



(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)



1-0048490

(51)^{2021.01} A61K 47/68; A61K 39/00; A61K 47/60; (13) B
G01N 33/574; A61P 35/00; C07K 16/30;
A61K 31/357

(21) 1-2022-03502

(22) 06/11/2020

(86) PCT/IB2020/000917 06/11/2020

(87) WO 2021/090062 14/05/2021

(30) 62/932,373 07/11/2019 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/10/2022 415A

(73) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)

6-10 Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088 Japan

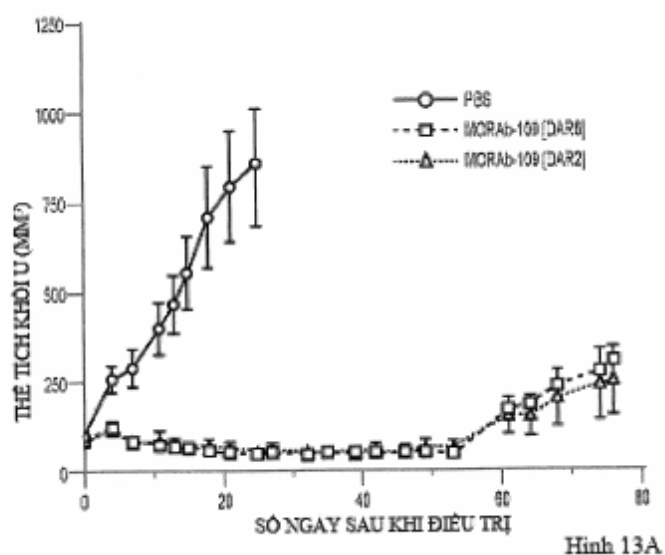
(72) ALBONE, Earl, F. (US); SPIDEL, Jared (US).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ HOẶC MẢNH GẮN KHÁNG NGUYÊN ĐƯỢC PHÂN LẬP, VÀ
DƯỢC PHẨM

(21) 1-2022-03502

(57) Các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và các thể liên hợp (ví dụ, các thể liên hợp thuốc-kháng thể chẳng hạn như bao gồm eribulin) của chúng mà gắn với mesothelin được bộc lộ. Sáng chế còn đề cập đến được phẩm để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư bằng việc dùng các chế phẩm được đề xuất ở đây.



Hình 13A

[0001] Đơn này hưởng quyền ưu tiên từ đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 62/932,373 được nộp ngày 7 tháng 11 năm 2019, mà được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

[0002] Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng mesothelin và các mảnh gắn kháng nguyên của nó, cũng như các thể liên hợp chẳng hạn như các thể liên hợp thuốc-kháng thể (các ADC), ví dụ, các thể bao gồm eribulin, và việc sử dụng chúng trong việc điều trị và chẩn đoán các bệnh ung thư mà biểu hiện mesothelin và/hoặc có thể chấp nhận cho việc điều trị bằng việc làm gián đoạn tubulin hoặc bằng việc dùng chế phẩm được bộc lộ ở đây.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

[0003] Ung thư là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh tật và tử vong trên toàn thế giới, với khoảng 14 triệu ca mắc mới và 8,2 triệu ca tử vong liên quan đến ung thư trong năm 2012. Nguyên nhân tử vong do ung thư phổ biến nhất là các bệnh ung thư: phổi (1,59 triệu ca tử vong); gan (745000 ca tử vong); dạ dày (723000 ca tử vong); đại trực tràng (694000 ca tử vong); vú (521000 ca tử vong); và thực quản (400000 ca tử vong). Số ca ung thư mới dự kiến sẽ tăng khoảng 70% trong hai thập kỷ tới, lên khoảng 22 triệu ca ung thư mới mỗi năm (Báo cáo Ung thư Thế giới 2014).

[0004] Mesothelin, protein bề mặt tế bào neo glycosylphosphatidylinositol (GPI), là mục tiêu hấp dẫn đối với liệu pháp điều trị ung thư dựa trên kháng thể do mức biểu hiện cao ở nhiều loại ung thư khác nhau, bao gồm ung thư trung biểu mô, ung thư buồng trứng và ung thư tuyến tụy (Tang et al. (2013) *Anticancer Agents Med. Chem.* 13(2):276-80). Mặc dù sự hiểu biết đầy đủ về các chức năng sinh học của mesothelin còn thiếu do các con chuột loại trực tiếp mesothelin không cho thấy bất kỳ kiểu hình nào có thể phát hiện được, được cho rằng mesothelin đóng một vai trò trong sự bám dính và di căn của khối u (Bera and Pastan (2000) *Mol. Cell Biol.* 20(8):2902-6; Rump et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(10):9190-8). Mesothelin cũng được tin là có khả năng chống lại một số dạng hóa trị liệu nhất định và góp phần vào sự tiến triển của khối u

bằng cách có tác động tăng sinh trên các tế bào (Bharadwaj et al. (2011) Mol. Cancer. 10:106; Li et al. (2008) Mol. Cancer Ther. 7(2):286-96).

[0005] Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng mesothelin có thể hoạt động như chất điều hòa chính của quá trình chuyển đổi biểu mô-trung mô (EMT), quá trình liên quan chặt chẽ với sự di căn và tái phát của ung thư (He et al. (2017). Mol Cancer. 16:63). Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, được tin rằng sự ức chế mesothelin, ví dụ, việc gắn bởi kháng thể kháng mesothelin, đoạn gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC, có thể làm giảm EMT bằng cách tạo ra quá trình đảo ngược, chuyển tiếp biểu mô trung mô (MET), thông qua việc ức chế tín hiệu TGF- β (tác nhân tăng trưởng biến đổi beta). Ngược lại, được tin rằng sự biểu hiện quá mức của mesothelin có thể thúc đẩy EMT thông qua việc cảm ứng các kiểu hình giống tế bào gốc ung thư liên quan đến sự tiến triển của khối u và đáp ứng điều trị kém (He et al. (2017). Mol Cancer. 16:63; Koyama et al. (2017). J. Clin. Invest. 127(4): 1254-1270).

[0006] Thách thức thường gặp trong liệu pháp điều trị ung thư là chỉ số điều trị hạn chế của hóa trị liệu dẫn đến độc tính đáng kể đối với các mô bình thường và do đó hạn chế công dụng điều trị của chúng. Một cách tiếp cận để đạt được độ đặc hiệu cao hơn để nhắm mục tiêu các tế bào ung thư là sử dụng các kháng thể để cung cấp các hiệu quả gây độc tế bào đối với các tế bào biểu hiện các kháng nguyên đặc hiệu cho khối u nhất định trong khi bỏ qua các tế bào bình thường biểu hiện mức độ thấp hơn nhiều hoặc không biểu hiện các kháng nguyên này (Awwad et al. Pharmaceutics (2018) 10(3); Lambert and Berkenblit (2018) 69: 191-207). Việc nhắm mục tiêu đặc hiệu khối u như vậy có thể được khai thác để tăng hoạt động chống khối u và giảm độc tính tế bào ngoài mục tiêu của phương pháp điều trị. Các kháng thể nhắm mục tiêu các kháng nguyên đặc hiệu khối u có thể tạo ra các tác dụng gây độc tế bào thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm ức chế hoạt tính sinh học của kháng nguyên, kích thích hoạt động của tác nhân miễn dịch và/hoặc gây ra độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (Hendricks et al. International Review of Cell and Molecular Biology (2017); Therapeutic Antibody Engineering (2012): 163-196, 459-595).

[0007] Việc lựa chọn các kháng nguyên đặc hiệu khối u cho phương pháp điều trị dựa trên kháng thể có thể bao gồm sự biểu hiện đặc hiệu của kháng nguyên bởi các tế bào khối u và sự tiêu diệt mạnh mẽ các tế bào khối u biểu hiện kháng nguyên. Một số bệnh ung thư ở người đã được phát hiện là biểu hiện ở mức cao mesothelin, bao gồm ung thư

phổi, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy và ung thư dạ dày (Hassan et al. Eur. J. Cancer (2008) 44(1): 46-53; Hassan et al. J. Clin. Oncol. (2016) 34(34): 4171-4179). Việc biểu hiện mesothelin cũng đã được tìm thấy trong các bệnh ung thư kháng thuốc như ung thư phổi với các đột biến KRAS và STK11 với đáp ứng lâm sàng kém với liệu pháp miễn dịch phong tỏa điểm kiểm soát và ung thư dạ dày âm tính với HER2. Ngoài ra, mối tương quan đã được báo cáo giữa việc biểu hiện mesothelin và tỷ lệ sống sót tổng quát của các bệnh nhân với ung thư biểu mô tuyến phổi và của các bệnh nhân với di căn ung thư dạ dày, cho thấy rằng việc biểu hiện mesothelin ở mức cao có thể là một yếu tố dự báo kết quả lâm sàng xấu hơn. (Kachala et al. (2014) Clin. Cancer. Res. 20(4): 1020-1028; Han et al. (2017) J. Pathol. Transl. Med. 51(2): 122-128). Sự phổ biến của biểu hiện mesothelin ở các bệnh ung thư ở người và mối liên quan của nó với kết quả lâm sàng kém khiến mesothelin trở thành mục tiêu tiềm năng cho các phương pháp phân phối thuốc đặc hiệu kháng nguyên khối u, ví dụ, phương pháp tiếp cận qua trung gian kháng thể. Các kháng thể được liên hợp với các hợp chất gây độc tế bào chẳng hạn như các hóa trị liệu cũng đã được khám phá để tăng cường hoạt động tiêu diệt tế bào của việc phân phối thuốc dựa trên kháng thể đến các tế bào khối u. Tuy nhiên, nhu cầu vẫn là cung cấp các kháng thể và/hoặc các ADC thích hợp mà cung cấp sự kết hợp giữa việc nhắm mục tiêu khối u hiệu quả, các tác dụng đúng mục tiêu, việc tiêu diệt bên ngoài và/hoặc các tác dụng ngoài mục tiêu được giảm.

[0008] Eribulin là một chất tương tự tổng hợp của hợp chất macrocyclic halichondrin B, mà trước đây đã được chứng minh là chất ức chế mạnh của quá trình polyme hóa tubulin, việc lắp ráp vi ống và thủy phân GTP phụ thuộc tubulin. Tubulin tạo nên các protein khung xương tế bào sợi động được gọi là các vi ống mà tham gia vào nhiều chức năng tế bào thiết yếu, bao gồm di chuyển và vận chuyển nội bào, truyền tín hiệu tế bào, duy trì hình dạng tế bào và phân chia tế bào. Tốc độ phân chia nhanh chóng của các tế bào ung thư khiến chúng trở nên đặc biệt nhạy cảm với sự cản trở của chức năng tubulin. Như vậy, halichondrin B và eribulin đã chứng minh các hoạt động chống ung thư đáng chú ý in vitro và in vivo (Tan et al. (2009) Clin Cancer Res. 15(12): 4213-4219; Vahdat et al. (2009) J. Clin. Oncol. 27(18): 2954-2961). Muối mesylat của eribulin (eribulin mesylat) hiện đang được bán trên thị trường với tên thương mại Halaven™ để điều trị các bệnh nhân với ung thư vú di căn khó chữa.

[0009] Trong khi việc sử dụng eribulin đã được báo cáo trong lĩnh vực, bao gồm trong bối cảnh ADC, vẫn cần phải cung cấp tốt hơn eribulin theo cách có mục tiêu đến các mô cụ thể, ví dụ, các mô ung thư mà biểu hiện mesothelin. Tương tự như vậy, trong lĩnh vực vẫn còn nhu cầu về các kháng thể được cải thiện mà gắn mesothelin với các đặc tính ưu việt, ví dụ, liên quan đến việc gắn kháng nguyên và/hoặc khả năng phân phối hiệu quả các phụ tải như eribulin đến tế bào mục tiêu hoặc mô biểu hiện mesothelin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

[0010] Trong các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất, một phần, các kháng thể và các mảnh gắn kháng nguyên mới mà có thể được sử dụng riêng lẻ, được nối với một hoặc nhiều tác nhân bổ sung (ví dụ, như các ADC), hoặc như một phần của đại phân tử lớn hơn (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đa đặc hiệu, riêng lẻ hoặc như kháng thể đa đặc hiệu được liên kết với phụ tải trong định dạng ADC) và được dùng như một phần của các dược phẩm hoặc các liệu pháp kết hợp. Trong một số phương án, các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được người hóa. Trong một số phương án, các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên chứa các trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải ở người và giữ lại khả năng phản ứng của kháng thể không phải ở người trong khi ít gây miễn dịch hơn ở người. Trong các phương án nhất định, các kháng thể và các mảnh gắn kháng nguyên có thể là hữu dụng để điều trị các bệnh nhân ung thư ở người.

[0011] Sáng chế đề cập cụ thể hơn, trong các phương án khác nhau, đến các kháng thể và các hợp chất thể liên hợp thuốc-kháng thể mà có khả năng gắn và/hoặc tiêu diệt các tế bào khối u. Theo các phương án khác nhau, các hợp chất cũng có khả năng nội hóa vào trong tế bào đích sau khi gắn. Các hợp chất ADC bao gồm cầu nối mà liên kết gốc thuốc eribulin với gốc kháng thể được bộc lộ. Gốc kháng thể có thể là kháng thể có độ dài đầy đủ hoặc mảnh gắn kháng nguyên.

[0012] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of

Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991))); hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)).

[0013] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) từ vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) từ vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14.

[0014] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14, hoặc các trình tự mà tương đồng ít nhất 90% với các trình tự được bộc lộ. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng có SEQ ID NO: 17, và trình tự axit amin chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 18.

[0015] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 19 (HCDR1), SEQ ID NO: 20 (HCDR2), và SEQ ID NO: 21 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 22 (LCDR1), SEQ ID NO: 23 (LCDR2), và SEQ ID NO: 24 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 25 (HCDR1), SEQ ID NO: 26 (HCDR2), và SEQ ID

NO: 27 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 28 (LCDR1), SEQ ID NO: 29 (LCDR2), và SEQ ID NO: 30 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT.

[0016] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 31, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 32. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 33, và vùng không đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 34. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 35, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 36.

[0017] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể có độ dài đầy đủ. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể đặc hiệu đơn hoặc kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu kép hoặc mảnh gắn kháng nguyên, hoặc kháng thể đa đặc hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv), hoặc mảnh Fab.

[0018] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được liên hợp với tác nhân trị liệu, ví dụ, một hoặc nhiều các phân tử nhỏ và/hoặc các kháng thể bổ sung hoặc các mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, tác nhân trị liệu là eribulin. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là 345A12-HC15-LC4.

[0019] Trong các phương án khác nhau, ADC được bộc lộ ở đây bao gồm Công thức (I):



trong đó

Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có khả năng gắn với mesothelin và bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

D là tác nhân trị liệu, ví dụ, gốc eribulin;

L là cầu nối có thể phân cắt mà liên kết cộng hóa trị Ab vào D; và

p là số nguyên từ 1 đến 8.

[0020] Trong một số phương án, p là số nguyên từ 1 đến 6. Trong một số phương án, p là 2 hoặc 6.

[0021] Trong một số phương án, ADC bao gồm cầu nối có thể phân cắt bao gồm gốc có thể phân cắt mà được định vị sao cho không có phần nào của cầu nối hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên vẫn còn gắn với tác nhân trị liệu (ví dụ, eribulin) khi phân cắt. Trong một số phương án, cầu nối có thể phân cắt bao gồm gốc peptit có thể phân cắt mà có thể phân cắt bởi enzym chẳng hạn như cathepsin B. Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt bao gồm gốc peptit có thể phân cắt, ví dụ, đơn vị axit amin chẳng hạn như Val-Cit. Trong một số phương án, đơn vị axit amin bao gồm valin-xitrulin (Val-Cit).

[0022] Trong một số phương án, cầu nối có thể phân cắt bao gồm ít nhất một đơn vị đệm bao gồm ít nhất một gốc PEG. Trong một số phương án, đơn vị đệm hoặc cầu nối bao gồm (PEG)₂. Trong một số phương án, đơn vị đệm liên kết với gốc kháng thể qua gốc maleimide (Mal) ("đơn vị đệm-Mal"). Trong một số phương án, đơn vị đệm-Mal được kết hợp vào kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên qua gốc cysteine trên kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên (ví dụ, gốc LCcys80 trên kháng thể). Trong một số phương án, đơn vị đệm-Mal được kết hợp vào gốc cysteine (ví dụ, LCcys80) của vùng biến đổi chuỗi

nhẹ trên kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, p là 2, sao cho hai gốc -L-D được liên kết với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, mỗi gốc -L-D được liên kết với gốc cystein (ví dụ, LCcys80) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trên kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, gốc cystein là LCcys80, nghĩa là, gốc cystein ở vị trí axit amin 80 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trên kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo hệ thống đánh số Kabat. Trong một số phương án, cầu nối có thể phân cắt bao gồm đơn vị đệm-Mal và gốc peptit có thể phân cắt và gốc peptit có thể phân cắt bao gồm Val-Cit. Trong một số phương án, đơn vị đệm-Mal liên kết kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên với gốc có thể phân cắt.

[0023] Trong một số phương án, đơn vị đệm-Mal bao gồm ít nhất một gốc PEG. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂. Trong một số phương án, đơn vị đệm-Mal liên kết gốc kháng thể với gốc có thể phân cắt trong cầu nối. Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt trong cầu nối là gốc peptit có thể phân cắt, ví dụ, đơn vị axit amin. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit.

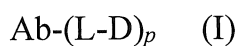
[0024] Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt của ADC được kết hợp trực tiếp với eribulin, hoặc đơn vị đệm liên kết gốc có thể phân cắt trong cầu nối với gốc thuốc eribulin và việc phân cắt của thể liên hợp giải phóng eribulin từ kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên và cầu nối.

