hiện. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. $T_{1/2}$ của kháng thể B7H3 ở chuột SD

Chất thử nghiệm	Cách dùng	$T_{1/2}$ (trung bình±SD, giờ)
h1702	IV (3 mg/kg)	185±17

Các kết quả này đã cho thấy rằng thời gian bán hủy của h1702 theo sáng chế ở chuột là khoảng 185 giờ (7,7 ngày).

Ví dụ thử nghiệm 4. Độ ổn định hoá học của kháng thể B7H3

Cải biến hoá học sau khi chuẩn bị kháng thể là một trong những lý do phổ biến dẫn đến vấn đề ổn định của sản phẩm, cụ thể là việc cải biến bằng cách loại bỏ nhóm amin, oxy hoá hoặc đồng phân hóa ở mức độ cao đối với một số axit amin trong vùng CDR. Các cải biến này cần được tránh được hoặc được giảm. 500 µg kháng thể cần được thử nghiệm được hòa tan trong 500 µl PBS (pH 7,4), và được ngâm trong bể nước ở nhiệt độ 40°C. Các mẫu được lấy lần lượt ở ngày 0, 10 và 20 cho các thử nghiệm thủy phân bằng enzym. 100 µg mẫu được lấy ở các thời điểm khác nhau và được hòa tan trong 100 µl His-HCl 0,2 M (chất đệm histiđin hyđroclorua) và 8 M Gua-HCl (pH 6,0, chất đệm xitrullin hyđroclorua). 3 µl of 0,1 g/mL DTT (đithiotreitol) được bổ sung vào, và được ngâm trong bể nước ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ. Các mẫu được siêu lọc hai lần bằng

dung dịch His-HCl 0,02M (pH 6,0), và 3µL of 0,25 mg/mL trypsin (invitrogen, CAT# 25200-072) được bổ sung vào. Hỗn hợp được phân giải bằng enzym qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong bể nước. LC-MS được thực hiện bằng cách sử dụng Agilent 6530 Q-TOF, và các vị trí cải biến tiềm năng được phân tích bằng phổ khối (Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4). Các kết quả này đã cho thấy rằng kháng thể B7H3 h1702 theo sáng chế không có xu hướng tăng đáng kể đối với quá trình loại bỏ nhóm amit, oxy hoá hoặc dị hóa, cho thấy rằng kháng thể này có độ ổn định vật lý và hóa học tuyệt vời.

Bảng 4. Độ ổn định hoá học của các kháng thể khác nhau

Mẫu	Chuỗi nhẹ/chuỗi nặng	Vị trí/cải biến	Ngày 0	Ngày 10	Ngày 20
h1702	LC	M48/oxy hoá	2,82%	2,9%	2,83%
	HC	M34/oxy hoá	3,52%	3,46%	3,38%
		M83/oxy hoá	0,98%	1,01%	0,01%

Ví dụ thử nghiệm 5. Độ ổn định của kháng thể h1702DS

Độ ổn định của h1702 và h1702DS được thử nghiệm bằng phương pháp thử nghiệm SEC, phương pháp thử nghiệm CE-SDS không khử (pH 9,0) và phương pháp thử nghiệm IEX.

Thử nghiệm SEC: Máy sắc ký Waters e2695 và cột Xbridge BEH 200A SEC được sử dụng. 50 µg kháng thể được nạp vào, và được rửa giải bằng pha động PBS với građien không đổi.

Phương pháp CE-SDS NR:

Các mẫu được xử lý bằng cách sử dụng kit phân tích Beckman SDS-MW. 100 µg protein được bổ sung dung dịch đệm, và được đun nóng để làm biến tính. Dữ liệu được thu gom bằng cách sử dụng thiết bị điện di mao dẫn PA800.

Phương pháp IEX :

Máy sắc ký Waters Acquity H-Class và cột Thermo MAbPac SCX-10 được sử dụng. 50µg kháng thể được nạp vào, và građien tuyến tính được áp dụng, sử dụng CX-1 pH Gradient Buffer Kit làm pha động. Thu được tín hiệu tia cực tím ở bước sóng 280nm .

Bảng 5 So sánh độ ổn định của h1702 và h1702DS

	SEC	CE-SDS (pH9,0)	IEX
h1702	100%	71,21%	40,5%
h1702DS	100%	94,67%	86,21%

Ví dụ thử nghiệm 6: *In vitro* thử nghiệm tăng sinh tế bào

Trong thử nghiệm này, tác dụng ức chế của B7H3-ADC đến quá trình tăng sinh tế bào được đánh giá trên cơ sở IC_{50} bằng cách phát hiện hàm lượng ATP nhập bào.

Các tế bào U87MG (u nguyên bào hình sao não người, Chinese Academy of Sciences cell bank, Catalog # TCHu138), các tế bào Calu-6 (các tế bào ung thư phổi,

ATCC, Catalog # ATCC® HTB-56™), các tế bào Detroit562 (các tế bào caxinom yết hầu người, ATCC, Catalog #ATCC® CCL-138™) và các tế bào A498 (các tế bào ung thư thận, ATCC, Catalog #ATCC® HTB-44™) được nuôi cấy trong môi trường EMEM chứa 10% FBS, và được cho qua 2 đến 3 lần một tuần với tỷ lệ đi qua là 1:3 hoặc 1:6. Chuẩn bị môi trường EMEM: Môi trường MEM (GE, CAT# SH30024,01), NEAA (sigma, CAT# M7145-100ML) và dung dịch natri pyruvat (sigma, CAT# S8636-100ML).

A-375 (các tế bào ung thư hắc tố, ATCC, Catalog # ATCC® CRL-1619™) được nuôi cấy trong môi trường DMEM (GE, SH30243,01) chứa 10% FBS, và được cho qua 2 đến 3 lần một tuần với tỷ lệ đi qua 1:3 hoặc 1:6.

CHO-K1 (which không biểu hiện B7H3 người, ATCC, Catalog #ATCC® CCL-61™) được nuôi cấy trong F12 (Gibco, 11765-054) môi trường chứa 10% FBS, và được cho qua 2 to 3 lần a week with a tỷ lệ đi qua of 1:4 hoặc 1:6.

Để đi qua, môi trường được loại bỏ và lớp tế bào được rửa bằng 5 mL trypsin 0,25%, sau đó trypsin này được loại ra và các tế bào này được phân hủy trong thời gian 3 đến 5 phút trong máy ủ. Sau đó các tế bào này được tái tạo huyền phù bằng cách bổ sung môi trường mới. Các tế bào này được đếm, và huyền phù tế bào được bào chế để có được mật độ tương ứng (các tế bào U87MG: 500 tế bào/lỗ; các tế bàoA-498: 500 tế bào/lỗ; các tế bào A-375: 300 tế bào/lỗ; các tế bào Calu-6: 800 tế bào/lỗ; các tế bào detroit562 : 2000 tế bào/lỗ; và tế bào CHO-K1 : 500 tế bào/lỗ).

180 µL huyền phù tế bào được thêm vào đĩa 96 giếng, và 200 µL môi trường được thêm vào ngoại vi của đĩa 96 giếng. Đĩa được ủ trong 24 giờ trong tủ ấm (37 ° C, 5% CO2).

180 µL huyền phù tế bào được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ, và 200 µL môi trường được bổ sung vào phần ngoại vi của đĩa có 96 lỗ. Đĩa này được ủ trong thời gian 24 giờ trong máy ủ (37°C, 5% CO_2).

Các mẫu cần được thử nghiệm được pha loãng với PBS hoặc DMSO ở tỷ lệ gấp 3 lần đến 9 nồng độ (nồng độ ban đầu của mỗi ADC là 500 nM). Các mẫu này được bổ sung vào đĩa, đĩa này được ủ trong thời gian 6 ngày trong tủ ấm (37°C, 5% CO_2). 90 µl chất phản ứng CellTiter-Glo được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ, và đĩa này được để yên trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Giá trị tín hiệu phát quang hóa học được ghi kết quả trên Victor3, và dữ liệu này được xử lý bằng phần mềm GraphPad. Giá trị IC50 đo được được thể hiện trong Bảng 6 và các hình vẽ từ Fig.2A đến 2F.