[0025] Trong một số phương án, đơn vị đệm mà liên kết gốc có thể phân cắt với gốc thuốc eribulin là đơn vị tự diệt. Trong một số phương án, đơn vị đệm tự diệt bao gồm *p*-aminobenzyloxycarbonyl (pAB). Trong một số phương án, pAB đơn vị đệm liên kết gốc có thể phân cắt với gốc thuốc eribulin qua C-35 amin. Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt là gốc peptit có thể phân cắt, ví dụ, đơn vị axit amin. Trong một số phương án, cầu nối có thể phân cắt bao gồm Val-Cit-pAB. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Val-Cit-pAB và đơn vị đệm PEG kết hợp cầu nối với gốc kháng thể thông qua gốc Mal. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB.

[0026] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm các khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng ở người, hoặc các khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng ở người với một hoặc nhiều đột biến ngược. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm vùng

biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin có SEQ ID NO 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng có SEQ ID NO: 17, và trình tự axit amin chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 18.

[0027] Trong các phương án khác nhau, ADC có Công thức (I):



trong đó

Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có khả năng gắn với mesothelin và bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

D là eribulin;

L là cầu nối có thể phân cắt bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; và

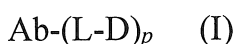
p là số nguyên từ 1 đến 8, ví dụ, *p* là số nguyên từ 2 đến 6 hoặc 3 đến 4.

[0028] Trong một số phương án, *p* là số nguyên từ 1 đến 6. Trong một số phương án, *p* là 2 hoặc 6.

[0029] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC (ví dụ, ADC được mô tả ở trên) bao gồm các khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và

nặng ở người, hoặc các khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng ở người với một hoặc nhiều đột biến ngược. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 14. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng có SEQ ID NO: 17, và trình tự axit amin chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 18.

[0030] Trong các phương án khác nhau, ADC có Công thức I:



trong đó Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có khả năng gắn với mesothelin và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14;

D là eribulin;

L là cầu nối có thể phân cắt bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; và

p là số nguyên từ 1 đến 8, ví dụ, *p* là số nguyên từ 2 đến 6 hoặc 3 đến 4.

[0031] Trong một số phương án, *p* là số nguyên từ 1 đến 6. Trong một số phương án, *p* là 2 hoặc 6.

[0032] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người, và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

[0033] Trong các phương án khác nhau, được đề xuất ở đây là các dược phẩm bao gồm các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, các thể liên hợp, và/hoặc các chế phẩm ADC được mô tả. Trong một số phương án, dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc một hoặc nhiều ADC được mô tả ở đây cùng với ít nhất một chất mang dược dụng. Trong một số phương án, dược phẩm bao gồm nhiều bản sao của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC. Trong một số phương án, dược phẩm bao gồm nhiều bản sao của ADC được bộc lộ ở đây, trong đó trung bình p của ADC là khoảng 1 đến khoảng 6. Trong một số phương án, trung bình p của ADC trong chế phẩm là khoảng 1.7 hoặc 2, hoặc khoảng 6.

[0034] Trong các phương án khác nhau, được đề xuất ở đây là các việc sử dụng trị liệu cho các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, các thể liên hợp, và/hoặc các chế phẩm ADC được mô tả, ví dụ, trong việc điều trị ung thư. Trong các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị ung thư mà biểu hiện kháng nguyên được hướng mục tiêu bởi kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc gốc kháng thể của thể liên hợp hoặc ADC, chẳng hạn như mesothelin. Trong các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp tiêu diệt hoặc ức chế sự tăng sinh của các tế bào khối u hoặc các tế bào ung thư bằng việc dùng lượng hữu hiệu trị liệu và/hoặc phác đồ của bất kỳ trong số các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, các thể liên hợp, và/hoặc các ADC được mô tả ở đây. Trong một số phương án, ung thư là ung thư biểu hiện mesothelin, chẳng hạn như ung thư trung biểu mô, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư đại trực tràng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư đầu và cổ, ung thư gan, ung thư phổi (ví dụ, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ), ung thư buồng trứng (ví dụ, ung thư buồng trứng huyết thanh hoặc tế bào rõ), ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư dạ dày, ung thư tuyến giáp, ung thư biểu mô, ung thư tử cung, ung thư ống mật hoặc bệnh bạch cầu.

[0035] Trong các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các việc sử dụng cho các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, các thể liên hợp, và/hoặc các hợp chất ADC và các chế phẩm được mô tả ở trên, ví dụ, để xác định xem đối tượng có hoặc nghi ngờ có bệnh ung thư (ví dụ, ung thư biểu hiện mesothelin) có đáp ứng với việc điều trị với tác nhân hướng mục tiêu mesothelin, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng thể, thể liên hợp, hoặc ADC được bộc lộ ở đây hay không. Trong một số phương án, phương pháp bao gồm cung cấp mẫu sinh học từ đối tượng; cho mẫu tiếp xúc với kháng thể hoặc

mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây; và phát hiện việc gắn của kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên với một hoặc nhiều tế bào ung thư trong mẫu.

[0036] Trong các khía cạnh nhất định khác, sáng chế đề xuất các dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng thể, thể liên hợp, và/hoặc ADC và chất pha loãng, chất mang, và/hoặc tá dược dược dụng. Các phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng thể, thể liên hợp, hoặc các hợp chất ADC và các chế phẩm được bộc lộ cũng được đề xuất.

[0037] Trong một số phương án, (các) trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, thể liên hợp, hoặc ADC theo sáng chế được đề xuất. Các axit nucleic có thể có dạng axit nucleic được phân lập, axit nucleic được kết hợp vào vector được phân lập bao gồm, và/hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được biểu hiện bởi quần thể tế bào trong các điều kiện thích hợp để sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[0038] Hình 1 thể hiện sự phát hiện của phản ứng đặc hiệu của huyết thanh miễn dịch đối với mesothelin ở người bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy.

[0039] Hình 2 thể hiện sự phát hiện của phản ứng đặc hiệu của các dịch nuôi cấy với mesothelin ở người bằng ELISA.

[0040] Hình 3 thể hiện việc khuếch đại PCR trong dung hợp của các kháng thể kháng mesothelin bằng việc điện di trên gel.

[0041] Hình 4 thể hiện các dòng kháng mesothelin cho việc nhân bản và biểu hiện trong dung hợp.

[0042] Hình 5 thể hiện sự tóm tắt của 48 kháng thể kháng mesothelin Rb-hu-xi được tinh sạch.

[0043] Hình 6 thể hiện kết quả hiệu lực dựa trên tế bào in-vitro cho các thể liên hợp kháng mesothelin-AuF.

[0044] Hình 7 thể hiện đặc tính gắn epitop của các kháng thể kháng mesothelin.

[0045] Hình 8 thể hiện các kết quả phân tích DSC cho các kháng thể 345A12 được người hóa. Các mảnh 345A12 F(ab')₂ được tiến hành phân tích nhiệt trong khoảng từ 25-100°C sử dụng tốc độ quét là 100°C/giờ.

[0046] Hình 9 thể hiện sự ổn định của MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin) (DAR2) trong các nền khác nhau.

[0047] Hình 10A và Hình 10B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 10A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 10B) ở mô hình mảnh ghép khác loại ung thư phổi không phải tế bào nhỏ ở người (NSCLC) NCI-H2110 được điều trị với 345A12-HC1-LC2-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg hoặc 102A6A2-HC1-LC2-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg (Nghiên cứu M109-004-2016).

[0048] Hình 11A và Hình 11B thể hiện sự thay đổi khối lượng cơ thể của chuột cái CD-1 được điều trị với 345A12-HC1-LC2-diOH eribulin dime ADC (5, 10, 15, hoặc 20 mg/kg) (Hình 11A) hoặc 345A12-HC15-LC4-diOH eribulin dime ADC (5, 10, hoặc 20 mg/kg) (Hình 11B) (Nghiên cứu M109-006-2017).

[0049] Hình 12A và Hình 12B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 12A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 12B) trong mô hình mảnh ghép khác loại NSCLC NCI-H2110 ở người được điều trị với 345A12-HC10-LC4-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg hoặc 345A12-HC15-LC4-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg (Nghiên cứu M109-007-2017).

[0050] Hình 13A và Hình 13B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 13A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 13B) trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày NCI-N87 ở người được điều trị với MORAb-109 (DAR2 hoặc DAR6) (Nghiên cứu M109-010-2018).

[0051] Hình 14A và Hình 14B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 14A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 14B) trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư trung biểu mô HAY ở người được điều trị với MORAb-109 (DAR2 hoặc DAR6) hoặc eribulin (Nghiên cứu M109-010-2018).

[0052] Hình 15A và Hình 15B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 15A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 15B) ở mô hình ung thư trung biểu mô PDX ở người (Meso7212) được điều trị với MORAb-109 (DAR6) hoặc eribulin.

[0053] Hình 16A và Hình 16B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 16A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 16B) ở mô hình ung thư trung biểu mô PDX ở người (Meso7212) được điều trị với các loài DAR khác nhau của MORAb-109 hoặc eribulin.

[0054] Hình 17 thể hiện việc phân tích mối tương quan giữa việc biểu hiện mesothelin (MSLN) và hiệu lực in vitro (IC_{50}) của eribulin và MORAb-109 (DAR2 và DAR6) trong các dòng tế bào khác nhau. Mối tương quan cho MORAb-109 (DAR2) được phân tích trong tất cả 51 dòng tế bào và trong tập con của các dòng tế bào với các mức biểu hiện mesothelin cao hơn (việc nhuộm FACS của cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) bằng hoặc > 80). Tập hợp con loại trừ các dòng tế bào với các mức biểu hiện mesothelin thấp hơn (việc nhuộm FACS là $MFI < 80$).

[0055] Hình 18A-C thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 18A và Hình 18B) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 18C) trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày NCI-N87 ở người được điều trị với các liều khác nhau của MORAb-109 (DAR2) nằm trong khoảng từ 5 mg/kg đến 25 mg/kg.

[0056] Hình 19 thể hiện các nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) của MORAb-109 (DAR2) toàn phần và nguyên vẹn ở chuột mang khối u NCI-N87 sau khi điều trị với các liều khác nhau của MORAb-109 (DAR2) nằm trong khoảng từ 5 mg/kg đến 25 mg/kg.

[0057] Hình 20A và Hình 20B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 20A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 20B) trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư buồng trứng OVCAR-3-A1-T1 ở người được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (5 mg/kg) hoặc eribulin (0,1 hoặc 3,2 mg/kg).

[0058] Hình 21A và Hình 21B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 21A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 21B) trong mô hình NSCLC PDX (LC-F-25) ở người được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (10 mg/kg) hoặc eribulin (0,1 hoặc 3,2 mg/kg).

[0059] Hình 22A và Hình 22B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 22A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 22B) trong mô hình NSCLC PDX (LXFA-737) ở người được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (10 mg/kg) hoặc eribulin (0,2 hoặc 3,2 mg/kg).

[0060] Hình 23A và Hình 23B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 23A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 23B) trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày

NCI-N87 ở người được điều trị với liều đơn của MORAb-109 (DAR2 hoặc DAR6) ở 10 mg/kg (3 chuột mỗi nhóm).

[0061] Hình 24A và Hình 24B thể hiện DAR của MORAb-109 (DAR2) (Hình 24A) hoặc MORAb-109 (DAR6) (Hình 24B) trong các mẫu huyết tương từ chuột mang khối u NCI-N87 sau khi điều trị với liều đơn của MORAb-109 (DAR2 hoặc DAR6) ở 10 mg/kg.

[0062] Hình 25A và Hình 25B thể hiện tính gây độc tế bào (% tiêu diệt) của MORAb-109 (DAR2) (Hình 25A) hoặc BAY 94-9343 (Hình 25B) trên các tế bào ung thư dạ dày NCI-N87. Cả các ADC kháng MSLN được đánh giá riêng lẻ và trong sự có mặt của kháng thể không được liên hợp.

[0063] Hình 26A và Hình 26B thể hiện hoạt tính ADCC của MORAb-109 (DAR2) và 345A12-HC15-LC4 (Hình 26A) hoặc BAY 94-9343 và anetumab (Hình 26B), như được đo bởi thử nghiệm luciferaza. Hoạt tính ADCC được tính toán bởi diện tích tương đối dưới đường cong (AUC).

[0064] Hình 27 thể hiện việc phân tích độ ổn định của các ADC kháng MSLN, MORAb-109 (DAR2) và BAY 94-9343, trong huyết tương ở người và chuột.

[0065] Hình 28A và Hình 28B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 28A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 28B) trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày NCI-N87 ở người được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (5 mg/kg), BAY 94-9343 (5 mg/kg), hoặc eribulin (1 mg/kg).

[0066] Hình 29A và Hình 29B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 29A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 29B) trong mô hình mảnh ghép khác loại u trung biểu mô HAY ở người được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (5 mg/kg), BAY 94-9343 (5 mg/kg), hoặc eribulin (1 mg/kg).

[0067] Hình 30A và Hình 30B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 30A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 30B) trong mô hình u trung biểu mô PDX ở người (Meso7212) được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (10 mg/kg), BAY 94-9343 (10 mg/kg), eribulin (1 mg/kg), hoặc DM4 (0,3 mg/kg).

[0068] Hình 31A và Hình 31B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 31A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 31B) trong mô hình NSCLC PDX ở người (LXFA-586)

được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (25 mg/kg), BAY 94-9343 (DAR ~ 4) (25 mg/kg), hoặc eribulin (3,2 mg/kg).

[0069] Hình 32A và Hình 32B thể hiện hiệu quả kháng khối u (Hình 32A) và sự thay đổi khối lượng cơ thể (Hình 32B) trong mô hình NSCLC PDX ở người (LXFL-529) được điều trị với MORAb-109 (DAR2) (25 mg/kg), MORAb-109 (DAR2) (12,5 mg/kg), MORAb-109 (DAR2) (12,5 mg/kg, QWx3), BAY 94-9343 (DAR ~ 4) (12,5 mg/kg), hoặc eribulin (3,2 mg/kg).

Mô tả chi tiết sáng chế

[0070] Các hợp phần và phương pháp được bộc lộ có thể được hiểu dễ dàng hơn bằng cách tham chiếu đến phần mô tả chi tiết dưới đây kết hợp với các hình vẽ kèm theo, mà tạo thành một phần của bản mô tả này. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể bằng cách làm ví dụ và không nhằm giới hạn các chế phẩm và phương pháp được yêu cầu bảo hộ trừ khi ngữ cảnh chỉ ra khác đi.

[0071] Trong toàn bộ bản mô tả, phần mô tả đề cập đến các chế phẩm và các phương pháp sử dụng các chế phẩm. Khi sáng chế mô tả hoặc yêu cầu bảo hộ dấu hiệu hoặc phương án liên quan đến chế phẩm, dấu hiệu hoặc phương án này có thể áp dụng ngang bằng với các phương pháp sử dụng chế phẩm. Tương tự như vậy, khi sáng chế mô tả hoặc yêu cầu bảo hộ về dấu hiệu hoặc phương án liên quan đến phương pháp sử dụng hợp phần, dấu hiệu hoặc phương án này có thể áp dụng ngang bằng với hợp phần.

[0072] Khi khoảng các giá trị được nêu ra, nó bao gồm các phương án sử dụng giá trị cụ thể bất kỳ ở trong khoảng giá trị đó. Hơn nữa, việc đề cập đến các giá trị được nêu trong khoảng giá trị này bao gồm mỗi giá trị và mọi giá trị ở trong khoảng giá trị đó. Tất cả các khoảng giá trị đều bao gồm các điểm đầu nút của chúng và có thể kết hợp. Khi các giá trị được biểu diễn dưới dạng xấp xỉ, bằng cách sử dụng từ đứng trước “khoảng”, nó sẽ được hiểu rằng giá trị cụ thể này tạo thành một phương án khác. Việc đề cập đến giá trị bằng số cụ thể bao gồm ít nhất là giá trị cụ thể đó, trừ khi ngữ cảnh quy định rõ ràng là có nghĩa khác. Việc sử dụng “hoặc” sẽ có nghĩa là “và/hoặc” trừ khi ngữ cảnh cụ thể của việc sử dụng nó quy định là có nghĩa khác. Tất cả các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp để tham khảo cho mục đích bất kỳ. Khi tài liệu tham khảo và bản mô tả này mâu thuẫn với nhau, thì hiểu theo bản mô tả này.

[0073] Cần hiểu rõ rằng các dấu hiệu nhất định của các chế phẩm và các phương pháp được bộc lộ, để cho rõ ràng, được mô tả ở đây trong ngữ cảnh của các phương án riêng rẽ, cũng có thể được cung cấp ở dạng kết hợp trong phương án đơn lẻ. Ngược lại, các dấu hiệu khác nhau của các chế phẩm và các phương pháp được bộc lộ mà, để cho ngắn gọn, được mô tả trong ngữ cảnh phương án đơn lẻ, cũng có thể được cung cấp riêng rẽ hoặc trong dạng kết hợp con bất kỳ.

Định nghĩa

[0074] Các thuật ngữ khác nhau liên quan đến các khía cạnh của sáng chế được sử dụng xuyên suốt bản mô tả và các yêu cầu bảo hộ. Các thuật ngữ này có nghĩa thông thường trong lĩnh vực trừ khi có chỉ dẫn khác. Các thuật ngữ được xác định cụ thể khác sẽ được hiểu theo cách thống nhất với định nghĩa đã nêu trong bản mô tả này.

[0075] Như được sử dụng ở đây, các danh từ ở dạng số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng theo cách khác.

[0076] Các thuật ngữ "khoảng" hoặc "xấp xỉ" trong ngữ cảnh của giá trị và khoảng giá trị bằng số dùng để chỉ các giá trị hoặc khoảng giá trị mà xấp xỉ hoặc gần với giá trị hoặc khoảng giá trị được chỉ ra sao cho phương án có thể thực hiện như dự định, như có lượng mong muốn của các axit nucleic hoặc các polypeptit trong hỗn hợp phản ứng, như được hiểu rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực từ các hướng dẫn có trong tài liệu này. Do đó, các thuật ngữ này bao gồm các giá trị ngoài những giá trị do lỗi hệ thống. Theo một số phương án, khoảng có nghĩa là cộng hoặc trừ 10% của lượng bằng số.

[0077] Các thuật ngữ "thể liên hợp thuốc-kháng thể," "thể liên hợp kháng thể," "thể liên hợp," "thể liên hợp miễn dịch," và "ADC" được sử dụng thay thế cho nhau, và dùng để chỉ hợp chất trị liệu (ví dụ, gốc eribulin) mà được liên kết với gốc kháng thể và được xác định bởi công thức chung: $Ab-(L-D)_p$ (Công thức I), trong đó Ab là gốc kháng thể (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên), L là gốc cầu nối, D là gốc thuốc (ví dụ, gốc thuốc eribulin), và p là số lượng của các gốc thuốc mỗi gốc kháng thể. Trong các ADC bao gồm gốc thuốc eribulin, " p " dùng để chỉ số lượng của các gốc eribulin được liên kết với gốc kháng thể. Trong một số phương án, cầu nối L có thể bao gồm gốc có thể phân cắt mà có thể hoặc liên kết trực tiếp với gốc kháng thể và với hợp chất trị liệu, hoặc gốc có thể phân cắt có thể được liên kết với một trong hai hoặc cả hai gốc

kháng thể và hợp chất trị liệu bởi (các) đơn vị đệm. Theo một số phương án, khi đơn vị đệm gắn gốc có thể phân cắt vào hợp chất trị liệu, nó là đơn vị đệm tự diệt.

[0078] Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch mà nhận diện và gắn đặc hiệu với mục tiêu, như protein, polypeptit, carbohydrat, polynucleotit, lipit, hoặc dạng kết hợp của các chất nêu trên thông qua ít nhất một vị trí nhận diện kháng nguyên trong vùng biến đổi của phân tử globulin miễn dịch. Chuỗi nặng của kháng thể được cấu thành từ miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng không đổi chuỗi nặng (CH). Chuỗi nhẹ được cấu thành từ miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và miền không đổi chuỗi nhẹ (CL). Đối với các mục đích của đơn này, các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trưởng thành mỗi trong số chúng bao gồm ba vùng xác định bổ sung (CDR1, CDR2 và CDR3) trong bốn vùng khung (FR1, FR2, FR3, và FR4) được sắp xếp từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. "Kháng thể" có thể có trong tự nhiên hoặc do con người tạo ra, chẳng hạn như kháng thể đơn dòng được sản xuất bằng công nghệ tế bào lai thông thường. Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ và các kháng thể đa dòng chiều dài đầy đủ, cũng như các mảnh kháng thể chẳng hạn như Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, và các kháng thể chuỗi đơn. Kháng thể có thể thuộc một trong năm lớp chính của globulin miễn dịch: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, hoặc các phân lớp của chúng (ví dụ như, các isotyp IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Thuật ngữ còn bao hàm các kháng thể người, các kháng thể khảm, các kháng thể được nhân hóa và phân tử globulin miễn dịch được cải biến bất kỳ chứa vị trí nhận biết kháng nguyên, miễn là nó chứng tỏ hoạt tính sinh học mong muốn.

[0079] Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng lẻ bao gồm quần thể giống nhau ngoại trừ các đột biến có thể xuất hiện trong tự nhiên mà có thể có mặt với các lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, được định hướng chống lại epitop có tính kháng nguyên đơn lẻ. Ngược lại, các chế phẩm kháng thể (đa dòng) thông thường thường bao gồm vô số kháng thể định hướng chống lại (hoặc đặc hiệu đối với) các epitop khác nhau. Từ bỏ nghĩa "đơn dòng" chỉ ra đặc điểm của kháng thể là thu được từ quần thể về cơ bản đồng nhất của kháng thể, và không được hiểu là đòi hỏi sự sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng cần được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương

pháp lai tế bào được mô tả lần đầu bởi Kohler et al. (1975) Nature 256:495, hoặc có thể được tạo ra bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567). Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân lập từ các thư viện kháng thể phage sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong Clackson et al. (1991) Nature 352:624-8, và Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97, ví dụ.

[0080] Các kháng thể đơn dòng được mô tả ở đây cụ thể là bao gồm các kháng thể "khảm", trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống hệt hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ các loài cụ thể hoặc thuộc về lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi giống hệt hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác hoặc thuộc vào lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như các mảnh của các kháng thể này, miễn là chúng gắn đặc hiệu kháng nguyên mục tiêu và/hoặc thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn.

[0081] Thuật ngữ "kháng thể khảm" như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ các kháng thể trong đó trình tự axit amin của phân tử globulin miễn dịch có nguồn gốc từ hai hoặc nhiều loài. Trong một số trường hợp, các vùng biến đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng với các vùng biến đổi của các kháng thể có nguồn gốc từ một loài với tính đặc hiệu, ái lực và hoạt tính mong muốn trong khi các vùng không đổi tương đồng với các kháng thể có nguồn gốc từ loài khác (ví dụ, con người) để giảm thiểu đáp ứng miễn dịch ở loài sau.

[0082] Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể được người hóa" dùng để chỉ các dạng kháng thể mà bao gồm các trình tự từ các kháng thể không phải ở người (ví dụ, ở thỏ) cũng như các kháng thể ở người. Các kháng thể này là các kháng thể khảm mà chứa các trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải ở người. Nói chung, kháng thể được người hóa bao gồm về cơ bản tất cả của ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vòng siêu biến đổi tương ứng với của globulin miễn dịch không phải ở người và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vùng khung (FR) là các vùng FR của trình tự globulin miễn dịch ở người. Kháng thể được làm cho giống người tùy ý còn có chứa ít nhất là một phần của vùng không đổi globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng không đổi của globulin miễn dịch ở người. Kháng thể được làm cho giống người có thể được cải biến thêm bằng sự thể của các gốc,

trong các vùng khung Fv và/hoặc ở trong các gốc không phải ở người được thay thế để làm tinh và tối ưu hóa tính đặc hiệu, ái lực, và/hoặc hoạt tính của kháng thể.

[0083] Thuật ngữ "mảnh gắn kháng nguyên", "miền gắn kháng nguyên" hoặc "phần gắn kháng nguyên" của kháng thể, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể hoặc protein giữ lại khả năng gắn đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, mesothelin). Các mảnh gắn kháng nguyên cũng có thể giữ lại khả năng nội hóa vào trong tế bào biểu hiện kháng nguyên. Trong một số phương án, các mảnh gắn kháng nguyên cũng giữ lại hoạt tính tác động miễn dịch. Đã chứng minh được rằng các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể thực hiện chức năng gắn kháng nguyên của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các ví dụ của các mảnh gắn được bao hàm trong thuật ngữ "mảnh gắn kháng nguyên", "miền gắn kháng nguyên" hoặc "phần gắn kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một gồm các miền VL, VH, CL, và CCH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được nối bằng cầu disulfit ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv gồm các miền VL và VH của tay đơn của kháng thể; (v) mảnh dAb, mà bao gồm miền biến đổi đơn lẻ, ví dụ, miền VH (xem, ví dụ, Ward et al. (1989) Nature 341:544-6; và công bố quốc tế số WO 1990/005144); và (vi) vùng xác định bổ sung (CDR) được phân lập. Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được kết hợp, sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng cầu nối tổng hợp mà cho phép chúng được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn lẻ trong đó các vùng VL và VH ghép đôi để tạo thành các phân tử hóa trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv)). Xem, ví dụ, Bird et al. (1988) Science 242:423-6; và Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83. Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được dự định được bao hàm ở trong thuật ngữ "mảnh gắn kháng nguyên" hoặc "phần gắn kháng nguyên" của kháng thể, và được biết đến trong lĩnh vực dưới dạng kiểu ví dụ của mảnh gắn mà có thể nội hóa vào trong tế bào khi gắn (xem, ví dụ, Zhu et al. (2010) 9:2131-41; He et al. (2010) J. Nucl. Med. 51:427-32; và Fitting et al. (2015) MAbs 7:390-402). Theo các phương án nhất định, phân tử scFv có thể được kết hợp vào protein dung hợp. Các dạng kháng thể chuỗi đơn khác, chẳng hạn như diabody cũng được bao hàm. Các kháng thể dime là các kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép trong đó các miền VH và VL được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn lẻ, nhưng sử dụng cầu nối quá ngắn để cho phép việc ghép cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi, do đó buộc các miền kết cặp với các miền

bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kháng nguyên (xem ví dụ, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-8; và Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-3). Các mảnh gắn kháng nguyên thu được sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và các mảnh gắn này được sàng lọc để sử dụng (ví dụ, ái lực gắn, sự nội hóa) theo cùng cách như các kháng thể nguyên vẹn. Các mảnh gắn kháng nguyên có thể được điều chế bằng sự phân cắt của protein nguyên vẹn, ví dụ, bằng proteaza hoặc sự phân cắt hóa học.

[0084] "Nội hóa" như được sử dụng ở đây khi tham chiếu đến kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên dùng để chỉ kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà có khả năng được đưa qua màng hai lớp lipid của tế bào vào ngăn bên trong (nghĩa là, "được nội hóa") khi gắn với tế bào, điển hình là vào khoang phân hủy trong tế bào. Ví dụ, kháng thể kháng mesothelin nội hóa là kháng thể có khả năng được đưa vào trong tế bào sau khi gắn với mesothelin trên màng tế bào. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được sử dụng trong các ADC được bộc lộ ở đây hướng mục tiêu kháng nguyên bề mặt tế bào (ví dụ, mesothelin) qua kháng thể nội hóa hoặc mảnh gắn kháng nguyên nội hóa (cho phép ADC chuyển qua màng tế bào sau khi gắn kháng nguyên).

[0085] Thuật ngữ "mesothelin" hoặc "MSLN," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ dạng nguyên bản bất kỳ của mesothelin ở người (MSLN). Thuật ngữ bao hàm mesothelin có chiều dài đầy đủ (ví dụ, Trình tự tham chiếu NCBI: AAC50348.1), cũng như dạng bất kỳ của mesothelin ở người mà được tạo thành từ việc xử lý tế bào. Thuật ngữ cũng bao hàm các biến thể có trong tự nhiên của mesothelin, bao gồm nhưng không giới hạn ở các biến thể ghép nối, các biến thể alen, và các dạng đồng dạng. MET có thể được phân lập từ người, hoặc có thể được sản xuất theo cách tái tổ hợp hoặc bằng các phương pháp tổng hợp. Thuật ngữ cũng có thể bao hàm biến thể tổng hợp bất kỳ mà kháng thể kháng mesothelin, ví dụ, kháng thể được bộc lộ ở đây và/hoặc mảnh gắn kháng nguyên, có thể gắn đặc hiệu.

[0086] Thuật ngữ "kháng thể kháng mesothelin" hoặc "kháng thể mà gắn đặc hiệu mesothelin" dùng để chỉ bất kỳ dạng kháng thể hoặc mảnh của nó mà gắn đặc hiệu với mesothelin và bao hàm các kháng thể đơn dòng (bao gồm các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ), các kháng thể đa dòng và các mảnh kháng thể chức năng sinh học miễn là chúng gắn đặc hiệu mesothelin. Trong một số phương án, kháng thể kháng

mesothelin được sử dụng trong các ADC được bộc lộ ở đây là kháng thể nội hóa hoặc mảnh kháng thể nội hóa. 345A12 (ví dụ, 345A12-HC15-LC4) và 102A6A2 là các kháng thể kháng mesothelin ở người nội hóa. Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "đặc hiệu", "gắn đặc hiệu" và "gắn một cách đặc hiệu" dùng để chỉ việc gắn chọn lọc của kháng thể với biểu mô kháng nguyên đích. Các kháng thể có thể được thử nghiệm về tính đặc hiệu của việc gắn bằng cách so sánh việc gắn với kháng nguyên thích hợp với việc gắn với kháng nguyên không liên quan hoặc hỗn hợp kháng nguyên trong tập các điều kiện nhất định. Nếu kháng thể gắn với kháng nguyên thích hợp với ái lực nhiều hơn ít nhất 2, 5, 7 hoặc 10 lần so với kháng nguyên hoặc hỗn hợp kháng nguyên không liên quan, thì nó được coi là đặc hiệu. "Kháng thể đặc hiệu" hoặc "kháng thể đặc hiệu mục tiêu" là kháng thể mà chỉ gắn với kháng nguyên mục tiêu (ví dụ, mesothelin), mà không gắn (hoặc thể hiện sự gắn tối thiểu) với các kháng nguyên khác.

[0087] Thuật ngữ "epitop" dùng để chỉ phần của kháng nguyên có khả năng được nhận biết và được gắn đặc hiệu bởi kháng thể. Khi kháng nguyên là polypeptit, các epitop tế bào B có thể được tạo thành từ các axit amin liên kế hoặc các axit amin không liên kế được để gần nhau bởi sự cuộn gấp bậc ba của polypeptit đó. Epitop được gắn bởi kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật lập bản đồ epitop bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, bao gồm tinh thể học tia X để xác định epitop bằng cách trực quan hóa trực tiếp phức hợp kháng nguyên-kháng thể, cũng như là giám sát việc gắn của kháng thể với các mảnh hoặc các dạng biến đổi đột biến của kháng nguyên, hoặc giám sát khả năng tiếp cận dung môi của các phần khác nhau của kháng thể và kháng nguyên. Các chiến lược ví dụ dùng để lập bản đồ các epitop kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, quét oligo-peptit dựa trên mảng, phân giải protein hạn chế, gây đột biến định hướng vị trí, lập bản đồ gây đột biến thông lượng cao, trao đổi hydro-đoteri, và đo khối phổ (xem, ví dụ, Gershoni et al. (2007) 21:145-56; và Hager-Braun and Tomer (2005) Expert Rev. Proteomics 2:745-56).

[0088] Việc gắn cạnh tranh và tạo nhóm epitop cũng có thể được sử dụng để xác định các kháng thể chia sẻ các epitop giống hệt hoặc chồng lấp. Việc gắn cạnh tranh có thể được đánh giá sử dụng thử nghiệm chặn chéo, chẳng hạn như thử nghiệm được mô tả trong "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane (ấn bản thứ 1 1988, ấn bản thứ 2 2014). Theo một số phương án, việc gắn cạnh tranh được xác định khi kháng thể hoặc protein gắn thử nghiệm làm giảm sự gắn của

kháng thể hoặc protein gắn tham chiếu với kháng nguyên mục tiêu như mesothelin (ví dụ, protein gắn bao gồm các CDR và/hoặc các miền biến đổi được lựa chọn từ các CDR và/hoặc các miền biến đổi được xác định trong các Bảng 1-3), bởi ít nhất khoảng 50% trong thử nghiệm chặn chéo (ví dụ, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, hoặc nhiều hơn, hoặc tỷ lệ phần trăm bất kỳ ở giữa), và/hoặc ngược lại. Theo một số phương án, việc gắn cạnh tranh có thể là do các epitop chung nhau hoặc tương tự (ví dụ, gồi lên nhau một phần), hoặc do sự cản trở không gian khi các kháng thể hoặc các protein gắn gắn tại các epitop lân cận (xem, ví dụ, Tzartos, *Methods in Molecular Biology* (Morris, ed. (1998) vol. 66, pp. 5566)). Theo một số phương án, sự liên kết cạnh tranh có thể được sử dụng để phân loại các nhóm của protein liên kết mà có chung các epitop tương tự. Ví dụ như, các protein liên kết mà cạnh tranh để liên kết có thể được "gom lại" dưới dạng nhóm của các protein liên kết mà có các epitop gồi lên nhau hoặc ở gần nhau, trong khi các protein liên kết mà không cạnh tranh được đặt trong nhóm riêng rẽ của protein liên kết mà không có các epitop gồi lên nhau hoặc ở gần nhau.

[0089] Thuật ngữ " k_{on} " hoặc " k_a " dùng để chỉ hằng số tốc độ liên kết cho sự kết hợp của kháng thể với kháng nguyên để tạo thành phức hợp kháng thể/kháng nguyên. Tốc độ này có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn, như cộng hưởng plasmon bề mặt, phép đo độ cản trở lớp sinh học, hoặc thử nghiệm ELISA.

[0090] Thuật ngữ " k_{off} " hoặc " k_d " dùng để chỉ hằng số tốc độ phân ly cho sự phân ly của kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên. Tốc độ này có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn, như cộng hưởng plasmon bề mặt, phép đo độ cản trở lớp sinh học, hoặc thử nghiệm ELISA.

[0091] Thuật ngữ " K_D " dùng để chỉ hằng số cân bằng phân ly của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. K_D được tính bằng k_a/k_d . Tốc độ này có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn, chẳng hạn như cộng hưởng plasmon bề mặt, phép đo độ cản trở lớp sinh học, hoặc thử nghiệm ELISA.

[0092] Thuật ngữ " p " hoặc "tải lượng thuốc" hoặc "tỷ lệ thuốc:kháng thể" hoặc "tỷ lệ thuốc-với-kháng thể" hoặc "DAR" dùng để chỉ số lượng của các gốc thuốc mỗi gốc kháng thể, nghĩa là, tải lượng thuốc, hoặc số lượng của các gốc -L-D mỗi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên (Ab) trong các ADC có Công thức (I). Trong các ADC bao gồm gốc thuốc eribulin, " p " dùng để chỉ số lượng của các gốc eribulin được liên kết với

gốc kháng thể. Ví dụ, nếu hai gốc eribulin được liên kết với gốc kháng thể, $p = 2$. Trong các chế phẩm bao gồm nhiều bản sao của các ADC có Công thức (I), " p trung bình" dùng để chỉ số trung bình của các gốc -L-D mỗi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong quần thể của các ADC, cũng được gọi là "tải lượng thuốc trung bình."