Bảng 6. Tác dụng ức chế của ADC theo sáng chế đến quá trình tăng sinh tế bào

	A498	Calu-6	U87	A375	Detroit562	CHOK1
ADC-2	418,9*	70,6	49,1	33,3	31,6	>500
ADC-3	13,1	1,91	3,78	1,51	1,89	36,8
ADC-1	196,6	26,54	29	23,72	26,9	>500

* Đơn vị là nM.

Ví dụ thử nghiệm 7: Đánh giá hiệu quả của ADC theo sáng chế đến khối u dị ghép U87MG u nguyên bào hình sao não người ở chuột trụi lông.

I. Mục đích thử nghiệm

BALB/c chuột trụi lông được sử dụng làm động vật thử nghiệm để đánh giá tác dụng của hợp chất ADC theo sáng chế đến khối u dị ghép U87MG u nguyên bào hình sao não người ở chuột trụi lông.

II. Thuốc và vật liệu thử nghiệm

1. Thuốc thử nghiệm

ADC-5 (1mpk, 3mpk)

ADC-8 (1mpk, 3mpk)

Mẫu trắng: dung dịch đệm PBS (pH 7,4)

2. Phương pháp bào chế: Dung dịch đệm PBS (pH 7,4).

3. Động vật thử nghiệm

Chuột trụi lông BALB/c (SPF, cái), được mua từ Shanghai JieSiJie Laboratory Animal Co.,Ltd.

III. Quy trình thử nghiệm

Chuột trụi lông BALB/c (cái, 6 đến 7 tuần tuổi) để thử nghiệm được cấy dưới da các tế bào U87MG u nguyên bào hình sao ở não người (như được xác định ở trên đây). Vào ngày 10 sau khi cấy, các con vật này được phân nhóm ngẫu nhiên thành 8 con mỗi nhóm (D0), và thuốc được cung cấp bằng cách tiêm trong màng bụng (IP) mỗi tuần một lần, trong 3 lần. Thể tích khối u và thể trọng được đo 2 đến 3 lần một tuần, và dữ liệu được ghi lại. Công thức tính thể tích khối u (V) là như sau:

$V=1/2\times a\times b^2$

trong đó:

a và b lần lượt là chiều dài và chiều rộng.

Thể tích tương đối (RTV)=V_T/V_0

Mức độ ức chế khối u (%)=$(C_{RTV}-T_{RTV})/C_{RTV}$ (%)

trong đó V_0 và V_T lần lượt là thể tích khối u khi bắt đầu thử nghiệm và khi kết thúc thử nghiệm. C_{RTV} và T_{RTV} lần lượt là thể tích khối u tương đối của nhóm đối chứng (mẫu trắng) và nhóm thử nghiệm khi kết thúc thử nghiệm.

IV. Các kết quả thử nghiệm

Việc cung cấp bằng cách tiêm trong màng bụng (IP) được tiến hành mỗi tuần một lần, trong 3 lần. Vào ngày 18 quan sát, mức độ ức chế khối u của ADC-8 1mpk đạt 39,22% ($P<0,01$); mức độ ức chế khối u của ADC-8 3mpk đạt 80,24% ($P<0.0001$); mức độ ức chế khối u của ADC-5 1mpk đạt 27,53% ($P<0,05$); và mức độ ức chế khối u của ADC-5 3mpk đạt 55,88% ($P<0.0001$). Vào ngày 22 (D22) sự quan sát, mức độ ức chế khối u của mỗi nhóm dùng được cải thiện hơn nữa, mức độ ức chế khối u của ADC-8 1mpk đạt 47,7% ($P<0.0001$); mức độ ức chế khối u của ADC-8 3mpk đạt 89,8% ($P<0.0001$); mức độ ức chế khối u của ADC-5 1mpk đạt 40,6% ($P<0.0001$); và mức độ ức chế khối u của ADC-5 3mpk đạt 63,3% ($P<0.0001$).

Trong khi dùng, các con vật trong mỗi nhóm thể hiện thể trọng bình thường, cho thấy rằng ADC không có các tác dụng phụ rõ rệt. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 7 và Fig.3. Các kháng thể được thử nghiệm có thể ức chế một cách hiệu quả sự phát triển của khối u dị ghép U87MG trong ở chuột trụi lông mang khối u này, theo cách phụ thuộc liều lượng.

Bảng 7. Tác dụng của ADC theo sáng chế đến khối u dị ghép U87MG ở chuột trụi lông mang khối u (D22)

Nhóm	Thể tích khối u trung bình (mm^3)						Thể tích khối u tương đối				Mức độ ức chế khối u (%)	
	D0	SEM	D18	SEM	D22	SEM	D18	SEM	D22	SEM	D18	D22
Đối chứng mẫu trắng	167	18	2041	288	2907	328	12,01	0,97	17,76	1,63	-	-
ADC-8 1mpk	168	18	1264	222	1599	271	7,30	0,91	9,19	0,99	39,22**	47,7***
ADC-8 3mpk	168	17	409	73	448	89	2,37	0,32	2,55	0,37	80,24***	89,8***
ADC-5 1mpk	168	16	1397	81	1795	111	8,71	0,70	11,25	1,02	27,53*	40,6***
ADC-5 3mpk	168	16	842	42	1172	80	5,30	0,42	7,55	0,95	55,88***	63,3***

so với mẫu trắng: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, ***$p<0,001$

Ví dụ thử nghiệm 8: Đánh giá hiệu quả của ADC theo sáng chế đến khối u dị ghép Detroit 562 tế bào di căn ung thư biểu mô hầu họng ở người ở chuột trụi lông

I. Mục đích thử nghiệm

Chuột trụi lông BALB/c được sử dụng làm động vật thử nghiệm để đánh giá tác dụng của hợp chất ADC của sáng chế đến khối u dị ghép Detroit 562 tế bào di căn ung thư biểu mô hầu họng ở người ở chuột trụi lông

II. Thuốc và vật liệu thử nghiệm

1. Thuốc thử nghiệm

ADC-1 (1mpk, 3mpk)

ADC-2 (1mpk, 3mpk)

Đối chứng âm ADC (3mpk): thể tiếp hợp phối tử-độc tố được tạo ra bằng cách liên hợp đích không phải là B7H3 với hợp chất so sánh (Ví dụ 58 trong đơn yêu cầu cấp patent "CN104755494A").

2. Phương pháp bào chế: tất cả thuốc đều được pha loãng và được bào chế với PBS.

3. Các con vật thử nghiệm

Chuột trụi lôngBALB/c, được mua từ Changzhou Cavens Laboratory Animal Co.,Ltd.

III. Quy trình thử nghiệm

Chuột trụi lông BALB/c (cái, 6 đến 7 tuần tuổi) để thử nghiệm được cấy dưới da các tế bào Detroit 562 tế bào di căn ung thư biểu mô hầu họng ở người. Vào ngày 10 sau khi cấy, các con vật này được phân nhóm ngẫu nhiên thành với 8 con mỗi nhóm (D0), và thuốc được cung cấp bằng cách tiêm trong màng bụng (IP) mỗi tuần một lần, trong 3 lần. Thể tích khối u và thể trọng được đo 2 đến 3 lần một tuâng, và dữ liệu được ghi lại. Công thức tính thể tích khối u (V) là như sau:

$V = 1/2 \times a \times b^2$

trong đó:

a và b lần lượt là chiều dài và chiều rộng.

Thể tích tương đối (RTV)=V_T/V_0

Mức độ ức chế khối u (%)=$(C_{RTV}-T_{RTV})/C_{RTV}$ (%)

trong đó V_0 và V_T lần lượt là thể tích khối u khi bắt đầu thử nghiệm và khi kết thúc thử nghiệm. C_{RTV} và T_{RTV} lần lượt là thể tích khối u tương đối của nhóm đối chứng (Đối chứng âm) và thử nghiệm nhóm khi kết thúc thử nghiệm.

IV. Các kết quả thử nghiệm

Việc cho dùng bằng cách tiêm trong màng bụng (IP) được tiến hành mỗi tuần một lần, trong 3 lần. Vào ngày 28 quan sát, mức độ ức chế khối u của ADC-1 1mg/kg (1mpk) đạt 40,85%; mức độ ức chế khối u của ADC-1 3mg/kg (3mpk) đạt 62,55% ($P<0,05$); mức độ ức chế khối u của ADC-2 1mg/kg (1mpk) đạt 44,26%; và mức độ ức chế khối u của ADC-2 3mg/kg (3mpk) đạt 72,27% ($P<0,01$).