[0093] "Cầu nối" hoặc "gốc cầu nối" được sử dụng ở đây dùng để chỉ gốc hóa học bất kỳ mà có khả năng liên kết cộng hóa trị hợp chất, thường là gốc thuốc chẳng hạn như eribulin, với gốc khác chẳng hạn như gốc kháng thể. Các cầu nối có thể nhạy cảm với hoặc về cơ bản kháng sự phân cắt được gây ra bởi axit, sự phân cắt được gây ra bởi peptidaza, sự phân cắt dựa trên ánh sáng, sự phân cắt được gây ra bởi esteraza, và/hoặc sự phân cắt liên kết disulfit, ở các điều kiện mà trong đó hợp chất hoặc kháng thể vẫn duy trì hoạt tính.

[0094] Thuật ngữ "tác nhân" được sử dụng ở đây dùng để chỉ hợp chất hóa học, hỗn hợp của các hợp chất hóa học, đại phân tử sinh học, hoặc chất chiết được tạo ra từ các nguyên liệu sinh học. Thuật ngữ "tác nhân trị liệu" hoặc "thuốc" dùng để chỉ tác nhân mà có khả năng điều biến quy trình sinh học và/hoặc có hoạt tính sinh học. Eribulin monome được mô tả ở đây là tác nhân trị liệu ví dụ.

[0095] Thuật ngữ "tác nhân hóa trị liệu" hoặc "tác nhân chống ung thư" được sử dụng ở đây là đề cập đến tất cả các tác nhân mà hữu hiệu trong việc điều trị ung thư bất kể cơ chế hoạt động nào. Sự ức chế di căn hoặc hình thành mạch thường là đặc tính của tác nhân hóa trị liệu. Các tác nhân hóa trị liệu bao gồm các kháng thể, các phân tử sinh học, và các phân tử nhỏ, và bao hàm eribulin, như được mô tả ở đây. Tác nhân hóa trị liệu có thể là tác nhân gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào. Thuật ngữ "tác nhân kìm hãm tế bào" dùng để chỉ tác nhân mà ức chế hoặc kìm hãm sự sinh trưởng tế bào và/hoặc sự nhân lên của các tế bào. Thuật ngữ "tác nhân gây độc tế bào" dùng để chỉ chất mà gây ra sự chết tế bào chủ yếu bằng cách can thiệp vào hoạt động biểu hiện và/hoặc thực hiện chức năng của tế bào.

[0096] Thuật ngữ "eribulin" hoặc "eribulin monome," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ chất tương tự tổng hợp của halichondrin B, hợp chất macrocyclic mà được phân lập ban đầu từ bọt biển *Halichondria okadae*. Eribulin là chất ức chế động lực học vi ống, được cho là gắn với tubulin và gây ra sự bắt giữ chu kỳ tế bào ở pha G2/M bằng cách ức chế sự lắp ráp thoi phân bào. Thuật ngữ "eribulin mesylat" dùng để chỉ muối

mesylat của eribulin, được bán trên thị trường với tên thương mại Halaven™. Các chất tương tự eribulin ví dụ bao gồm các chất được thể hiện và mô tả trong patent Mỹ số 6,214,865 và patent Mỹ số 6,653,341, mà được kết hợp ở đây bằng việc tham chiếu các cấu trúc eribulin được bộc lộ và các phương pháp tổng hợp các cấu trúc này.

[0097] Thuật ngữ "eribulin dime," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ dạng dime của eribulin trong đó hai eribulin monome được liên kết qua liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị hoặc trực tiếp hoặc bởi cầu nối hóa học (ví dụ, amin bậc hai, amin bậc hai dihydroxyl). Các eribulin dime có thể, trong một số phương án, bao gồm hai eribulin monome được nối cộng hóa trị ở vị trí C-34 bởi amin bậc hai, hoặc hai eribulin monome được nối cộng hóa trị ở vị trí C-35 bởi amin bậc hai dihydroxyl. Eribulin dime bao gồm hai eribulin monome được nối cộng hóa trị ở vị trí C-34 bởi amin bậc hai có thể được gọi ở đây là "desOH eribulin dime." Eribulin dime bao gồm hai eribulin monome được nối cộng hóa trị ở vị trí C-35 bởi amin bậc hai dihydroxyl có thể được gọi ở đây là "diOH eribulin dime." Thuật ngữ "gốc thuốc eribulin dime" dùng để chỉ thành phần của ADC hoặc chế phẩm mà cung cấp cấu trúc của eribulin dime, ví dụ, thành phần eribulin dime (D) trong ADC có Công thức (I), hoặc trong chế phẩm bao gồm -L-D. Trong một số phương án, desOH eribulin dime và/hoặc diOH eribulin dime cung cấp khả năng liên hợp được cải thiện đối với các định dạng eribulin dime khác.

[0098] Thuật ngữ "cryptophycin," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ cryptophycin-1, hợp chất macrolit mà được phân lập ban đầu từ vi khuẩn lam Nostoc, hoặc chất tương tự tổng hợp bất kỳ của nó duy trì hoạt tính kháng tubulin. Các chất tương tự cryptophycin ví dụ bao gồm các chất được thể hiện và được mô tả trong công bố quốc tế số WO 2017/136769, mà được kết hợp ở đây bằng việc tham chiếu cho tất cả các cấu trúc cryptophycin được bộc lộ của nó và các phương pháp được tổng hợp các cấu trúc này. Thuật ngữ "gốc thuốc cryptophycin" dùng để chỉ thành phần của ADC hoặc chế phẩm mà có cấu trúc của cryptophycin.

[0099] Thuật ngữ "tương đồng" dùng để chỉ phân tử mà thể hiện sự tương đồng với phân tử khác, bởi ví dụ, có các trình tự của các gốc hóa học mà giống hoặc tương tự ở các vị trí tương ứng.

[00100] Thuật ngữ "ức chế" hoặc "sự ức chế của," như được sử dụng ở đây, có nghĩa là làm giảm lượng có thể đo được, và có thể bao gồm nhưng không đòi hỏi sự ngăn chặn hoặc sự ức chế hoàn toàn.

[00101] Thuật ngữ "tiêu diệt tế bào xung quanh" hoặc "tác dụng lên tế bào xung quanh" để chỉ sự tiêu diệt các tế bào âm tính với mục tiêu trong sự có mặt của tế bào dương tính với mục tiêu, trong đó sự tiêu diệt các tế bào âm tính với mục tiêu không được quan sát thấy khi không có mặt các tế bào dương tính với mục tiêu. Sự tiếp xúc giữa tế bào với tế bào, hoặc ít nhất sự gần gũi giữa các tế bào dương tính với mục tiêu và âm tính với mục tiêu, cho phép tiêu diệt tế bào xung quanh. Kiểu tiêu diệt này có thể phân biệt với "tiêu diệt lệch mục tiêu," mà dùng để chỉ sự tiêu diệt bừa bãi của tế bào âm tính với mục tiêu. "Tiêu diệt lệch mục tiêu" có thể được quan sát thấy khi không có mặt tế bào dương tính với mục tiêu.

[00102] Thuật ngữ "ung thư" dùng để chỉ tình trạng lý sinh ở động vật có vú trong đó quần thể các tế bào được đặc trưng bởi sự sinh trưởng tế bào mất kiểm soát. Các ví dụ của các ung thư bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ung thư biểu mô, u lympho, u nguyên bào, u bướu và bệnh bạch cầu. Các ví dụ cụ thể của các ung thư bao gồm ung thư biểu hiện mesothelin, chẳng hạn như ung thư trung biểu mô, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư đại trực tràng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư đầu và cổ, ung thư gan, ung thư phổi (ví dụ, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ), ung thư buồng trứng (ví dụ, ung thư buồng trứng huyết thanh, tế bào rỗng, hoặc biểu mô), ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư dạ dày, ung thư tuyến giáp, ung thư biểu mô, ung thư tử cung, ung thư ống mật hoặc bệnh bạch cầu.

[00103] Các thuật ngữ "khối u" và "u" dùng để chỉ khối lượng mô bất kỳ mà bắt nguồn từ sự phát triển hoặc sự tăng sinh tế bào quá mức, lành tính hoặc ác tính, bao gồm các tổn thương tiền ung thư.

[00104] Các thuật ngữ "tế bào khối u" dùng để chỉ các tế bào riêng lẻ hoặc tổng quần thể các tế bào có nguồn gốc từ khối u, bao gồm cả các tế bào không tạo khối u và tế bào gốc ung thư. Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào khối u" sẽ được cải biến bằng thuật ngữ "không tạo khối u" khi chỉ đề cập đến các tế bào khối u thiếu khả năng đổi mới và biệt hóa để phân biệt các tế bào khối u này với các tế bào gốc ung thư.

[00105] Các thuật ngữ "đối tượng" và "bệnh nhân" được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây dùng để chỉ động vật bất kỳ, chẳng hạn như động vật có vú bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, con người, các loài linh trưởng không phải là người, các loài gặm nhấm, và tương tự. Theo một số phương án, động vật có vú là chuột nhắt. Theo một số phương án, động vật có vú là người.

[00106] “Dược phẩm” dùng để chỉ chế phẩm mà ở dạng cho phép dùng và sau đó tạo ra hoạt tính sinh học dự kiến của (các) thành phần hoạt tính và/hoặc đạt được tác dụng trị liệu, và không chứa các thành phần bổ sung mà gây độc ở mức không chấp nhận được cho đối tượng mà chế phẩm này sẽ được dùng cho. Dược phẩm có thể vô trùng.

[00107] “Tá dược dược phẩm” bao gồm nguyên liệu như chất bổ trợ, chất mang, chất đệm và điều chỉnh độ pH, chất điều chỉnh trương lực, chất làm ướt, chất bảo quản, và tương tự.

[00108] “Dược dụng” có nghĩa là đã được phê chuẩn hoặc có thể được phê chuẩn bởi cơ quan quản lý của Chính quyền liên bang hoặc tiểu bang hoặc được liệt kê trong Dược Điển Hoa Kỳ hoặc dược điển được công nhận chung khác để sử dụng ở động vật, và cụ thể hơn là ở người.

[00109] "Lượng hữu hiệu" của, ví dụ, kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc ADC như được bộc lộ ở đây là lượng đủ để thực hiện mục đích đã nêu cụ thể, ví dụ để tạo ra hiệu quả trị liệu sau khi dùng, chẳng hạn như việc giảm tỷ lệ phát triển khối u hoặc thể tích khối u, giảm triệu chứng ung thư hoặc một số dấu hiệu khác về hiệu quả điều trị. Lượng hữu hiệu có thể được xác định theo phương thức thông thường liên quan đến mục đích đã được nêu ra. Thuật ngữ "lượng hữu hiệu trị liệu" dùng để chỉ lượng kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc ADC hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng. Trong trường hợp ung thư, lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc ADC có thể làm giảm số lượng các tế bào ung thư, giảm kích thước khối u, ức chế (ví dụ, làm chậm hoặc ngăn chặn) sự di căn của khối u, ức chế (ví dụ, làm chậm hoặc ngừng) sự phát triển của khối u, và/hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng. "Lượng hữu hiệu để phòng ngừa" là lượng hữu hiệu, ở các liều dùng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng ngừa mong muốn. Thông thường, vì liều lượng phòng ngừa được sử dụng cho các đối tượng ở thời điểm trước

hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh, lượng hữu hiệu để phòng ngừa sẽ thấp hơn lượng hữu hiệu để điều trị.

[00110] Như được sử dụng ở đây, "điều trị" hoặc "trị liệu" và các thuật ngữ có liên quan về mặt ngữ pháp, để chỉ sự cải thiện bất kỳ của hậu quả bất kỳ của bệnh, như khả năng sống được kéo dài, tỷ lệ tử vong thấp hơn, và/hoặc giảm các tác dụng phụ mà là các sản phẩm phụ của phương thức điều trị thay thế. Như được hiểu rõ trong lĩnh vực này, việc triệt tiêu hoàn toàn bệnh được bao hàm nhưng không nhất thiết đối với hoạt động điều trị. "Việc điều trị" hoặc "điều trị," như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ việc dùng của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC được mô tả cho đối tượng, ví dụ, bệnh nhân. Việc điều trị có thể là chữa khỏi, làm lành, làm giảm bớt, làm thuyên giảm, làm thay đổi, cứu chữa, làm cho tốt hơn, làm dịu, cải thiện hoặc ảnh hưởng đến rối loạn, các triệu chứng của rối loạn hoặc khuynh hướng đối với rối loạn, ví dụ, ung thư. Theo một số phương án, ngoài việc điều trị đối tượng có tình trạng bệnh, hợp phần được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được cung cấp để phòng ngừa để ngăn ngừa hoặc làm giảm khả năng phát triển tình trạng đó.

[00111] Trong một số phương án, kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC được dán nhãn được sử dụng. Các "nhãn" thích hợp bao gồm nuclit phóng xạ, enzym, chất nền, đồng yếu tố, chất ức chế, gốc huỳnh quang, gốc phát quang hóa học, hạt từ tính và tương tự.

[00112] "Protein," như được sử dụng ở đây, có nghĩa là ít nhất hai axit amin được liên kết cộng hóa trị. Thuật ngữ này bao hàm polypeptit, oligopeptit, và peptit. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều axit amin được liên kết cộng hóa trị được liên kết bằng liên kết peptit. Protein có thể được tạo thành từ các axit amin và các liên kết peptit có trong tự nhiên, ví dụ khi protein được tạo ra theo cách tái tổ hợp sử dụng các hệ thống biểu hiện và các tế bào chủ. Mặt khác, protein có thể bao gồm các axit amin tổng hợp (ví dụ, homophenylalanin, xitrulin, ornithin, và norleuxin). "Protein tái tổ hợp" là protein được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp bằng các kỹ thuật và phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, nghĩa là thông qua sự biểu hiện của axit nucleic tái tổ hợp. Các phương pháp và các kỹ thuật để sản xuất các protein tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực.

[00113] Đối với các trình tự axit amin, độ tương đồng và/hoặc độ tương tự trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực, bao

gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thuật toán xác định độ tương đồng trình tự cục bộ của Smith và Waterman (1981) *Adv Appl. Math.* 2:482, thuật toán căn chỉnh độ tương đồng trình tự của Needleman và Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, phương pháp tìm kiếm sự tương đồng của Pearson và Lipman (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:2444, việc triển khai máy tính hóa các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA và TFASTA trong Gói phần mềm di truyền Wisconsin, Nhóm máy tính di truyền, 575 Science Drive, Madison, Wis.), chương trình trình tự Best Fit được mô tả bởi Devereux et al. (1984) *Nucl. Acid Res.* 12:387-95, ví dụ, bằng cách sử dụng cài đặt mặc định hoặc bằng cách kiểm tra. Trong một số phương án, phần trăm độ tương đồng được tính toán bằng FastDB dựa trên các thông số sau đây: phạt bắt cặp nhầm bằng 1; phạt chỗ cách quãng bằng 1; phạt kích thước chỗ cách quãng bằng 0,33; và phạt kết hợp bằng 30 ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc).

[00114] Nói chung, sự tương đồng, sự tương tự hoặc sự đồng nhất axit amin giữa các protein được bộc lộ ở đây và các biến thể của chúng, bao gồm các biến thể của các kháng nguyên mục tiêu (chẳng hạn như mesothelin), các biến thể của các trình tự tubulin, và các biến thể của các miền biến đổi kháng thể (bao gồm các CDR biến thể riêng lẻ), là ít nhất 80% đối với các trình tự được mô tả ở đây, ví dụ, các độ tương đồng hoặc các độ đồng nhất là ít nhất 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, gần như 100% hoặc 100%.

[00115] Theo cách tương tự, "phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit nucleic" đối với trình tự axit nucleic của các kháng thể và các protein khác được xác định ở đây được định nghĩa dưới dạng phần trăm của các gốc nucleotit trong trình tự ứng viên mà giống hệt với các gốc nucleotit trong trình tự mã hóa của protein gắn kháng nguyên. Phương pháp cụ thể sử dụng môđun BLASTN của WU-BLAST-2 thiết đặt ở các thông số mặc định, với khoảng gộp và đoạn gộp được thiết đặt ở 1 và 0,125, một cách tương ứng.

[00116] Mặc dù vị trí hoặc vùng để thêm sự biến đổi trình tự axit amin đã được xác định từ trước, thực chất là đột biến không cần phải được xác định từ trước. Ví dụ, để tối ưu hóa hiệu quả của đột biến tại vị trí nhất định, sự gây đột biến ngẫu nhiên có thể được tiến hành ở bộ ba mã hóa hoặc vùng mục tiêu và các biến thể CDR protein gắn kháng nguyên được biểu hiện được sàng lọc đối với sự kết hợp tối ưu của hoạt tính mong muốn. Các kỹ thuật tạo các đột biến thể tại các vị trí được xác định trước trong ADN có trình

tự đã biết được biết rõ, ví dụ, sự gây đột biến đoạn đoạn mồi MI3 và sự gây đột biến PCR.

Các kháng thể và các mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin

[00117] Sáng chế đề cập, trong các phương án khác nhau, đến các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó có khả năng gắn và/hoặc tiêu diệt các tế bào khối u (ví dụ, các tế bào khối u biểu hiện mesothelin), cũng như việc sử dụng của chúng trong các thể liên hợp và các chế phẩm trị liệu.

[00118] Trong một số phương án, các kháng thể cũng có thể được sử dụng riêng lẻ, được dùng như một phần của các dược phẩm hoặc các liệu pháp kết hợp, và/hoặc như gốc kháng thể trong ADC. Trong một số phương án, các kháng thể kháng mesothelin và các mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây chính chúng là hữu dụng (nghĩa là, ở dạng không được liên hợp) và dưới dạng gốc kháng thể trong ADC. Trong một số phương án, các kháng thể kháng mesothelin và các mảnh gắn kháng nguyên được người hóa. Trong một số phương án, các kháng thể kháng mesothelin và các mảnh gắn kháng nguyên chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải ở người và giữ lại khả năng phản ứng của kháng thể không phải ở người (ví dụ, thỏ) trong khi ít gây miễn dịch hơn ở người. Trong một số phương án, các kháng thể kháng mesothelin và các mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây cung cấp một hoặc nhiều trong số độ ổn định được cải thiện, khả năng tạo công thức, độ kết tụ, ái lực gắn, hiệu quả trị liệu, khả năng gây độc ngoài mục tiêu và/hoặc cấu hình chuyển hóa so sánh với một hoặc nhiều kháng thể kháng mesothelin được biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

[00119] Trong các phương án khác nhau, các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây gắn đặc hiệu với mesothelin, ví dụ, như được biểu hiện trên tế bào ung thư. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có thể gắn với kháng nguyên đích với hằng số phân ly (K_D) là ≤ 1 mM, ≤ 100 nM hoặc ≤ 10 nM, hoặc lượng bất kỳ ở giữa, như được đo bởi, ví dụ, phân tích BIAcore®. Theo các phương án nhất định, K_D nằm trong khoảng từ 1 pM đến 500 pM. Theo một số phương án, K_D nằm trong khoảng từ 500 pM đến 1 μ M, từ 1 μ M đến 100 nM hoặc từ 100 mM đến 10 nM.

[00120] Trong một số phương án, gốc kháng thể là kháng thể bốn chuỗi (cũng được gọi là globulin miễn dịch), bao gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. Trong một số

phương án gốc kháng thể là nửa kháng thể hai chuỗi (một chuỗi nhẹ và một chuỗi nặng), hoặc mảnh gắn kháng nguyên của globulin miễn dịch.

[00121] Trong một số phương án, gốc kháng thể là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Trong một số phương án, gốc kháng thể là kháng thể nội hóa hoặc mảnh gắn kháng nguyên nội hóa của nó. Trong một số phương án, kháng thể nội hóa hoặc mảnh gắn kháng nguyên nội hóa của nó gắn với kháng nguyên ung thư mục tiêu được biểu hiện trên bề mặt của tế bào và đi vào tế bào khi gắn. Trong một số phương án, gốc thuốc eribulin của ADC được giải phóng từ gốc kháng thể của ADC sau khi ADC đi vào và có mặt trong tế bào biểu hiện kháng nguyên ung thư mục tiêu (nghĩa là, sau khi ADC đã được nội hóa).

[00122] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây có thể bao gồm tập được ghép cặp của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và nặng được lấy từ phần được liệt kê trong các Bảng 3-5, hoặc tập của sáu trình tự CDR từ tập chuỗi nhẹ và nặng được ghép cặp, ví dụ, tập của các CDR được liệt kê trong các Bảng 1-2. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên ngoài ra còn bao gồm các khung chuỗi nhẹ và nặng ở người (tùy ý với một hoặc nhiều đột biến ngược để cải thiện ái lực gắn) và/hoặc các miền không đổi chuỗi nhẹ và nặng ở người hoặc các mảnh của chúng. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có thể bao gồm miền không đổi chuỗi nặng IgG ở người (chẳng hạn như IgG1) và miền không đổi chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda ở người. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền không đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch G kiểu phụ 1 (IgG1) ở người với miền không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người.

[00123] Amino axit và các trình tự axit nucleic của các kháng thể ví dụ theo sáng chế được quy định trong các Bảng 1-10.

Bảng 1. Các trình tự axit amin của các CDR Kabat cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit amin
345A12- HC15-LC4	HC CDR1	1	SYAMS
	HC CDR2	2	VIDISGNRFYADWVKG

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit amin
	HC CDR3	3	VDSRAWGPFNL
	LC CDR1	4	QASQSIFSYLA
	LC CDR2	5	DASDLAS
	LC CDR3	6	QQGYTRSDVDNA

Bảng 2. Các trình tự axit amin của các CDR IMGT cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự amino axit
345A12- HC15-LC4	HC CDR1	7	GIDLSSYA
	HC CDR2	8	IDISGNR
	HC CDR3	9	ARVDSRAWGPFNL
	LC CDR1	10	QSIFSY
	LC CDR2	11	DAS
	LC CDR3	12	QQGYTRSDVDNA

Bảng 3. Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit amin
345A12- HC15-LC4	Chuỗi nặng	13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGI DLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGVIDI SGNRFYADWVKGRFTISRDN SKNTLY LQMSSLRAEDTAVYYCARVDSRAWG PFNLWGQGT LVT VSS

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit amin
	Chuỗi nhẹ	14	DYQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ SIFSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQCED AATYYCQQGYTRSDVDNAFGGGTKV EIK

Bảng 4. Các trình tự axit amin của các vùng không đổi cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	Vùng hằng định	SEQ ID	Trình tự axit amin
345A12-HC15-LC4	Chuỗi nặng	IgG1 của người	15	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Chuỗi nhẹ	Ig kappa ở người	16	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD

				YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
--	--	--	--	-----------------------------------

Bảng 5. Các trình tự axit amin của các chuỗi Ig kháng thể chiều dài đầy đủ cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit amin
345A12- HC15-LC4	Chuỗi nặng	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GIDLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGV IDISGNRFYADWVKGRFTISRDN SKN TLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVDSR AWGPFNLWGQGT LVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
	Chuỗi nhẹ	18	DYQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS QSIFSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDAS DLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ CEDAATYYCQQGYTRSDVDNAFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSS

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit amin
			TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

Bảng 6. Các trình tự axit nucleic mã hóa các CDR Kabat cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
345A12- HC15-LC4	HC CDR1	19	TCCTACGCCATGTCC
	HC CDR2	20	GTGATCGACATCTCCGGCAACCGGT TCTACGCCGACTGGGTGAAGGGC
	HC CDR3	21	GTGGACTCTAGAGCCTGGGGCCCCT TCAACCTG
	LC CDR1	22	CAGGCCTCCCAGTCCATCTTCTCCT ACCTGGCC
	LC CDR2	23	GACGCCTCTGATCTGGCCTCC
	LC CDR3	24	CAGCAGGGCTACACCAGATCCGAC GTGGACAACGCC

Bảng 7. Các trình tự axit nucleic mã hóa các CDR IMGT cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
345A12- HC15-LC4	HC CDR1	25	GGAATCGACCTGTCCTCCTACGCC
	HC CDR2	26	ATCGACATCTCCGGCAACCGG
	HC CDR3	27	GCCAGAGTGGACTCTAGAGCCTGG GGCCCCCTTCAACCTG

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
	LC CDR1	28	CAGTCCATCTTCTCCTAC
	LC CDR2	29	GACGCCTCT
	LC CDR3	30	CAGCAGGGCTACACCAGATCCGAC GTGGACAACGCC

Bảng 8. Các trình tự axit nucleic mã hóa các vùng biến đổi cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
345A12- HC15-LC4	Chuỗi nặng	31	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGTGG CGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGATCCC TGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGA ATCGACCTGTCCTCCTACGCCATGTCC TGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGG CCTGGAATGGATCGGCGTGATCGACA TCTCCGGCAACCGGTTCTACGCCGACT GGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCC AGAGACAACCTCCAAGAACACCCTGTA CCTCCAGATGTCCTCCCTGCGGGCCG AGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCC AGAGTGGACTCTAGAGCCTGGGGCCC CTTCAACCTGTGGGGCCAGGGAACAC TCGTGACCGTGTCTCT

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
	Chuỗi nhẹ	32	GATTACCAGATGACCCAGTCCCCCTC CAGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACA GAGTGACCATCACCTGTCAGGCCTCC CAGTCCATCTTCTCCTACCTGGCCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCC CAAGCTGCTGATCTACGACGCCTCTG ATCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCTAGAT TCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACT TTACCCTGACCATCAGCTCCCTCCAGT GCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGC CAGCAGGGCTACACCAGATCCGACGT GGACAACGCCTTTGGCGGAGGCACCA AGGTGGAAATCAAA

Bảng 9. Các trình tự axit nucleic mã hóa các vùng không đổi cho kháng thể kháng mesothelin

mAb	Chuỗi IgG	Vùng hằng định	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
345A12-HC15-LC4	Chuỗi nặng	IgG1 của người	33	GCATCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT

				GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAAC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CTTATATTCAAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
--	--	--	--	---

				TGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCCGGGAAATGA
	Chuỗi nhẹ	Ig kappa ở người	34	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGTTGA

Bảng 10. Các trình tự axit nucleic mã hóa các chuỗi Ig kháng thể chiều dài đầy đủ cho kháng thể kháng mesothelin⁺

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
345A12- HC15-LC4	Chuỗi nặng	35	CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGT GGCGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGA TCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCT CCGGAATCGACCTGTCCTCCTACGC CATGTCCTGGGTGCGACAGGCTCCT GGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGC GTGATCGACATCTCCGGCAACCGGT TCTACGCCGACTGGGTGAAGGGCC GGTTCACCATCTCCAGAGACAACCTC

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
			CAAGAACACCCTGTACCTCCAGATG TCCTCCCTGCGGGCCGAGGATACCG CCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGGA CTCTAGAGCCTGGGGCCCCCTTCAAC CTGTGGGGCCAGGGAACACTCGTG ACCGTGTCTCTGCATCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACCTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
			CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCCGGGAAATGA
	Chuỗi nhẹ	36	GATTACCAGATGACCCAGTCCCCCT CCAGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCC TCCCAGTCCATCTTCTCCTACCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCA AGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGA CGCCTCTGATCTGGCCTCCGGCGTG CCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCT CTGGCACCGACTTTACCCTGACCAT CAGCTCCCTCCAGTGCAGAGGATGCC GCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCT ACACCAGATCCGACGTGGACAACG CCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGG AAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC

mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID	Trình tự axit nucleic
			CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTGA

⁺ Các trình tự axit nucleic được liệt kê không bao gồm các trình tự dẫn đầu.

[00124] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được bộc lộ ở đây gắn với mesothelin ở người và bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[00125] Trong một số phương án, mảnh gắn kháng nguyên hoặc kháng thể được bộc lộ ở đây gắn với mesothelin ở người và bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR) bao gồm các trình tự amino axit của SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT.

[00126] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ, trong đó các CDR

bao gồm không nhiều hơn một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu việc bổ sung, việc xóa hoặc việc thế axit amin của HCDR1 (SEQ ID NO: 1 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO: 7 theo IMGT), HCDR2 (SEQ ID NO: 2 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO: 8 theo IMGT), HCDR3 (SEQ ID NO: 3 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO: 9 theo IMGT); và LCDR1 (SEQ ID NO: 4 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO: 10 theo IMGT), LCDR2 (SEQ ID NO: 5 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO: 11 theo IMGT), và LCDR3 (SEQ ID NO: 6 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO: 12 theo IMGT).

[00127] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin được người hóa. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải ở người và giữ lại khả năng phản ứng của kháng thể không phải ở người (ví dụ, thỏ) trong khi ít gây miễn dịch hơn ở người. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin tạo ra một hoặc nhiều trong số độ ổn định được cải thiện, khả năng tạo công thức, ái lực gắn, hiệu quả trị liệu, và/hoặc các mức kết tụ được giảm như được so sánh với một hoặc nhiều các kháng thể kháng mesothelin thay thế.

[00128] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 hoặc trình tự mà tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 13, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14 hoặc trình tự mà tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 14. Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15 hoặc trình tự mà tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 15, và/hoặc vùng không đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16 hoặc trình tự mà tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 16.

[00129] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng có SEQ ID NO: 17 hoặc trình tự mà tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 17, và/hoặc trình tự axit amin chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 18 hoặc trình tự mà tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 18.

[00130] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm miền không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người và miền không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người.

[00131] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 19 (HCDR1), SEQ ID NO: 20 (HCDR2), và SEQ ID NO: 21 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 22 (LCDR1), SEQ ID NO: 23 (LCDR2), và SEQ ID NO: 24 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 25 (HCDR1), SEQ ID NO: 26 (HCDR2), và SEQ ID NO: 27 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 28 (LCDR1), SEQ ID NO: 29 (LCDR2), và SEQ ID NO: 30 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT.

[00132] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 31, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 32.

[00133] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 33 và vùng không đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 34.

[00134] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 35, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự axit nucleic có SEQ ID NO: 36.

[00135] Trong các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin là 345A12-HC15-LC4.

[00136] Các miền gắn kháng nguyên kháng mesothelin được mô tả ở đây có thể được sử dụng một mình (ví dụ, dưới dạng kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên), được liên kết với một hoặc nhiều tác nhân bổ sung (ví dụ, dưới dạng các ADC), hoặc như một phần của đại phân tử lớn hơn (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu).

[00137] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được liên hợp với tác nhân trị liệu. Trong một số phương án, tác nhân hóa trị liệu là eribulin. Trong một số phương án, tác nhân hóa trị liệu là eribulin dime.

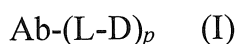
[00138] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là miền gắn kháng nguyên trong và/hoặc là một phần của hoặc kháng thể đa đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép. Trong một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép bao gồm miền gắn kháng nguyên mà có khả năng gắn với mesothelin và bao gồm ba HCDR bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT. Trong một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm một hoặc nhiều miền gắn kháng nguyên bổ sung, ví dụ, cho cùng kháng nguyên (nghĩa là, mesothelin) hoặc cho các kháng nguyên khác.

[00139] Trong một số phương án, miền gắn kháng nguyên là mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, miền gắn kháng nguyên và/hoặc mảnh gắn kháng nguyên là mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv) hoặc mảnh Fab.

[00140] Trong một số phương án, các miền gắn kháng nguyên (ví dụ, các miền gắn kháng nguyên kháng mesothelin) được bộc lộ ở đây, để sử dụng một mình hoặc như một phần của đại phân tử lớn hơn, có thể còn bao gồm các cải biến (ví dụ, một hoặc nhiều việc thay thế, việc xóa, và/hoặc việc chèn axit amin) trong khi giữ lại chức năng gắn mesothelin.

Các thể liên hợp thuốc-kháng thể

[00141] Còn được đề xuất ở đây, trong các phương án khác nhau, là các hợp chất thể liên hợp thuốc-kháng thể (ADC) bao gồm cầu nối mà liên kết gốc thuốc hóa trị liệu, ví dụ, eribulin, với kháng thể kháng mesothelin được bộc lộ ở đây. Các hợp chất thể liên hợp thuốc-kháng thể (ADC) có thể được thể hiện bởi Công thức I:



trong đó Ab là kháng thể kháng mesothelin nội hóa được bộc lộ ở đây hoặc mảnh gắn kháng nguyên nội hóa của nó;

D là eribulin;

L là cầu nối có thể phân cắt mà liên kết cộng hóa trị Ab vào D; và

p là số nguyên từ 1 đến 8.

[00142] Các hợp chất ADC theo sáng chế bao gồm gốc kháng thể (bao gồm mảnh gắn kháng nguyên của nó) được liên hợp (ví dụ, được liên kết cộng hóa trị bởi cầu nối) với gốc thuốc (ví dụ, eribulin), trong đó gốc thuốc khi không được liên hợp với gốc kháng thể có tác dụng gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào. Trong các phương án khác nhau, gốc thuốc thể hiện khả năng gây độc tế bào được giảm hoặc không có khả năng gây độc tế bào khi được gắn trong thể liên hợp nhưng khôi phục khả năng gây độc tế bào sau khi phân cắt từ cầu nối và gốc kháng thể. Trong các phương án khác nhau, gốc thuốc thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào xung quanh được giảm hoặc không có khả năng tiêu diệt tế bào xung quanh khi được gắn trong thể liên hợp nhưng thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào xung quanh được tăng sau khi phân cắt từ thể liên hợp.

[00143] Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ ở đây có thể phân phối chọn lọc liều hữu hiệu của gốc thuốc (ví dụ, eribulin) tới các tế bào ung thư hoặc tới các mô khối u mà biểu hiện kháng nguyên được hướng mục tiêu bởi gốc kháng thể của ADC (ví dụ, mesothelin). Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ hướng mục tiêu đặc hiệu ung thư bởi việc phân phối eribulin tới các tế bào hoặc các mô mà biểu hiện mesothelin trong khi lơ đi các tế bào hoặc các mô bình thường mà hoặc là không biểu hiện mesothelin hoặc biểu hiện mesothelin ở các mức thấp hơn nhiều. Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ có khả năng tiêu diệt đúng mục tiêu được tăng và/hoặc khả năng tiêu diệt đúng mục tiêu được giảm, như được so sánh với ADC bao gồm kháng thể, cầu nối, và/hoặc gốc thuốc thay thế, ví dụ, BAY 94-9343.

Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ có khả năng lưu hoạt tính ADCC được cải thiện bởi ADC, như được so sánh với ADC bao gồm kháng thể, cầu nối, và/hoặc gốc thuốc thay thế, ví dụ, BAY 94-9343. Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ có độ ổn định được cải thiện (ví dụ, độ ổn định huyết tương), như được so sánh với ADC bao gồm kháng thể, cầu nối, và/hoặc gốc thuốc thay thế, ví dụ, BAY 94-9343. Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ có hiệu quả kháng khối u được cải thiện, như được so sánh với ADC bao gồm kháng thể, cầu nối, và/hoặc gốc thuốc thay thế, ví dụ, BAY 94-9343.