Trong khi dùng, các con vật trong mỗi nhóm thể hiện thể trọng bình thường, cho thấy rằng ADC không có các tác dụng phụ rõ rệt. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 8 và Fig.4. Các kháng thể được thử nghiệm có thể ức chế một cách hiệu quả sự phát triển của khối u dị ghép Detroit 562 ở chuột trụi lông mang khối u này, và thể hiện theo cách phụ thuộc liều lượng.

Bảng 8. Tác dụng của ADC theo sáng chế đến khối u dị ghép Detroit 562 ở chuột trụi lông mang khối u này (D28)

Nhóm	Thể tích khối u trung bình (mm^3)		Thể tích khối u trung bình (mm^3)		Thể tích khối u tương đối		Mức độ ức chế khối u (%) vào ngày 28
	Ngày 0	SEM	Ngày 28	SEM	Ngày 28	SEM	
Đối chứng âm	182,70	6,79	1317,99	223,20	7,47	1,46	-

ADC-1 1mpk	182,46	6,45	784,30	136,27	4,42	0,80	40,85
ADC-1 3mpk	182,60	6,38	501,07	123,58	2,80	0,68	62,55*
ADC-2 1mpk	182,65	6,53	738,73	152,08	4,16	0,87	44,26
ADC-2 3mpk	182,59	6,50	381,48	105,76	2,07	0,58	72,27**

Ví dụ thử nghiệm 9: Sự tăng sinh tế bào *in vitro* của ADC với các lượng thuốc khác nhau

Hiệu quả của các hợp chất ADC có công thức FADC-2, ADC-4 (n=6,87), ADC-6 (n=2,97) và ADC-7 (n=4,8) được xác định trong thử nghiệm tăng sinh tế bào *in vitro* theo các phương pháp thử nghiệm giống như Ví dụ thử nghiệm 6.

Giá trị IC_{50} đo được và mức độ ức chế tối đa được thể hiện trong Bảng 9 và các hình vẽ Fig. 5A, 5B và 5C. FADC-2 với các giá trị DAR khác nhau cho thấy tác dụng ức chế tăng sinh tế bào, và tác dụng ức chế là tương quan tỷ lệ thuận với giá trị DAR, trong khi kháng thể trần cho thấy không có tác dụng ức chế tăng sinh tế bào.

Bảng 9

ADC	Detroit562		Calu-6 (như được xác định ở trên đây)		CHOK1 (như được xác định ở trên đây)	
	IC50 (nM)	Mức độ ức chế tối đa (%)	IC50 (nM)	Mức độ ức chế tối đa (%)	IC50 (nM)	Mức độ ức chế tối đa (%)
ADC-6	80,4	81,59	321,5	64,60	>500	2,15
ADC-7	38,9	87,45	148,1	77,62	>500	-2,05
ADC-4	15,9	94,64	53,6	84,44	>500	9,09
h1702DS	>500	-2,77	>500	0,99	>500	12,62

Ví dụ thử nghiệm 10: Độ ổn định của huyết tương

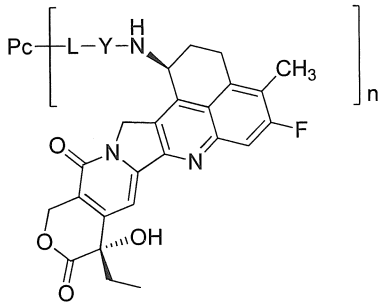
Mẫu ADC-4 lần lượt được trộn đều với huyết tương người, huyết tương khỉ (Shanghai Medicilon Inc.) và dung dịch BSA (Sigma) PBS 1% (Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.) ở nồng độ cuối 100 µg/ml, và được lọc để khử trùng. Hỗn hợp này được ủ trong bể nước ở nhiệt độ 37°C, và ngày bắt đầu ủ được ghi nhận là Ngày 0. Các mẫu được thu gom vào Ngày 7, Ngày 14 và Ngày 21 để phát hiện độc tố tự do.

Các mẫu thu được ở các thời điểm khác nhau được làm lạnh ở nhiệt độ nhiệt độ trong phòng, và được trộn đều bằng máy tạo xoáy. 25 µl mẫu được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ. 50 µL dung dịch làm việc chuẩn nội (100 ng/mL camptothexin trong axetonitril) và 150 µl axetonitril được bổ sung vào. Dung dịch này được tạo xoáy trong thời gian 5 phút, và được ly tâm trong 10 phút (4000 vòng/phút). 5 µl dung dịch này được lấy ra để phân tích LC/MS/MS (Applied Biosystems, Inc., USA).

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 6. ADC-4 là khá ổn định trong huyết tương người, huyết tương khỉ và dung dịch BSA PBS 1%. Tốc độ giải phóng độc tố tự do không quá 2%, và trở nên ổn định vào ngày 14.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó:



(Pc-L-Y-Dr)

trong đó:

Y được chọn từ nhóm bao gồm -O-(CR^aR^b)$_m$-CR^1R^2-C(O)-;

R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, nguyên tử đơteri, halogen, C_{1-6} alkyl,

R^1 là C_{1-6} haloalkyl, hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, C_{1-6} haloalkyl, C_{3-6} xycloalkyl;

hoặc, R^1 và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành C_{3-6} xycloalkyl;

m là 0 hoặc 1;

n nằm trong khoảng từ 1 đến 10;

L là đơn vị liên kết;

Pc là kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

các chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, 9 và 10; và

các chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 11, 12 và 13.

2. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó vùng FR của chuỗi nhẹ trên vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có nguồn gốc từ trình tự chuỗi nhẹ dòng mầm ở người hoặc trình tự đột biến của nó, và/hoặc vùng FR của chuỗi nặng trên vùng biến đổi chuỗi nặng có nguồn gốc từ trình tự chuỗi nặng dòng mầm ở người hoặc trình tự đột biến của nó.

3. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 7.

4. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng B7H3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng ổn định kháng thể; vùng ổn định chuỗi nặng này của vùng ổn định kháng thể có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người, vùng ổn định chuỗi nhẹ này của vùng ổn định kháng thể có nguồn gốc từ chuỗi κ, λ kháng thể người.

5. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 4, trong đó, trình tự axit amin của vùng ổn định chuỗi nặng có nguồn gốc từ IgG1 người.

6. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó Pc là kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó kháng thể có chiều dài đầy đủ này được chọn từ nhóm bao gồm:

kháng thể h1702 bao gồm trình tự chuỗi nặng có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và trình tự chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 15, và

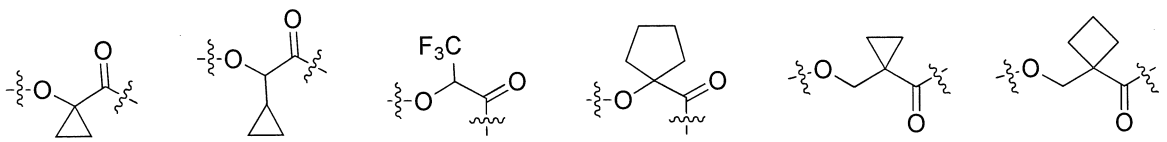
kháng thể h1702DS bao gồm trình tự chuỗi nặng có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và trình tự chuỗi nhẹ có các trình tự axit amin SEQ ID NO: 16.

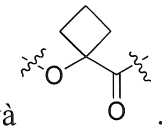
7. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó đoạn gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')2, các kháng thể chuỗi đơn (scFv), các vùng V đã được đime hóa (kháng thể kép), các vùng V đã được làm ổn định đisulfua (dsFv), và các đoạn gắn kết kháng nguyên của các peptit chứa các CDR.

8. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó n nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

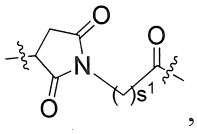
9. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 8, trong đó n nằm trong khoảng từ 5 đến 9.

10. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó Y được chọn từ nhóm bao gồm:



và  .

11. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, trong đó đơn vị liên kết -L- là $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

L^1 là  , và s^1 là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 8;

L^2 là liên kết hoá học;

L^3 là gốc tetrapeptit;

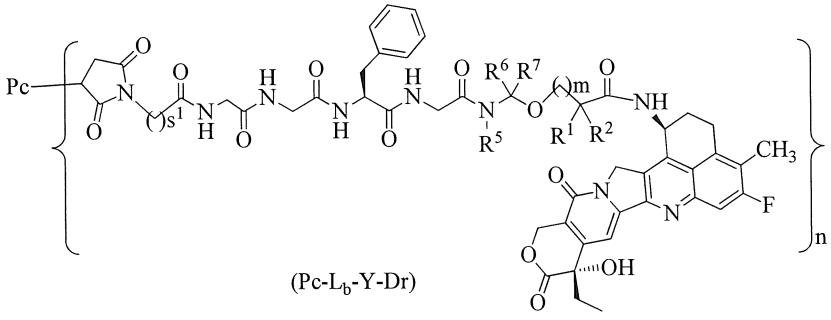
L^4 là $-NR^5(CR^6R^7)t-$, R^5, R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc này độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro và C_{1-6} alkyl, và t là 1 hoặc 2;

đầu tận cùng L^1 của đơn vị liên kết -L- được nối với Pc, và đầu tận cùng L^4 của đơn vị liên kết -L- được nối với Y.

12. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 11, trong đó gốc tetrapeptit của L^3 là gốc axit amin được cấu thành bởi các axit amin được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrulin, serin, axit glutamic và axit aspartic.

13. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 12, trong đó gốc tetrapeptit của L^3 là gốc tetrapeptit của GGFG.

14. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 13, trong đó thể tiếp hợp này là thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức ($Pc-L_b-Y-Dr$) hoặc muối dược dụng:



($Pc-L_b-Y-Dr$)

trong đó:

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

R^1 là C_{1-6} haloalkyl, hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, C_{1-6} haloalkyl, C_{3-6} xycloalkyl;

hoặc, R^1 và R^2 cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành C_{3-6}

xycloalkyl;

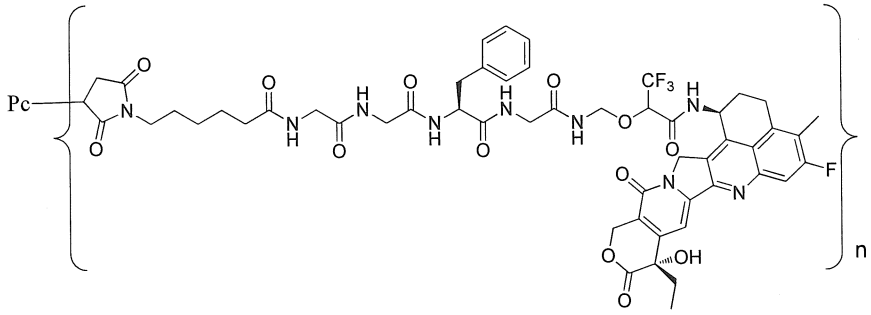
m là 0 hoặc 1;

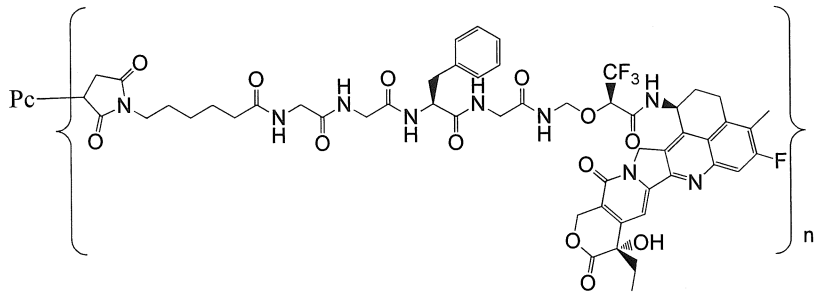
n nằm trong khoảng từ 1 đến 10;

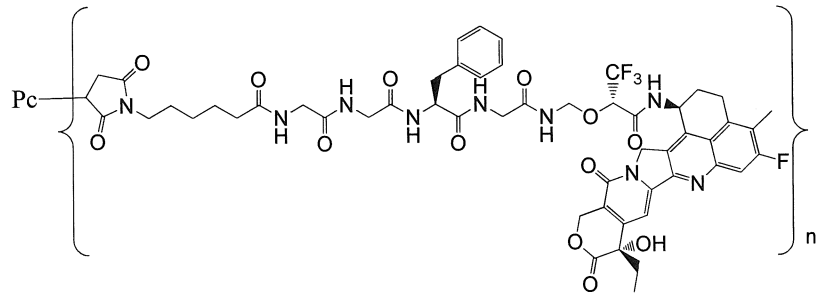
R^5, R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hyđro, C_{1-6} alkyl;

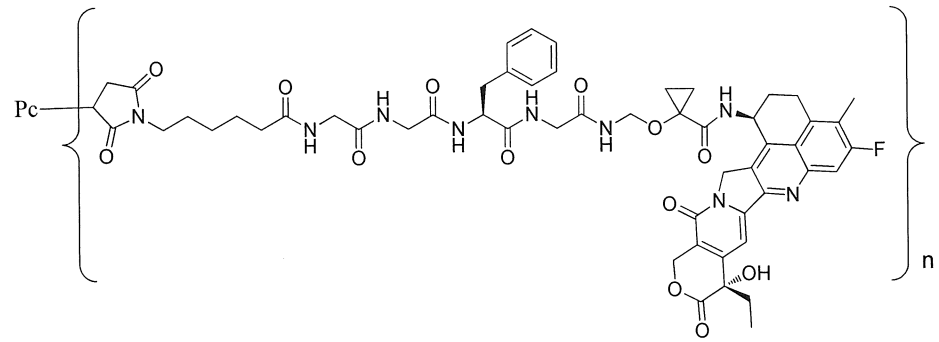
Pc là như được xác định trong điểm 1.

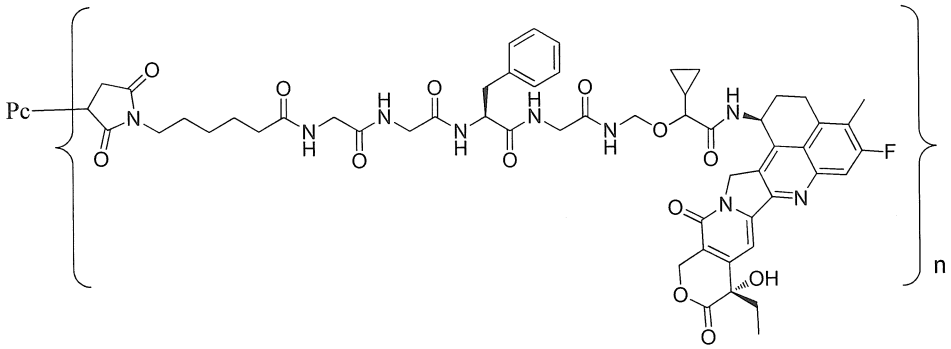
15. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, được chọn từ nhóm bao gồm:

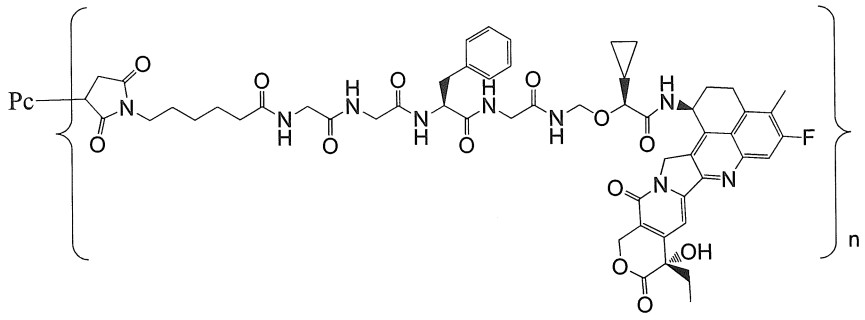


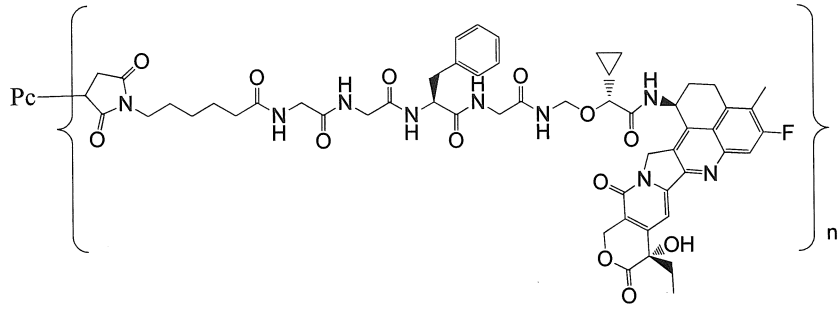


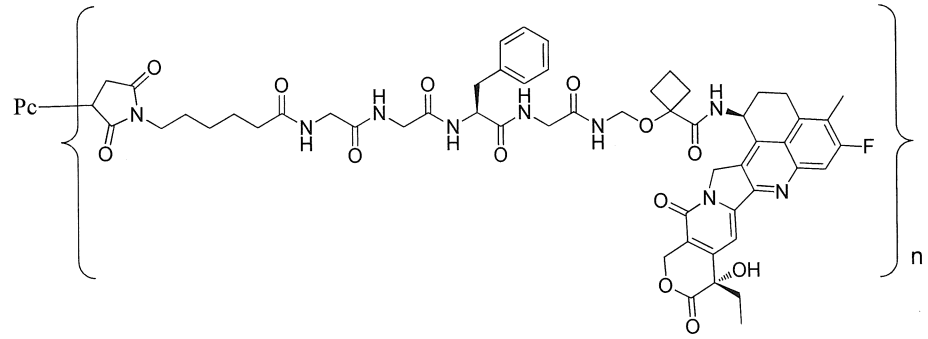


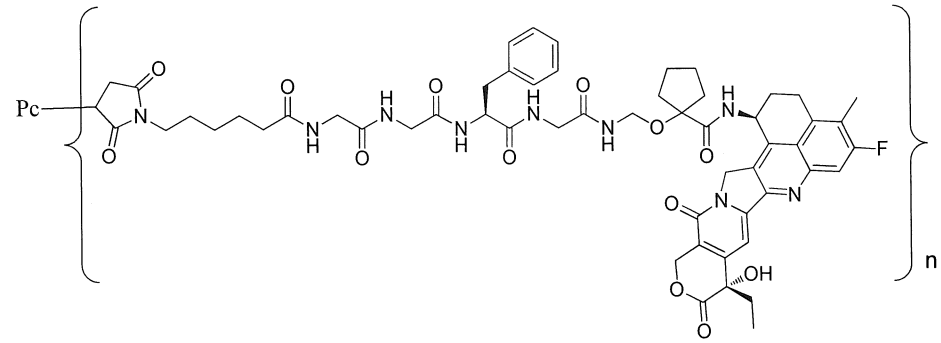


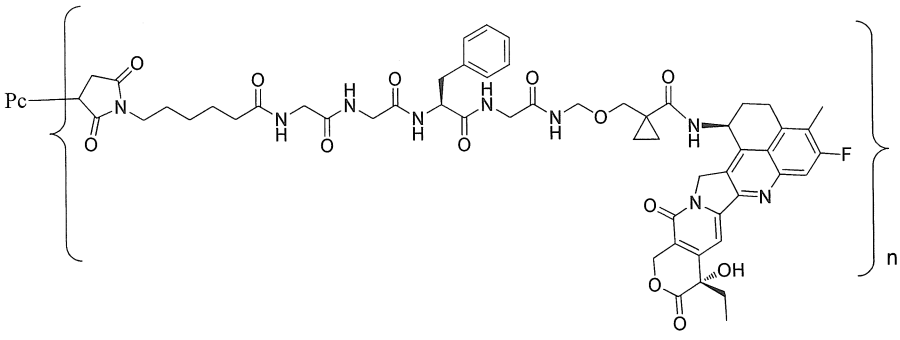

Pc
n


Pc
n

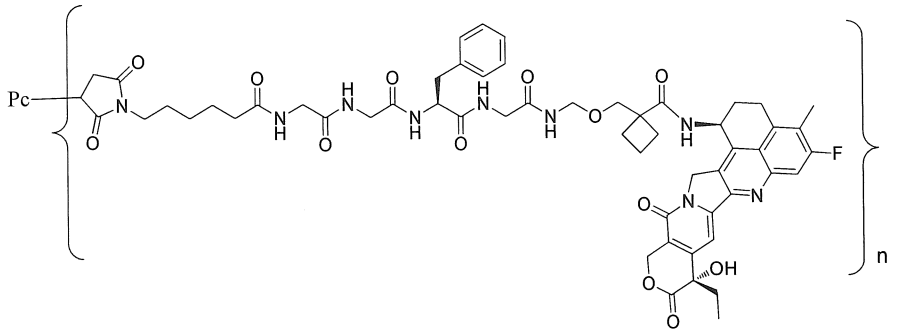

Pc
n


Pc
n


Pc
n

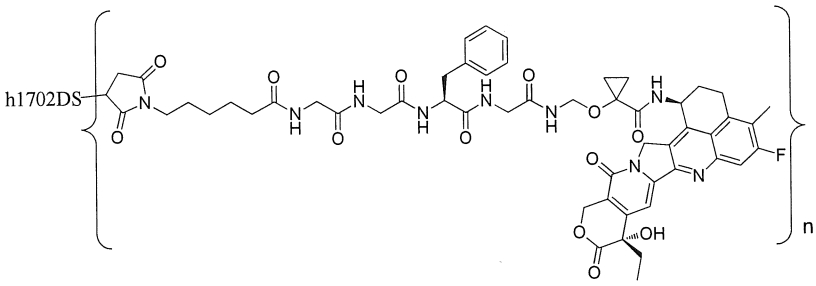


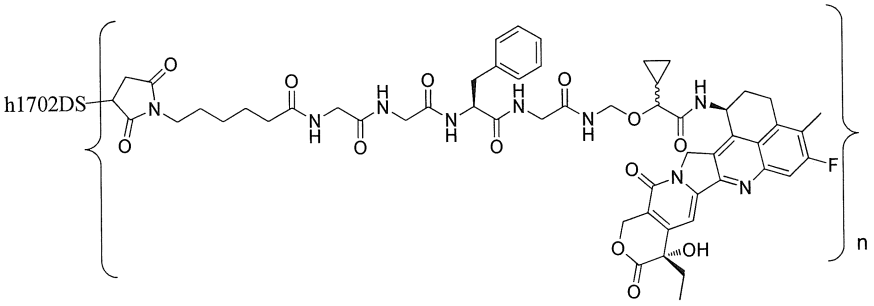
và

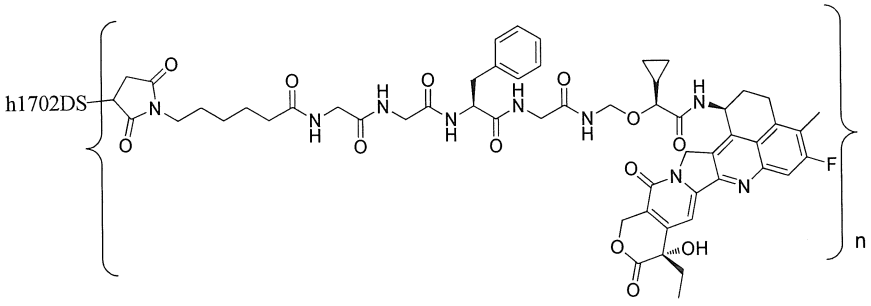


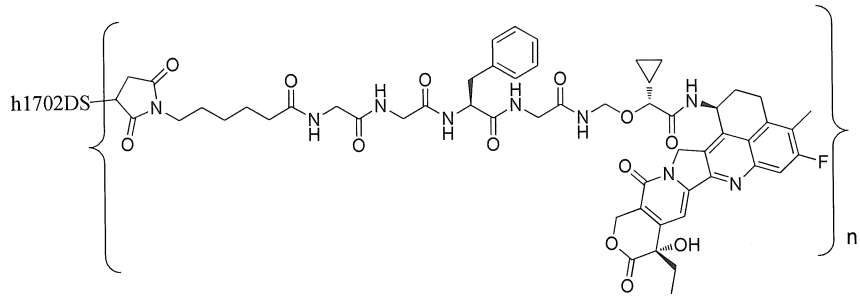
trong đó Pc và n là như được xác định trong điểm 1.