[00144] Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ ở đây có thể cung cấp hiệu quả kháng khối u mong muốn với liều thấp hơn của eribulin, như được so sánh với liều của eribulin khi được đánh giá như thuốc độc lập (nghĩa là, không được liên hợp với gốc kháng thể). Trong một số phương án, việc hướng mục tiêu đặc hiệu khối u của các hợp chất ADC được bộc lộ ở đây làm tăng hoạt động kháng khối u và/hoặc làm giảm khả năng gây độc tế bào ngoài mục tiêu của ADC, như được so sánh với eribulin khi được đánh giá như thuốc độc lập. Ví dụ, trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ ở đây thể hiện hoạt động kháng khối u mong muốn với liều của eribulin mà thấp hơn ít nhất 10 lần, thấp hơn ít nhất 15 lần, thấp hơn ít nhất 20 lần, hoặc thấp hơn ít nhất 30 lần so với liều eribulin khi được đánh giá như thuốc độc lập. Trong một số phương án, các hợp chất ADC được bộc lộ chứng minh hoạt động kháng khối u mà có thể so sánh với hoặc ưu việt hơn hoạt tính của eribulin khi được đánh giá như thuốc độc lập, đồng thời cung cấp hồ sơ độc tính hoặc biên dạng an toàn được cải thiện so với eribulin của chính nó.

[00145] Trong một số phương án, cầu nối là ổn định bên ngoài tế bào, sao cho ADC duy trì nguyên vẹn khi có mặt trong các điều kiện ngoại bào nhưng có khả năng bị phân cắt khi nội hóa trong tế bào, ví dụ, tế bào ung thư. Trong một số phương án, gốc thuốc eribulin được phân tách từ gốc kháng thể kháng mesothelin khi ADC xâm nhập vào tế bào mà biểu hiện mesothelin, và sự phân cắt giải phóng dạng eribulin không được cải biến.

[00146] Trong một số phương án, cầu nối bao gồm gốc có thể phân cắt mà được định vị sao cho không có phần nào của cầu nối hoặc gốc kháng thể vẫn còn gắn với gốc thuốc eribulin khi phân cắt. Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt trong cầu nối là gốc peptit có thể phân cắt. Trong một số phương án, ADC mà bao gồm gốc peptit có thể

phân cắt chứng minh các mức kết tập thấp hơn, tỷ lệ kháng thể:thuốc được cải thiện, khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư đúng mục tiêu được tăng, khả năng tiêu diệt tế bào không phải ung thư ngoài mục tiêu được giảm và/hoặc tải lượng thuốc cao hơn (*p*) tương đối so với ADC mà bao gồm gốc cầu nối thay thế. Trong một số phương án, hiệu lực và/hoặc khả năng gây độc tế bào tăng được cung cấp trong bệnh ung thư biểu hiện các mức trung bình của mesothelin. Trong một số phương án, gốc peptit có thể phân cắt có thể phân cắt bởi enzym, và cầu nối là cầu nối có thể phân cắt bằng enzym. Trong một số phương án, enzym là cathepsin B, và cầu nối là cầu nối có thể phân cắt cathepsin. Trong một số phương án, cầu nối có thể phân cắt enzym (ví dụ, cầu nối có thể phân cắt cathepsin) thể hiện một hoặc nhiều trong số các đặc tính được cải thiện được đề cập ở trên, như được so sánh với cơ chế phân cắt thay thế.

[00147] Trong một số phương án, gốc peptit có thể phân cắt trong cầu nối bao gồm đơn vị axit amin. Trong một số phương án, đơn vị axit amin bao gồm valin-xitrulin (Val-Cit). Trong một số phương án, ADC mà bao gồm Val-Cit chứng minh độ ổn định tăng, khả năng tiêu diệt tế bào ngoài mục tiêu được giảm, khả năng tiêu diệt tế bào đúng mục tiêu được tăng, các mức kết tụ thấp hơn, và/hoặc tải lượng thuốc cao hơn tương đối so với ADC mà bao gồm đơn vị axit amin thay thế hoặc gốc có thể phân cắt thay thế.

[00148] Trong một số phương án, cầu nối bao gồm ít nhất một đơn vị đệm kết hợp gốc kháng thể với gốc có thể phân cắt. Trong một số phương án, đơn vị đệm trong cầu nối có thể bao gồm ít nhất một gốc polyetylen glycol (PEG). Gốc PEG có thể, ví dụ, bao gồm $-(\text{PEG})_m-$, trong đó *m* là số nguyên từ 1 đến 10. Trong một số phương án, đơn vị đệm trong cầu nối bao gồm $(\text{PEG})_2$. Trong một số phương án, ADC mà bao gồm đơn vị đệm ngắn hơn (ví dụ, $(\text{PEG})_2$) chứng minh các mức kết tụ thấp hơn và/hoặc tải lượng thuốc cao hơn tương đối so với ADC mà bao gồm đơn vị đệm dài hơn (ví dụ, $(\text{PEG})_8$) mặc dù độ dài cầu nối ngắn hơn.

[00149] Trong một số phương án, đơn vị đệm trong cầu nối liên kết với gốc kháng thể của ADC qua gốc maleimide (Mal). Trong một số phương án, ADC mà bao gồm cầu nối được liên kết với gốc kháng thể qua Mal chứng minh tải lượng thuốc cao hơn tương đối so với ADC mà bao gồm cầu nối được liên kết với gốc kháng thể qua gốc thay thế. Trong một số phương án, Mal trong cầu nối được kết hợp vào gốc kháng thể qua gốc cysteine (ví dụ, LCcys80). Trong một số phương án, Mal trong cầu nối được kết hợp vào gốc cysteine (ví dụ, LCcys80) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trên kháng thể hoặc mảnh gắn

kháng nguyên. Trong một số phương án, p là 2 và hai gốc -L-D được liên kết với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, mỗi gốc -L-D được liên kết với gốc cystein (ví dụ, LCcys80) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trên kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, gốc cystein là LCcys80. Trong một số phương án, đơn vị đệm-Mal bao gồm gốc PEG. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)_m, ví dụ, Mal-(PEG)₂. Trong một số phương án, đơn vị đệm-Mal liên kết gốc kháng thể với gốc có thể phân cắt trong cầu nối. Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt trong cầu nối là gốc peptit có thể phân cắt, ví dụ, đơn vị axit amin. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit.

[00150] Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt trong cầu nối được kết hợp trực tiếp với gốc thuốc eribulin của ADC, và gốc có thể phân cắt được kết nối trực tiếp hoặc với gốc kháng thể hoặc được kết nối thông qua đơn vị đệm. Trong một số phương án, đơn vị đệm cũng liên kết gốc có thể phân cắt trong cầu nối với gốc thuốc eribulin. Trong một số phương án, đơn vị đệm mà liên kết gốc có thể phân cắt trong cầu nối với gốc thuốc eribulin là đơn vị tự diệt. Trong một số phương án, đệm tự diệt có khả năng giải phóng eribulin không được cải biến ở tế bào mục tiêu. Trong một số phương án, đơn vị đệm tự diệt bao gồm rượu *p*-aminobenzyl ví dụ, *p*-aminobenzyloxycarbonyl (pAB). pAB trong cầu nối, trong một số phương án, liên kết gốc có thể phân cắt với gốc thuốc eribulin. Trong một số phương án, gốc có thể phân cắt là gốc peptit có thể phân cắt, ví dụ, đơn vị axit amin. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Val-Cit-pAB. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Val-Cit-pAB và đơn vị đệm PEG kết hợp cầu nối với gốc kháng thể thông qua Mal.

[00151] Trong một số phương án, p là số nguyên từ 1 đến 8, hoặc từ 2 đến 6. Trong một số phương án, p là 2 hoặc 6. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB và p là 2. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB và p là 6.

[00152] Trong một số phương án, gốc kháng thể được liên hợp với gốc thuốc eribulin qua cầu nối bao gồm gốc Mal, gốc PEG, Val-Cit, và pAB. Trong các phương án này, gốc maleimide liên kết cộng hóa trị gốc thuốc-cầu nối với gốc kháng thể, và pAB đóng vai trò là đơn vị đệm tự diệt. Cầu nối như vậy có thể được gọi là cầu nối "Mal-VC-pAB", cầu nối "Mal-VCP", "maleimide-VCP", hoặc "VCP", cầu nối "Mal-(PEG)₂-VCP", hoặc cầu nối "Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB". Trong một số phương án, gốc thuốc eribulin là

eribulin được nối cộng hóa trị ở vị trí C-35. Trong một số phương án, pAB của cầu nối Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB được liên kết với amin C-35 amin trên gốc thuốc eribulin.

[00153] 345A12-HC15-LC4 là kháng thể kháng mesothelin ví dụ bao gồm hoặc được mã hóa bởi các trình tự được thể hiện ở trên trong các Bảng 1-10, ví dụ, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14. Trong một số phương án, gốc kháng thể của các ADC được bộc lộ ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14. Trong một số phương án, gốc kháng thể của các ADC được bộc lộ ở đây là 345A12-HC15-LC4.

[00154] Trong một số phương án, ADC được bộc lộ ở đây bao gồm 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin. Trong các phương án này, gốc kháng thể bao gồm 345A12-HC15-LC4 được kết hợp vào gốc thuốc eribulin qua cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. ADC này có thể được gọi là "MORAb-109." Trong một số phương án, ADC được bộc lộ ở đây là MORAb-109.

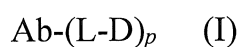
[00155] Trong một số phương án, ADC được bộc lộ ở đây là MORAb-109 và có p là 2. Trong một số phương án, khi p là 2, ADC có thể được gọi là "MORAb-109 (DAR2)." Trong các phương án khác, ADC được bộc lộ ở đây là MORAb-109 và có p là 6. Trong một số phương án, khi p là 6, ADC có thể được gọi là "MORAb-109 (DAR6)."

[00156] Trong các phương án khác nhau, cầu nối được thiết kế để tạo điều kiện cho việc tiêu diệt tế bào xung quanh (việc tiêu diệt các tế bào lân cận, ví dụ, các tế bào mà không biểu hiện mesothelin) thông qua việc phân cắt sau việc nội hóa tế bào và sự khuếch tán của gốc thuốc-cầu nối và/hoặc gốc thuốc một mình tới các tế bào lân cận. Trong một số phương án, cầu nối thúc đẩy sự nội hóa tế bào. Theo một số phương án, cầu nối được thiết kế để giảm thiểu sự phân tách trong môi trường ngoại bào và nhờ đó làm giảm độc tính đến mô lành mục tiêu (ví dụ, mô không bị ung thư), trong khi bảo toàn sự gắn ADC với mô mục tiêu và sự tiêu diệt tế bào xung quanh của mô ung thư mà không biểu hiện kháng nguyên được hướng mục tiêu bởi gốc kháng thể của ADC, nhưng bao xung quanh mô ung thư mục tiêu biểu hiện kháng nguyên đó. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm gốc maleimide (Mal), gốc polyetylen glycol (PEG), valin-xitrulin (Val-Cit hoặc "VC"), và pAB cung cấp các đặc tính chức năng này. Trong một số

phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB là đặc biệt hiệu quả trong việc cung cấp các đặc tính chức năng này khi liên kết gốc kháng thể và gốc thuốc eribulin. Trong một số phương án, cầu nối bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB có hiệu quả trong việc cung cấp một số hoặc tất cả các đặc tính chức năng này khi liên kết gốc kháng thể kháng mesothelin chẳng hạn như 345A12-HC15-LC4 và gốc thuốc eribulin.

[00157] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin bao gồm các trình tự được bộc lộ ở đây (ví dụ, bao gồm sáu CDR và/hoặc các miền biến đổi chuỗi nhẹ và nặng được bộc lộ trong các Bảng 1-3). Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể có độ dài đầy đủ. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể đặc hiệu đơn hoặc kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu kép hoặc mảnh gắn kháng nguyên, hoặc kháng thể đa đặc hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv) hoặc mảnh Fab.

[00158] Trong một số phương án, ADC bao gồm kháng thể kháng mesothelin (Ab) moiety và gốc peptit có thể phân cắt chứng minh các mức kết tụ thấp hơn, tỷ lệ kháng thể:thuốc được cải thiện, khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư đúng mục tiêu được tăng, khả năng tiêu diệt tế bào không phải ung thư ngoài mục tiêu được giảm, tải lượng thuốc cao hơn (*p*), khả năng gây độc tế bào được tăng, và/hoặc hiệu lực tương đối so với ADC bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên thay thế. Trong một số phương án, ADC là ADC có Công thức (I):



trong đó Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có khả năng gắn với mesothelin và bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao

gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

D là tác nhân hóa trị liệu (ví dụ, eribulin);

L là cầu nối có thể phân cắt mà liên kết cộng hóa trị Ab vào D; và

p là số nguyên từ 1 đến 8.

[00159] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người và miền không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

[00160] Trong một số phương án, ADC có Công thức (I):

$\text{Ab}-(\text{L-D})_p$ (I)

trong đó:

Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có khả năng gắn với mesothelin và/hoặc tế bào biểu hiện mesothelin và bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

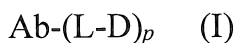
D là eribulin;

L là cầu nối có thể phân cắt mà liên kết cộng hóa trị Ab vào D; và

p là số nguyên từ 1 đến 8.

[00161] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà hướng mục tiêu mesothelin và/hoặc tế bào biểu hiện mesothelin bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người và miền không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

[00162] Trong một số phương án, ADC có Công thức (I):



trong đó:

Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó mà hướng mục tiêu mesothelin và/hoặc tế bào biểu hiện mesothelin bao gồm ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các HCDR) bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (các LCDR) bao gồm các trình tự amino axit có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

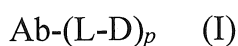
D là eribulin;

L là cầu nối có thể phân cắt bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; và

p là số nguyên từ 1 đến 8.

[00163] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà hướng mục tiêu mesothelin và/hoặc tế bào biểu hiện mesothelin bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người và miền không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

[00164] Trong một số phương án, ADC có Công thức (I):



trong đó:

Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có khả năng gắn với mesothelin và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14;

D là eribulin;

L là cầu nối có thể phân cắt bao gồm Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; và

p là số nguyên từ 1 đến 8.

[00165] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 ở người, và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa Ig ở người. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 15, và vùng không đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 16. Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.

[00166] Trong một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của ADC là 345A12-HC15-LC4. Trong một số phương án, p là từ 1 đến 8. Trong một số phương án, p là 2 hoặc 6. Theo một số phương án, p là 2.

[00167] Trong một số phương án, ADC được bọc lộ ở đây (ví dụ, một bao gồm kháng thể kháng mesothelin và cầu nối được bọc lộ ở đây) với mức thấp hơn của tải lượng thuốc eribulin (ví dụ, p là 2) có thể phân phối các mức giống hoặc tương tự của eribulin tới tế bào ung thư hoặc tới mô khối u dưới dạng ADC với mức cao hơn của tải lượng thuốc (ví dụ, p là 6). Trong một số phương án, ADC với mức thấp hơn của tải lượng thuốc (ví dụ, p là 2) có thể cung cấp sự ức chế phát triển khối u và/hoặc hiệu quả điều trị kháng ung thư in vivo xấp xỉ có thể so sánh với hoặc ưu việt hơn của ADC với mức cao hơn của tải lượng thuốc (ví dụ, p là 6).

[00168] Trong một số phương án, mỗi gốc eribulin được kết hợp bởi cầu nối có thể phân cắt với kháng thể hướng mục tiêu mesothelin hoặc mảnh gắn kháng nguyên qua gốc cystein trên kháng thể hoặc mảnh (ví dụ, LCcys80). Trong một số phương án, tổng cộng hai gốc eribulin-cầu nối được liên kết với kháng thể hướng mục tiêu mesothelin hoặc mảnh gắn kháng nguyên, ví dụ, qua hai gốc cystein trên kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên (nghĩa là, sao cho ADC có DAR2). Trong một số phương án, (các) gốc cystein là LCcys80.

[00169] Sự phát triển và sự sản xuất của ADC để sử dụng làm tác nhân trị liệu cho người, ví dụ, làm chất ung thư, có thể đòi hỏi nhiều hơn việc xác định kháng thể có khả năng gắn với mục tiêu mong muốn hoặc hướng mục tiêu và liên kết với thuốc được sử dụng dựa trên chính nó để điều trị ung thư. Việc nối kháng thể với thuốc có thể có các ảnh hưởng đáng kể và không thể dự đoán đến hoạt tính của một hoặc cả hai kháng thể và thuốc, các tác dụng này sẽ thay đổi tùy thuộc vào kháng thể và/hoặc loại cầu nối và/hoặc thuốc được chọn. Trong một số phương án, do đó, các thành phần của ADC được lựa chọn để (i) duy trì một hoặc nhiều đặc tính trị liệu được thể hiện bởi kháng thể và các gốc thuốc khi phân lập, (ii) duy trì các đặc tính gắn đặc hiệu của gốc kháng thể; (iii) tối ưu hóa tải lượng thuốc và các tỷ lệ thuốc-với-kháng thể; (iv) cho phép phân phối, ví dụ, phân phối nội bào, của gốc thuốc qua qua việc liên kết bền với gốc kháng thể; (v) duy trì độ ổn định ADC dưới dạng thể liên hợp nguyên vẹn cho đến khi vận chuyển hoặc phân phối tới vị trí mục tiêu; (vi) giảm thiểu sự kết tụ của ADC trước hoặc sau khi dùng; (vii) cho phép hiệu quả trị liệu, ví dụ, hiệu quả gây độc tế bào, của gốc thuốc sau khi

phân cắt trong môi trường tế bào; (viii) thể hiện hiệu quả điều trị kháng ung thư *in vivo* có thể so sánh với hoặc ưu việt so với hiệu quả của kháng thể và các gốc thuốc khi phân lập; (ix) giảm thiểu sự tiêu diệt ngoài mục tiêu bởi gốc thuốc; và/hoặc (x) thể hiện các tính chất dược động học và dược lực học mong muốn, khả năng tạo chế phẩm, và các biên dạng gây độc/gây miễn dịch. Việc sàng lọc mỗi trong số các đặc tính này có thể là cần thiết để xác định ADC được cải thiện cho việc sử dụng trị liệu (Ab et al. (2015) Mol. Cancer Ther. 14:1605-13).

[00170] Trong một số phương án, ADC được bộc lộ ở đây bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin được kết hợp với hóa trị liệu, ví dụ, eribulin, chứng minh việc kết hợp cụ thể của các đặc tính mong muốn. Các đặc tính này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các mức hiệu quả của tải lượng thuốc, các mức độ kết tụ thấp, tính ổn định trong các điều kiện lưu trữ và/hoặc khi tuần hoàn trong cơ thể (ví dụ, tính ổn định trong huyết thanh và nền), ái lực được giữ lại đối với các tế bào biểu hiện mục tiêu có thể so sánh với kháng thể không được liên hợp, khả năng gây độc tế bào mạnh đối với các tế bào biểu hiện mục tiêu, các mức cao của khả năng tiêu diệt tế bào xung quanh, và/hoặc hoạt tính kháng ung thư *in vivo* hiệu quả, tất cả được so sánh với các ADC sử dụng các gốc kháng thể khác. Trong một số phương án, các hoạt tính kháng ung thư cao của các thể liên hợp này được thấy ngay cả khi được thử nghiệm trong các dòng tế bào có mức biểu hiện kháng nguyên trung bình, chứng minh độ nhạy mạnh với phụ tải độc tính được phân phối bởi ADC. Trong một số phương án, ADC bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên kháng mesothelin được bộc lộ ở đây thể hiện khả năng gây độc tế bào kháng khối u và/hoặc hiệu lực được ưa thích cụ thể, và khả năng gây độc ngoài mục tiêu được cải thiện và việc chuyển hóa thuốc và các biên dạng dược động học (DMPK) như được so sánh với ADC bao gồm gốc kháng thể thay thế. Trong một số phương án, ADC bao gồm kháng thể kháng mesothelin được người hóa được bộc lộ ở đây và eribulin cung cấp các đặc tính độc tính và dược động học được ưa thích bất ngờ như được so sánh với ADC bao gồm gốc kháng thể và/hoặc thể liên hợp thay thế.

[00171] Các hợp chất ADC theo sáng chế có thể phân phối chọn lọc liều hữu hiệu của tác nhân gây độc tế bào hoặc kim hãm tế bào tới các tế bào ung thư hoặc đến mô khối u. Theo một số phương án, hoạt tính gây độc tế bào và/hoặc kim hãm tế bào của ADC phụ thuộc vào mức biểu hiện kháng nguyên mục tiêu ở tế bào. Trong một số phương án,

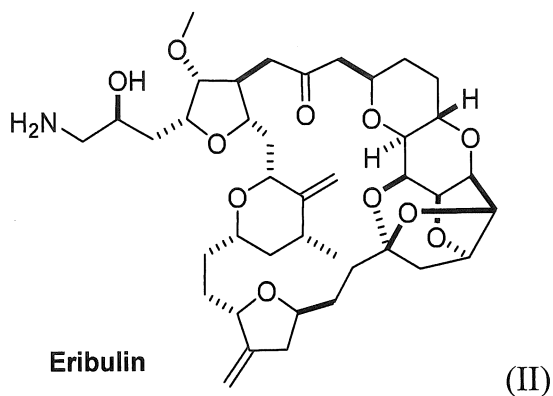
các ADC được bộc lộ là đặc biệt hữu hiệu trong việc tiêu diệt các tế bào ung thư biểu hiện các mức cao của kháng nguyên mục tiêu, như được so sánh với các tế bào ung thư biểu hiện cùng kháng nguyên ở mức thấp. Trong một số phương án, các ADC được bộc lộ là đặc biệt hữu hiệu trong việc tiêu diệt các tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên mục tiêu ở mức trung bình, như được so sánh với các tế bào ung thư biểu hiện cùng kháng nguyên ở mức thấp.

[00172] Các ung thư biểu hiện mesothelin ở mức cao ví dụ bao gồm nhưng không bị giới hạn ở ung thư buồng trứng (ví dụ, ung thư buồng trứng huyết thanh, ung thư buồng trứng tế bào sạch), ung thư tuyến tụy, u trung biểu mô, ung thư nội mạc tử cung, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (ví dụ, ung thư biểu mô tuyến), và ung thư đại trực tràng. Các ung thư biểu hiện mesothelin ở mức trung bình ví dụ bao gồm nhưng không bị giới hạn ở ung thư dạ dày, ung thư biểu mô tuyến ức, và ung thư biểu mô tế bào đường mật. Các ung thư biểu hiện mesothelin ở mức thấp ví dụ bao gồm nhưng không bị giới hạn ở u ác tính và u lympho. Trong một số phương án, các ung thư biểu hiện mesothelin có thể bao gồm các ung thư chứa đột biến và/hoặc kháng thuốc, ví dụ, ung thư phổi đột biến KRAS/STK11 (ung thư biểu mô tuyến phổi không phải tế bào nhỏ), ví dụ như các bệnh ung thư phổi đột biến mà biểu hiện việc kháng điều trị với việc chặn điểm kiểm soát PD-1.

Gốc thuốc

[00173] Gốc thuốc (D) của các ADC được mô tả ở đây có thể là tác nhân hóa trị liệu bất kỳ. Các nhóm hữu dụng của các tác nhân hóa trị liệu bao gồm, ví dụ, các tác nhân kháng tubulin. Trong các phương án nhất định, gốc thuốc là tác nhân kháng tubulin. Một gốc thuốc ví dụ để sử dụng trong các ADC được mô tả và các chế phẩm là eribulin. Gốc thuốc ví dụ khác để sử dụng trong các ADC được mô tả và các chế phẩm là eribulin dime.

[00174] Trong các phương án khác nhau, cấu trúc của eribulin được sử dụng trong dạng tự nhiên của nó trong các ADC được bộc lộ là như được thể hiện trong Công thức (II):



[00175] Trong các phương án khác nhau, cấu trúc của eribulin được sử dụng trong các ADC được bộc lộ là như được thể hiện trong công bố Số US 20180193478, mà được kết hợp ở đây bằng việc tham chiếu cho tất cả các cấu trúc eribulin và các phương pháp được tổng hợp các cấu trúc này.

Tải lượng thuốc

[00176] Tải lượng thuốc có thể được thể hiện bởi p , và cũng được gọi ở đây là tỷ lệ thuốc-với-kháng thể (DAR). Tải lượng thuốc có thể nằm trong khoảng từ, ví dụ, 1 đến 10 gốc thuốc mỗi gốc kháng thể. Theo một số phương án, p là số nguyên từ 1 đến 10. Theo một số phương án, p là số nguyên từ 1 đến 10, từ 1 đến 9, từ 1 đến 8, từ 1 đến 7, từ 1 đến 6, từ 1 đến 5, từ 1 đến 4, từ 1 đến 3, hoặc từ 1 đến 2. Theo một số phương án, p là số nguyên từ 2 đến 10, từ 2 đến 9, từ 2 đến 8, từ 2 đến 7, từ 2 đến 6, từ 2 đến 5, từ 2 đến 4, hoặc từ 2 đến 3. Theo một số phương án, p là số nguyên từ 1 đến 8. Theo một số phương án, p là số nguyên từ 1 đến 6. Theo một số phương án, p là số nguyên từ 2 đến 6. Theo một số phương án, p là 2. Theo một số phương án, p bằng 6.

[00177] Tải lượng thuốc có thể bị giới hạn, trong một số phương án, bởi số lượng của các vị trí liên kết trên gốc kháng thể. Trong một số phương án, gốc cầu nối (L) của ADC liên kết với gốc kháng thể thông qua nhóm hoạt động hóa học trên một hoặc nhiều gốc axit amin trên gốc kháng thể. Ví dụ, cầu nối có thể được liên kết với gốc kháng thể qua nhóm amino tự do, imino, hydroxyl, thiol, hoặc carboxyl (ví dụ, với đầu tận cùng N hoặc C, với nhóm epsilon amino của một hoặc nhiều gốc lysin, với nhóm axit carboxylic tự do của một hoặc nhiều gốc axit glutamic hoặc axit aspartic, hoặc với nhóm sulfhydryl của một hoặc nhiều gốc cystein). Vị trí tại đó cầu nối được liên kết có thể là gốc tự nhiên trong trình tự axit amin của gốc kháng thể, hoặc nó có thể được thêm vào gốc kháng thể, ví dụ, bởi công nghệ tái tổ hợp ADN (ví dụ, bằng việc thêm gốc cystein vào trình tự axit

amin) hoặc bởi hóa sinh học protein (ví dụ, bằng việc khử, điều chỉnh độ pH, hoặc thủy phân).

[00178] Trong một số phương án, số lượng của các gốc thuốc mà có thể được liên hợp với gốc kháng thể được giới hạn bởi số lượng của các gốc cystein tự do. Ví dụ, khi việc liên kết là nhóm thiol cystein, kháng thể có thể chỉ có một hoặc một vài nhóm thiol cystein, hoặc có thể chỉ có một hoặc một vài nhóm thiol có đủ khả năng phản ứng mà qua đó cầu nối có thể được liên kết. Nhìn chung, kháng thể không chứa nhiều nhóm thiol cystein tự do và có thể phản ứng mà có thể được liên kết với gốc thuốc. Thật vậy, hầu hết các gốc thiol cystein trong kháng thể tham gia vào liên kết disulfua liên chuỗi hoặc nội chuỗi. Sự liên hợp với các cystein có thể do đó, trong một số phương án, yêu cầu ít nhất việc thể một phần của kháng thể. Sự gắn quá mức của cầu nối-độc tố với kháng thể có thể làm mất ổn định kháng thể bởi việc khử gốc cystein có sẵn để tạo thành các liên kết disulfit. Do đó, trong một số phương án, tỷ lệ thuốc:kháng thể tối ưu cần làm tăng hiệu lực của ADC (bằng cách làm tăng số lượng của các gốc thuốc được liên kết trong mỗi kháng thể) mà không làm mất ổn định gốc kháng thể. Trong một số phương án, tỷ lệ tối ưu có thể là 2 hoặc 6. Trong một số phương án, tỷ lệ tối ưu là 2.

[00179] Trong một số phương án, một hoặc nhiều công nghệ liên hợp đặc hiệu vị trí được sử dụng để tạo ra sản phẩm ADC đồng nhất với tải lượng thuốc được xác định, nghĩa là, tỷ lệ thuốc với kháng thể (DAR) được xác định. Trong một số phương án, các gốc cystein tự do có thể được tạo ra trong chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của các kháng thể để liên hợp đặc hiệu vị trí thông qua Công nghệ liên hợp đặc hiệu gốc (RESPECT). Các quy trình ví dụ để tạo ra các kháng thể định dạng RESPECT được mô tả trong Albone et al. (2017) *Cancer Biol. Ther.* 18(5):347-57, và trong Công bố quốc tế số WO/2016205618 và WO/2017106643, mỗi trong số chúng được kết hợp ở đây bằng việc tham chiếu cho các phương pháp thực hiện liên hợp đặc hiệu vị trí. Trong một số phương án, ADC được tạo ra bằng cách sử dụng việc liên hợp đặc hiệu vị trí để liên kết cộng hóa trị nhóm kháng thể với gốc thuốc thông qua cầu nối (ví dụ, cầu nối Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB). Trong một số phương án, việc liên hợp đặc hiệu vị trí được sử dụng để hướng mục tiêu DAR là khoảng 2 cho các ADC hoặc các chế phẩm bao gồm gốc thuốc eribulin.

[00180] Các kháng thể đơn dòng ở thể được khám hoặc được người hóa với các vùng không đổi ở người có thể tạo ra các cystein không được ghép đôi trong chuỗi nhẹ, để lại

các gốc sẵn sàng cho việc liên hợp (Albone et al. (2017) Cancer Biol. Ther. 18(5):347-57; Công bố quốc tế Số WO/2016205618). Trong một số phương án, gốc kháng thể được sử dụng cho việc liên hợp đặc hiệu vị trí là kháng thể được định dạng RESPECT-L. Các kháng thể được định dạng RESPECT-L ví dụ với cystein không được ghép đôi ở vị trí chuỗi nhẹ 80 (LCcys80) được mô tả ở đây. Như được sử dụng ở đây, "LCcys80" hoặc "Cys80" dùng để chỉ gốc cystein ở vị trí axit amin 80 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trên kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo hệ thống đánh số Kabat. Ví dụ, trong một số phương án, trong các vùng biến đổi chuỗi ngắn được bộc lộ ở đây, LCcys80 xuất hiện ở vị trí axit amin 80. Các kháng thể có nguồn gốc từ RESPECT-L có thể tạo ra ADC với DAR là khoảng 2. Trong một số phương án, tải lượng thuốc và/hoặc tải lượng thuốc trung bình là khoảng 2 được đạt, ví dụ, sử dụng việc liên hợp đặc hiệu vị trí.

Các dược phẩm

[00181] Trong một số phương án, sáng chế ngoài ra còn đề xuất các dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, các thể liên hợp, và/hoặc các ADC được bộc lộ ở đây và chất mang dược dụng. Trong một số phương án, các dược phẩm được mô tả ở đây bao gồm ít nhất một tác nhân bổ sung.

[00182] Trong một số phương án, sáng chế ngoài ra còn đề xuất các dược phẩm bao gồm nhiều bản sao của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, thể liên hợp, và/hoặc ADC được bộc lộ ở đây. Trong một số phương án, sáng chế ngoài ra còn đề xuất các dược phẩm bao gồm nhiều bản sao của ADC được bộc lộ ở đây. Trong một số phương án, *p* trung bình của các ADC trong chế phẩm là từ khoảng 1 đến khoảng 8. Trong một số phương án, *p* trung bình của các ADC trong chế phẩm là khoảng 2 hoặc khoảng 6. Trong một số phương án, *p* trung bình của các ADC trong chế phẩm là khoảng 1,3, khoảng 1,4, khoảng 1,5, khoảng 1,6, khoảng 1,7, khoảng 1,8, khoảng 1,9, khoảng 2,0, khoảng 2,1, khoảng 2,2, hoặc khoảng 2,3. Trong một số phương án, *p* trung bình của các ADC trong chế phẩm là khoảng 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, hoặc 6,5.

[00183] Trong một số phương án, dược phẩm có thể còn bao gồm một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung, ví dụ, một hoặc nhiều tác nhân có khả năng điều trị ung thư biểu hiện mesothelin, steroid, và tương tự.

Các việc sử dụng trị liệu và các phương pháp điều trị

[00184] Được bộc lộ ở đây là các phương pháp sử dụng các kháng thể được bộc lộ, các mảnh gắn kháng nguyên, các thể liên hợp, các ADC và/hoặc các dược phẩm trong việc điều trị đối tượng về rối loạn, ví dụ, rối loạn ung thư. Các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, các thể liên hợp, và/hoặc các ADC có thể được dùng một mình hoặc kết hợp với tác nhân trị liệu thứ hai, và có thể được dùng trong chế phẩm dược dụng, liều dùng, và phác đồ dùng liều bất kỳ. Hiệu quả điều trị các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC có thể được đánh giá về khả năng gây độc tế bào cũng như các chỉ số về hiệu quả và được điều chỉnh theo đó. Các số đo hiệu quả bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tác dụng kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào được quan sát in vitro hoặc in vivo, thể tích khối u giảm, sự ức chế phát triển khối u, và/hoặc thời gian sống được kéo dài.

[00185] Các phương pháp xác định xem kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC có gây ra tác dụng kìm hãm tế bào và/hoặc hiệu quả gây độc tế bào trên tế bào hay không đã được biết đến. Ví dụ, hoạt tính gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC có thể được đo bằng cách phơi nhiễm tế bào động vật có vú biểu hiện protein mục tiêu của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC trong môi trường nuôi cấy tế bào; nuôi cấy tế bào trong khoảng thời gian từ khoảng 6 giờ đến khoảng 5 ngày; và đo khả năng sống của tế bào. Thử nghiệm in vitro dựa trên tế bào cũng có thể được sử dụng để đo khả năng sống (sự tăng sinh), khả năng gây độc tế bào, và sự cảm ứng chết theo chương trình (sự hoạt hóa caspaza) của ADC.

[00186] Để xác định xem kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc ADC có tác dụng kìm tế bào hay không, có thể sử dụng xét nghiệm kết hợp thymidin. Ví dụ, các tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên mục tiêu ở mật độ 5000 tế bào/giếng của đĩa 96 giếng có thể được nuôi cấy trong khoảng thời gian 72 giờ và được phơi nhiễm với 0,5 μ Ci của 3H-thymidin trong 8 giờ cuối cùng của khoảng thời gian 72 giờ. Sự kết hợp của 3H-thymidin vào trong các tế bào nuôi cấy được đo trong sự có mặt và sự không có mặt của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC.

[00187] Để xác định khả năng gây độc tế bào, sự hoại tử hoặc sự chết theo chương trình (sự chết tế bào đã được lập trình) có thể được đo. Sự hoại tử thường đi kèm với tính thấm tăng của màng sinh chất; sự phồng lên của tế bào, và sự vỡ của màng sinh chất. Sự chết theo chương trình thường được đặc trưng bởi sự chảy máu màng, sự ngưng

tụ của tế bào chất và sự hoạt hóa của các endonucleaza nội sinh. Việc xác định tác dụng bất kỳ trong số các tác dụng này trên các tế bào ung thư chỉ ra rằng ADC là hữu dụng trong việc điều trị các bệnh ung thư.