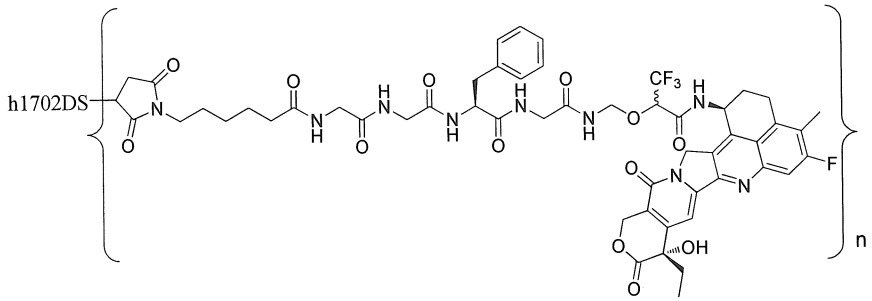
16. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức Pc-L-Y-Dr hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 1, được chọn từ nhóm bao gồm:

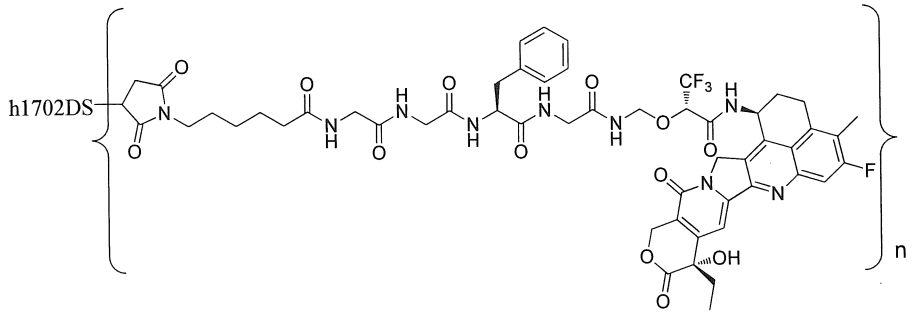




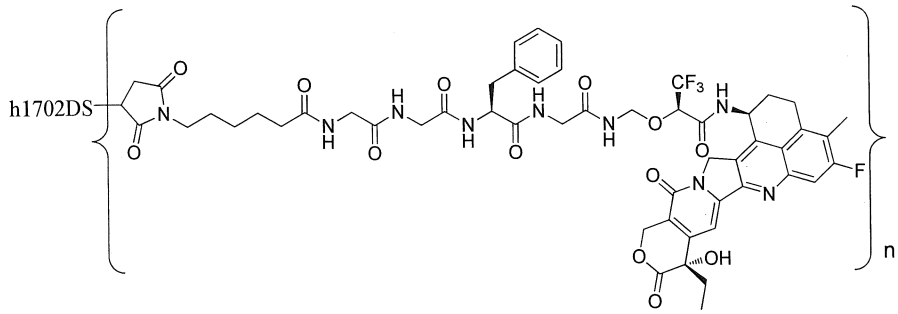








và



trong đó, n là như được xác định trong điểm 1.

17. Dược phẩm chứa thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 16, và một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Fig. 1

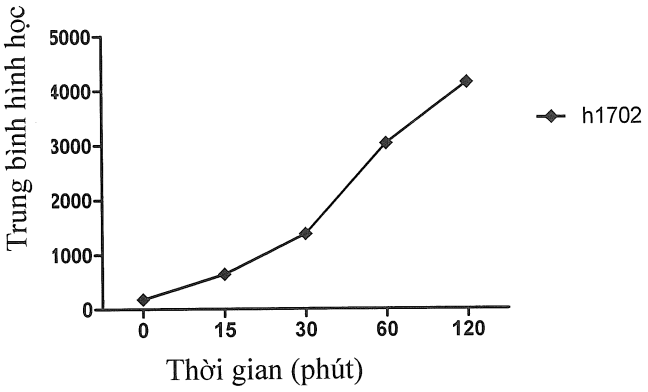


Fig. 2A

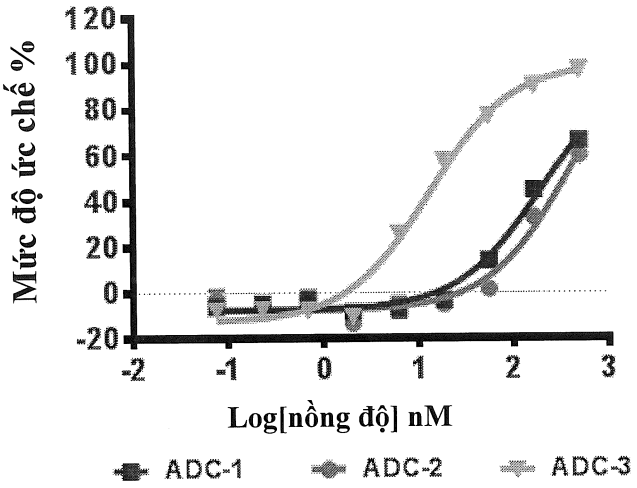


Fig. 2B

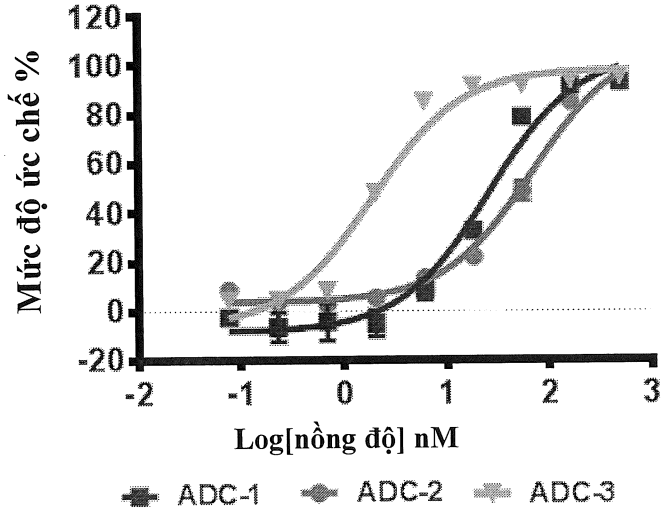


Fig. 2C

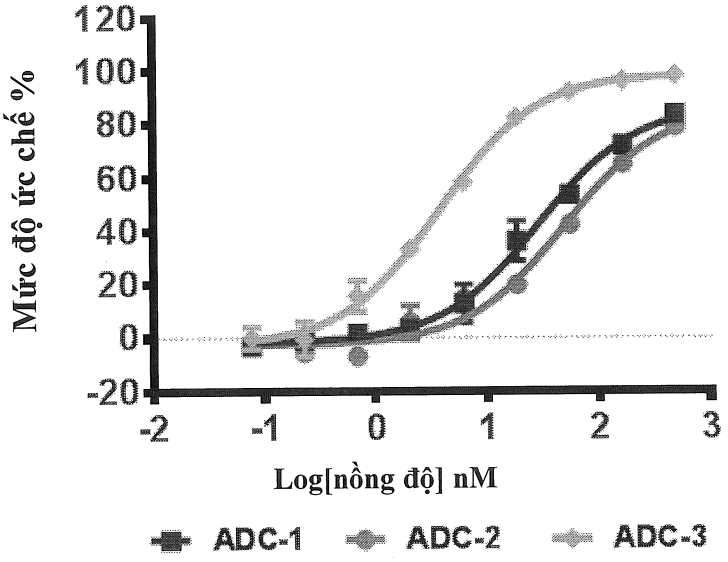

120
100
80
60
40
20
0
-20
Mức độ ức chế %
-2
-1
0
1
2
3
Log[nồng độ] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

Fig. 2D

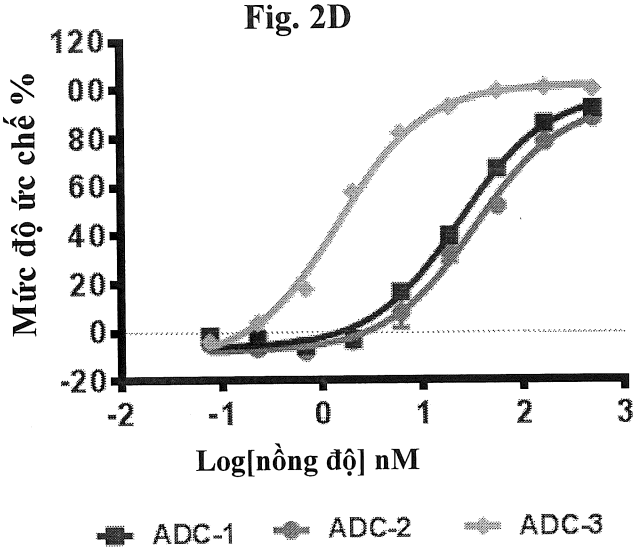

120
00
80
60
40
20
0
-20
Mức độ ức chế %
-2
-1
0
1
2
3
Log[nồng độ] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

Fig. 2E

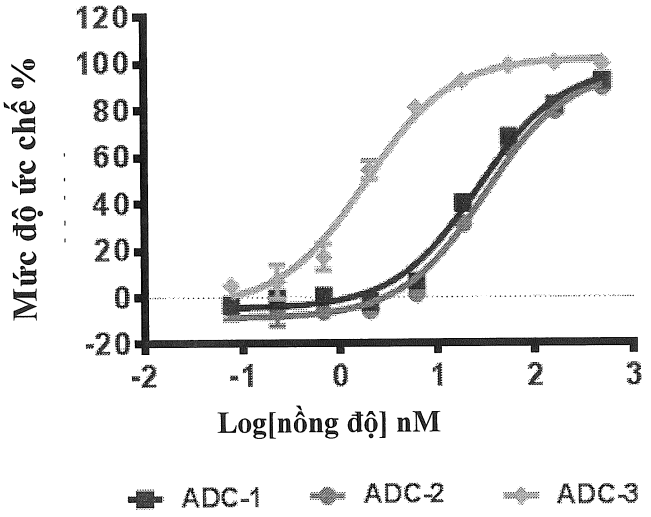

Mức độ ức chế %
120
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
Log[nồng độ] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

Fig. 2F

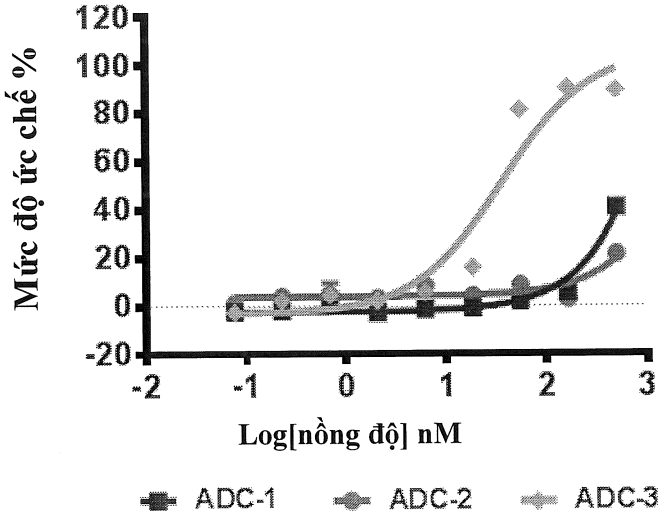

Mức độ ức chế %
120
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
Log[nồng độ] nM
ADC-1
ADC-2
ADC-3

Fig. 3

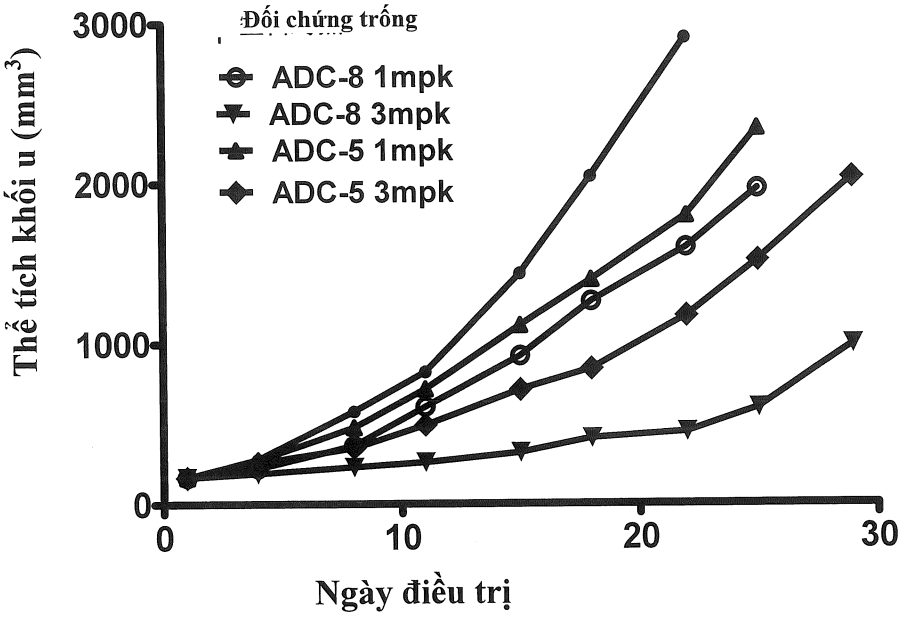

Đối chứng trống
ADC-8 1mpk
ADC-8 3mpk
ADC-5 1mpk
ADC-5 3mpk
Thể tích khối u (mm3)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
Ngày điều trị

Fig. 4

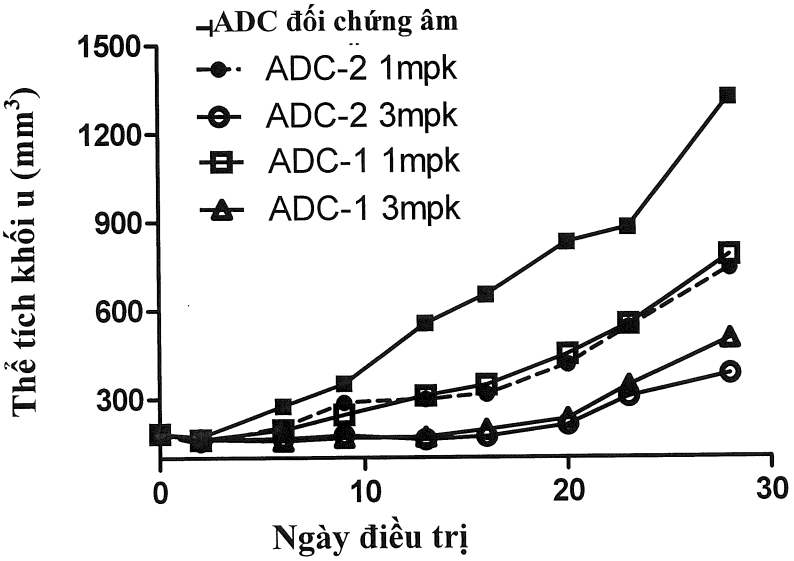

ADC đối chứng âm
ADC-2 1mpk
ADC-2 3mpk
ADC-1 1mpk
ADC-1 3mpk
Thể tích khối u (mm3)
1500
1200
900
600
300
0
10
20
30
Ngày điều trị

Fig. 5A

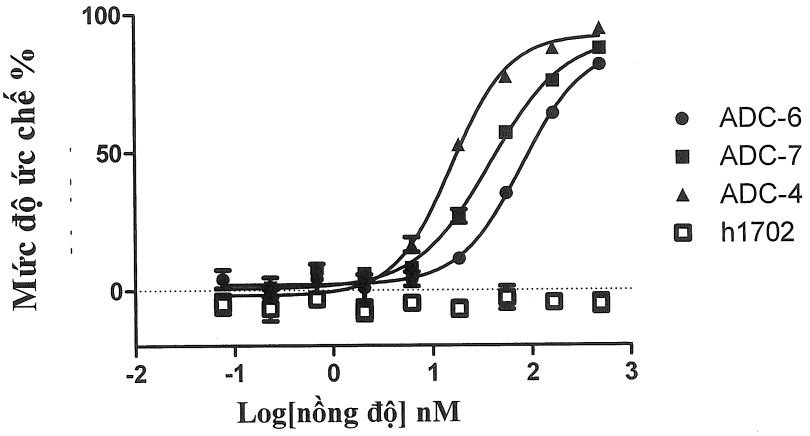


Fig. 5B

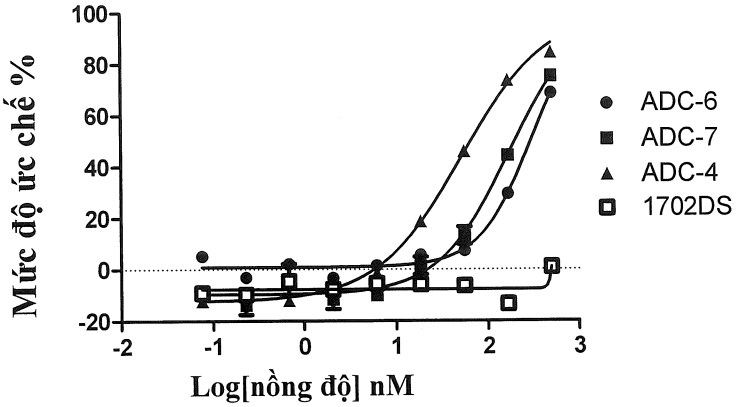


Fig. 5C

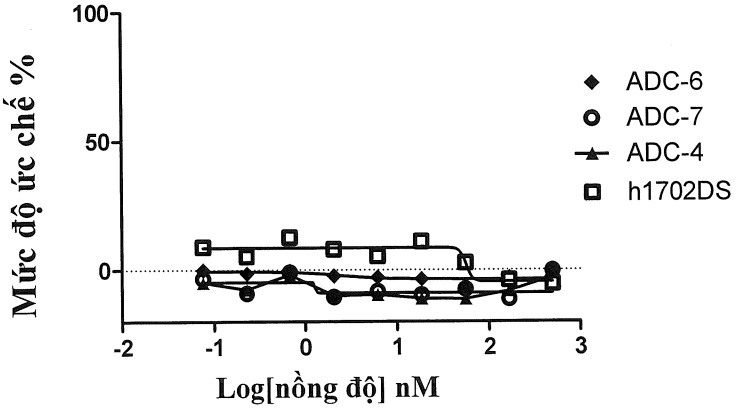
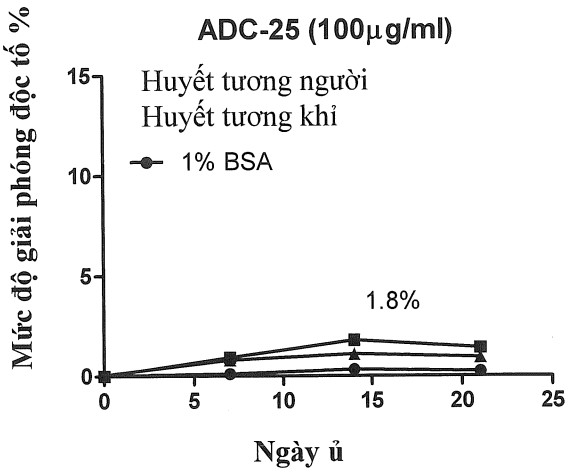


Fig. 6


ADC-25 (100µg/ml)
Huyết tương người
Huyết tương khỉ
1% BSA
1.8%
Mức độ giải phóng độc tố %
Ngày ủ
0
5
10
15
20
25

Danh mục trình tự

<110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Thể tiếp hợp phối tử - dược chất và dược phẩm chứa thể tiếp hợp này

<160> 16

<170> SIPOTrình tựListing 1.0

<210> 1
<211> 534
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Peptit
<223> Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ B7H3 ở người

<400> 1

```
Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1               5                  10                  15
Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
            20                  25                  30
Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
        35                  40                  45
Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
    50                  55                  60
Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65                  70                  75                  80
Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
                85                  90                  95
Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
            100                 105                 110
Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
        115                 120                 125
Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
    130                 135                 140
Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145                 150                 155                 160
Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
                165                 170                 175
Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
            180                 185                 190
Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu
        195                 200                 205
Arg Val Val Leu Gly Ala    Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
    210                 215                 220
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln
225                 230                 235                 240
Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
                245                 250                 255
Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
            260                 265                 270
Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
        275                 280                 285
Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
    290                 295                 300
Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
305                 310                 315                 320
```

```
Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
            325                 330                 335
Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
        340                 345                 350
Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
    355                 360                 365
Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
370                 375                 380
Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
385                 390                 395                 400
Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
            405                 410                 415
Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
        420                 425                 430
Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
    435                 440                 445
Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
450                 455                 460
Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
465                 470                 475                 480
Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
            485                 490                 495
Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
        500                 505                 510
Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
    515                 520                 525
Asp Gly Gln Glu Ile Ala
530
```

<210> 2
<211> 316
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Peptit
<223> Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ B7H3 ở chuột

<400> 2

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

```
      195                 200                 205
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
   210                 215                 220
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
225                 230                 235                 240
Pro Leu Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
                245                 250                 255
Val Cys Leu Val Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
            260                 265                 270
Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
        275                 280                 285
Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg Pro Leu Lys Pro
    290                 295                 300
Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305                 310                 315
```

<210> 3
<211> 223
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Peptit
<223> 2Ig-B7H3

<400> 3

```
Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
1               5                  10                  15
Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
            20                  25                  30
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
        35                  40                  45
His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
    50                  55                  60
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65                  70                  75                  80
Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val
                85                  90                  95
Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
            100                 105                 110
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
        115                 120                 125
Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro
    130                 135                 140
Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
145                 150                 155                 160
Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val
                165                 170                 175
His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
            180                 185                 190
Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr
        195                 200                 205
Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly His His His His His His
    210                 215                 220
```

<210> 4
<211> 439
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Peptit
<223> 4Ig-B7H3

<400> 4
Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
1 5 10 15
Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
20 25 30
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
35 40 45
His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
50 55 60
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80
Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val
85 90 95
Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
100 105 110
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
115 120 125
Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro
130 135 140
Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
145 150 155 160
Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val
165 170 175
His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
180 185 190
Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr
195 200 205
Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro
210 215 220
Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys
225 230 235 240
Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile
245 250 255
Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly
260 265 270
Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp
275 280 285
Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val
290 295 300
Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly
305 310 315 320
Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser
325 330 335
Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr
340 345 350
Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp
355 360 365
Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln
370 375 380
Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val
385 390 395 400
Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val
405 410 415
Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met
420 425 430
Thr His His His His His His
435

<210> 5
<211> 222
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Peptit
<223> Kháng nguyên B7H3 ở chuột để sàng lọc và phát

<400> 5
Val Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr
1 5 10 15
Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
20 25 30
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
35 40 45
His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg
50 55 60
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80
Leu Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val
85 90 95
Ser Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
100 105 110
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
115 120 125
Pro Gly Asn Met Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro
130 135 140
Glu Ala Glu Val Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
145 150 155 160
Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val
165 170 175
His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
180 185 190
Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr
195 200 205
Ile Thr Gly Gln Pro Leu Thr Phe His His His His His His His
210 215 220

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> Trình tự thay đổi chuỗi nặng 1702

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 110

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> Trình tự thay đổi chuỗi nhẹ 1702

<400> 7
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
His Tyr Pro Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Met
35 40 45
Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Ile His Val Asp Arg
85 90 95
Asp Ile Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> 1702 HCDR1

<400> 8
Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser Ala
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> 1702 HCDR2

<400> 9
Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> 1702 HCDR3

<400> 10
Ala Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> 1702 LCDR1

<400> 11
Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser His Tyr
1 5

<210> 12
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> 1702 LCDR2

<400> 12
Asn Thr Asn
1

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Miền
<223> 1702 LCDR3

<400> 13
Ala Ile His Val Asp Arg Asp Ile Trp Val
1 5 10

<210> 14
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Chuỗi
<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng (IgG1) 1702

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Ser Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
           100                 105                 110
Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
       115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
   130                 135                 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
               165                 170                 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
           180                 185                 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
       195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
   210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
               245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
           260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
       275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
   290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
               325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
           340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
       355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
   370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
               405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
           420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
       435                 440                 445
Lys
```

<210> 15
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Chuỗi
<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ 1702

<400> 15

```
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser
           20                  25                  30
```

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

<210> 16
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> Chuỗi
<223> Trình tự chuỗi nhẹ 1702DS sau khi cải biến đột biến

<400> 16

```
Asp Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser
            20                  25                  30
His Tyr Pro Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Met
        35                  40                  45
Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65                  70                  75                  80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Ile His Val Asp Arg
                85                  90                  95
Asp Ile Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
            100                 105                 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
        115                 120                 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
    130                 135                 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145                 150                 155                 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
                165                 170                 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
            180                 185                 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
        195                 200                 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys
    210                 215
```