[00188] Khả năng sống của tế bào có thể được đo, ví dụ, bằng cách xác định ở tế bào sự hấp thụ của thuốc nhuộm như đỏ trung tính, xanh trypan, tím tinh thể, hoặc xanh ALAMAR™ (xem, ví dụ, Page et al. (1993) *Intl. J. Oncology* 3:473-6). Trong thử nghiệm này, các tế bào được ủ trong môi trường chứa thuốc nhuộm, các tế bào được rửa, và thuốc nhuộm còn lại, phản ánh sự hấp thụ vào trong tế bào của thuốc nhuộm, được đo bằng cách đo quang phổ. Trong các phương án nhất định, hiệu lực và/hoặc khả năng gây độc tế bào in vitro của các ADC được chuẩn bị được đánh giá bằng xét nghiệm tím tinh thể. Tím tinh thể là một loại thuốc nhuộm triarylmethan mà tích tụ trong nhân của các tế bào sống được. Trong thử nghiệm này, các tế bào được phơi nhiễm với các ADC hoặc các chất kiểm soát trong một khoảng thời gian xác định, sau đó, các tế bào được nhuộm bằng tím tinh thể, được rửa sạch bằng nước, sau đó được hòa tan với SDS 1% và đọc quang phổ. Thuốc nhuộm gắn protein sulforhodamin B (SRB) cũng có thể được sử dụng để đo khả năng gây độc tế bào (Skehan et al. (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

[00189] Sự chết theo chương trình có thể được định lượng, ví dụ, bằng việc đo độ phân mảnh ADN. Các phương pháp trắc quang trên thị trường để định lượng để xác định in vitro độ phân mảnh ADN là có sẵn. Ví dụ về các thử nghiệm này, bao gồm TUNEL (mà phát hiện sự kết hợp của các nucleotit đã được gắn nhãn trong ADN đã được phân mảnh) và các thử nghiệm dựa trên ELISA, được mô tả trong Biochemica (1999) No. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

[00190] Sự chết theo chương trình cũng có thể được xác định bằng cách đo các sự thay đổi hình thái ở tế bào. Ví dụ, như với hoại tử, sự mất tính toàn vẹn của màng sinh chất có thể được xác định bằng cách đo sự hấp thụ của một số thuốc nhuộm (ví dụ, thuốc nhuộm huỳnh quang như acridin da cam hoặc ethidi bromua). Phương pháp để đo số lượng tế bào chết theo chương trình đã được mô tả bởi Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., eds. (1992) pp. 3.17.1-3.17.16). Các tế bào cũng có thể được đánh dấu bằng thuốc nhuộm ADN (ví dụ, acridin da cam, ethidi bromua, hoặc propidi iodua) và các tế bào được quan sát về sự ngưng tụ và sự bám vào rìa của chất nhuộm sắc dọc theo màng nhân bên trong. Sự thay đổi hình thái khác mà có

thể được đo để xác định sự chết theo chương trình bao gồm, ví dụ, sự ngưng tụ tế bào chất, sự tạo túi màng tăng, và sự co tế bào.

[00191] Các ADC được bộc lộ cũng có thể được đánh giá về hoạt tính tiêu diệt tế bào xung quanh. Hoạt tính tiêu diệt tế bào xung quanh có thể được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm sử dụng hai dòng tế bào, một dòng dương tính đối với kháng nguyên mục tiêu và một dòng âm tính đối với kháng nguyên mục tiêu. Các dòng tế bào có thể được dán nhãn để phân biệt chúng. Ví dụ, các tế bào dương tính với mục tiêu được gắn nhãn Nuclight™ xanh lá cây (NLG) và các tế bào âm tính với mục tiêu có nhãn Nuclight™ đỏ (NLR) có thể được đồng nuôi cấy, được xử lý với ADC sau đó theo dõi khả năng gây độc tế bào. Sự tiêu diệt các tế bào âm tính với mục tiêu khi được trộn với tế bào dương tính với mục tiêu là chỉ thị của sự tiêu diệt tế bào xung quanh, trong khi sự tiêu diệt của các tế bào âm tính với mục tiêu khi không có mặt của các tế bào dương tính với mục tiêu là chỉ thị của sự tiêu diệt ngoài mục tiêu.

[00192] Trong một số phương án, sáng chế đề cập phương pháp tiêu diệt, ức chế hoặc điều biến sự phát triển của, hoặc sự gây trở ngại đối với sự trao đổi chất của, tế bào ung thư hoặc mô bằng việc làm gián đoạn tubulin. Phương pháp có thể được sử dụng với đối tượng bất kỳ khi sự phá vỡ của tubulin tạo ra lợi ích trị liệu. Các đối tượng có thể được hưởng lợi từ việc phá vỡ tubulin bao gồm, nhưng không giới hạn ở những đối tượng đang mắc hoặc có nguy cơ bị ung thư dạ dày, ung thư buồng trứng (ví dụ, ung thư buồng trứng biểu mô), ung thư phổi (ví dụ, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ), ung thư vú, ung thư nội mạc tử cung (ví dụ, ung thư biểu mô nội mạc tử cung), u xương, sarcoma Kaposi, ung thư tế bào mầm tinh hoàn, ung thư đầu và cổ, ung thư gan, ung thư thận, ung thư biểu mô, ung thư tử cung, ung thư ống mật, bệnh bạch cầu (ví dụ, bệnh bạch cầu dòng tuỷ cấp tính), u lympho (ví dụ, bệnh Hodgkin, u lympho không Hodgkin), u tuỷ, ung thư đầu và cổ, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư não (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm), ung thư tuyến giáp, ung thư đại trực tràng và/hoặc ung thư da (ví dụ, u ác tính), hoặc bất kỳ di căn nào của chúng (Dumontet and Jordan (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803).

[00193] Trong các phương án khác nhau, các kháng thể được bộc lộ, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC có thể được dùng trong tế bào hoặc mô bất kỳ mà biểu hiện mesothelin, chẳng hạn như mô hoặc tế bào ung thư biểu hiện mesothelin. Phương án ví dụ bao gồm phương pháp ức chế sự truyền tín hiệu tế bào qua trung gian mesothelin

hoặc phương pháp tiêu diệt tế bào. Phương pháp này có thể được sử dụng với tế bào hoặc mô bất kỳ mà biểu hiện mesothelin, như tế bào ung thư hoặc tổn thương di căn. Các ví dụ không giới hạn của các ung thư biểu hiện mesothelin bao gồm u trung biểu mô, ung thư tuyến tụy (ví dụ, ung thư biểu mô tuyến tụy), ung thư buồng trứng (ví dụ, ung thư buồng trứng huyết thanh, ung thư buồng trứng tế bào sạch, ung thư buồng trứng biểu mô), và ung thư phổi (ví dụ, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư biểu mô tuyến phổi) (Wang et al. (2012) PLoS ONE 7:e33214). Các loại ung thư mesothelin ví dụ khác bao gồm ung thư nội mạc tử cung, ung thư đại trực tràng, ung thư dạ dày, bệnh bạch cầu, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, ung thư gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư tuyến giáp, ung thư biểu mô, ung thư tử cung và ung thư ống mật. Các ví dụ không giới hạn của các tế bào biểu hiện mesothelin bao gồm các tế bào ung thư biểu mô buồng trứng OVCAR3 ở người, các tế bào nội mạc tử cung HEC-251 ở người, các tế bào trung biểu mô tế bào vảy ở phổi H226 ở người và các tế bào chứa axit nucleic tái tổ hợp mã hóa mesothelin hoặc một phần của chúng.

[00194] Các phương pháp ví dụ bao gồm các bước cho tế bào tiếp xúc với kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC, như được mô tả ở đây, với lượng hữu hiệu, nghĩa là, lượng đủ để tiêu diệt tế bào. Phương pháp có thể được sử dụng trên tế bào trong nuôi cấy, ví dụ, in vitro, in vivo, ex vivo, hoặc in situ. Ví dụ, các tế bào mà biểu hiện mesothelin (ví dụ, các tế bào được thu thập bằng sinh thiết khối u hoặc tổn thương di căn; các tế bào từ dòng tế bào ung thư được thiết lập; hoặc các tế bào tái tổ hợp), có thể được nuôi cấy in vitro trong môi trường nuôi cấy và bước tiếp xúc có thể bị ảnh hưởng bởi việc bổ sung kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC vào môi trường nuôi cấy. Phương pháp sẽ dẫn đến sự tiêu diệt các tế bào biểu hiện mesothelin, bao gồm cụ thể là các tế bào khối u biểu hiện mesothelin. Mặt khác, kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC có thể được dùng cho đối tượng bằng đường dùng thích hợp bất kỳ (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc tiếp xúc trực tiếp với mô khối u) để có tác dụng in vivo. Cách tiếp cận này cũng có thể được sử dụng cho các kháng thể và các ADC nhắm mục tiêu đến các kháng nguyên bề mặt tế bào khác.

[00195] Tác dụng in vivo của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc chế phẩm trị liệu ADC được bộc lộ có thể được đánh giá trên mô hình động vật thích hợp. Ví dụ, các mô hình ung thư khác loại có thể được sử dụng, trong đó các mô cấy bên ngoài ung thư hoặc các mô ghép khác loại đã được cấy chuyển được đưa vào trong các con vật

thỏa hiệp miễn dịch, như chuột nhất trụ lông hoặc SCID (Klein et al. (1997) Nature Med. 3:402-8). Hiệu quả có thể được dự đoán sử dụng các thử nghiệm mà đo sự ức chế của sự tạo thành khối u, sự thoái triển khối u hoặc sự di căn, và dạng tương tự.

[00196] Các thử nghiệm in vivo mà đánh giá sự thúc đẩy của sự chết khối u bằng các cơ chế như sự chết theo chương trình cũng có thể được sử dụng. Theo một số phương án, các mảnh ghép khác loại từ chuột mang khối u được điều trị bằng chế phẩm trị liệu có thể được kiểm tra về sự có mặt của các ổ chết theo chương trình và được so sánh với chuột mang khối u khác loại đối chứng không được điều trị. Phạm vi mà các ổ chết theo chương trình được phát hiện thấy ở các khối u của chuột đã được điều trị cung cấp chỉ thị về hiệu quả trị liệu của chế phẩm.

[00197] Còn được đề xuất ở đây là các phương pháp điều trị ung thư. Các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC được bộc lộ ở đây có thể được dùng cho đối tượng là động vật có vú không phải là người hoặc là người nhằm các mục đích trị liệu. Các phương pháp trị liệu đòi hỏi việc dùng cho động vật có vú có khối u lượng hữu hiệu sinh học của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc ADC bao gồm eribulin được nối với kháng thể mục tiêu mà gắn với kháng nguyên được biểu hiện, có thể tiếp cận để gắn, hoặc được khu trú trên bề mặt tế bào ung thư.

[00198] Phương án ví dụ là phương pháp phân phối eribulin tới tế bào biểu hiện mesothelin, bao gồm việc liên hợp eribulin với kháng thể mà gắn đặc hiệu miễn dịch với biểu mô mesothelin và phối nhiễm tế bào với kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc ADC. Các tế bào khối u ví dụ mà biểu hiện mesothelin cho nó các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC theo sáng chế được chỉ báo bao gồm tế bào ung thư biểu mô buồng trứng, tế bào nội mạc tử cung và tế bào ung thư biểu mô tế bào vảy phổi.

[00199] Phương án ví dụ khác phương pháp làm giảm hoặc ức chế sự phát triển của khối u biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ, khối u biểu hiện mesothelin), bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên và/hoặc ADC. Theo một số phương án, việc điều trị đủ để làm giảm hoặc ức chế sự phát triển của khối u của bệnh nhân, làm giảm số lượng hoặc kích thước của tổn thương di căn, làm giảm tải lượng khối u, làm giảm tải lượng khối u nguyên phát, làm giảm xâm lấn, kéo dài thời gian sống, và/hoặc duy trì hoặc cải thiện chất lượng cuộc sống. Trong một số phương

án, khối u kháng hoặc khó chữa đối với việc điều trị với kháng thể hoặc gốc gắn kháng nguyên của ADC khi được dùng một mình, và/hoặc khối u kháng hoặc khó chữa đối với việc điều trị với eribulin khi được dùng một mình.

[00200] Hơn nữa, các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng cho động vật có vú không phải là người biểu hiện mesothelin cho các mục đích thú y hoặc làm mô hình động vật của bệnh ở người. Đối với vấn đề sau, các mô hình động vật này có thể hữu dụng để đánh giá hiệu quả trị liệu của các kháng thể được bộc lộ, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC (ví dụ, thử nghiệm các liều dùng và các khoảng thời gian dùng).

[00201] Cũng được đề xuất ở đây là các việc sử dụng trị liệu của các kháng thể được bộc lộ, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC. Phương án ví dụ là việc sử dụng của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC trong việc điều trị của ung thư biểu hiện kháng nguyên mục tiêu (ví dụ, ung thư biểu hiện mesothelin) cũng được bộc lộ. Các phương pháp xác định các đối tượng có các ung thư mà biểu hiện kháng nguyên mục tiêu (ví dụ, mesothelin) đã được biết đến trong lĩnh vực và có thể được sử dụng để xác định các bệnh nhân thích hợp để điều trị với kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC được bộc lộ.

[00202] Phương án ví dụ khác là việc sử dụng của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC trong phương pháp sản xuất thuốc cho việc điều trị ung thư biểu hiện kháng nguyên mục tiêu (ví dụ, ung thư biểu hiện mesothelin).

[00203] Các chế phẩm trị liệu được sử dụng trong việc thực hành các phương pháp nêu trên có thể được tạo chế phẩm thành các dược phẩm bao gồm chất mang dược dụng thích hợp đối với phương pháp phân phối mong muốn. Phương án ví dụ là dược phẩm bao gồm kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC theo sáng chế và chất mang dược dụng. Các chất mang thích hợp bao gồm nguyên liệu bất kỳ mà, khi được kết hợp với chế phẩm trị liệu, giữ được chức năng kháng khối u của chế phẩm trị liệu và nhìn chung không phản ứng với hệ thống miễn dịch của bệnh nhân.

[00204] Các chất mang dược dụng bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và tương tự mà tương thích về mặt lý sinh. Các ví dụ của các chất mang dược dụng bao gồm một hoặc nhiều trong số nước, nước muối, nước muối đậm phosphat,

dextroza, glyxerol, etanol, muối mesylat, và tương tự, cũng như các kết hợp của chúng. Trong nhiều trường hợp, chất đẳng trương được bao gồm, ví dụ như đường, rượu đa chức, như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm. Các chất mang được dùng còn có thể chứa các lượng nhỏ các chất phụ trợ như chất làm ướt hoặc chất nhũ hoá, chất bảo quản hoặc chất đệm, mà làm tăng tuổi thọ hoặc hiệu quả của ADC.

[00205] Các chế phẩm trị liệu có thể được hòa tan và được dùng thông qua đường dùng bất kỳ có khả năng phân phối chế phẩm trị liệu đến vị trí khối u. Các đường dùng hữu hiệu tiềm năng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trong tĩnh mạch, ngoài đường tiêu hóa, trong màng bụng, trong cơ, trong khối u, trong da, trong cơ quan, tại vị trí, và tương tự. Các chế phẩm protein trị liệu có thể được đông khô và bảo quản dưới dạng bột vô trùng, ví dụ, trong chân không, và sau đó được hoàn nguyên trong nước kìm hãm vi khuẩn (ví dụ, chứa chất bảo quản rượu benzyl) hoặc trong nước vô trùng trước khi tiêm. Các chế phẩm trị liệu có thể bao gồm kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC hoặc muối được dùng của chúng, ví dụ, muối mesylat.

[00206] Các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC được bộc lộ ở đây có thể được dùng ở liều dùng nằm trong khoảng từ khoảng 0,2 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg với bệnh nhân cần. Trong một số phương án, kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC được dùng cho bệnh nhân hàng ngày, hai tháng một lần hoặc bất kỳ khoảng thời gian nào ở giữa chúng. Các liều dùng và các quy trình dùng để điều trị các bệnh ung thư bằng các phương pháp nêu trên sẽ thay đổi theo phương pháp và loại ung thư mục tiêu, và thường sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố khác được hiểu rõ trong lĩnh vực này.

[00207] Các hệ thống phân phối khác nhau đã được biết đến và có thể được sử dụng để dùng một hoặc nhiều kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC theo sáng chế. Các phương pháp dùng các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), dùng ngoài màng cứng, dùng trong khối u và dùng qua niêm mạc (ví dụ, đường mũi và đường miệng). Ngoài ra, có thể sử dụng qua đường phổi, ví dụ, bằng cách sử dụng dụng cụ xông hoặc khí dung, và bào chế với chất tạo sol khí. Xem, ví dụ, các chế phẩm và các phương pháp dùng cho đường phổi được mô tả trong các patent Mỹ số 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, và 4,880,078; và công bố quốc tế số WO

1992/019244, WO 1997/032572, WO 1997/044013, WO 1998/031346, và WO 1999/066903. ADC có thể được dùng bằng con đường thuận tiện bất kỳ, ví dụ bằng cách truyền hoặc tiêm bolus, hoặc bằng sự hấp thụ thông qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.). Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc khu trú.

[00208] Các chế phẩm trị liệu được bộc lộ ở đây là tiết trùng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và lưu trữ. Trong một số phương án, một hoặc nhiều của các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC, hoặc các dược phẩm, được cung cấp dưới dạng bột đông khô tiết trùng khô hoặc chất cô không chứa nước trong vật kín khí và có thể được hoàn nguyên (ví dụ, với nước hoặc nước muối) đến nồng độ thích hợp để sử dụng cho đối tượng. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tác nhân hoặc dược phẩm phòng ngừa hoặc trị liệu được cung cấp dưới dạng bột đông khô vô trùng khô trong vật chứa được bịt kín khí ở liều đơn vị bằng ít nhất 5 mg, ít nhất 10 mg, ít nhất 15 mg, ít nhất 25 mg, ít nhất 35 mg, ít nhất 45 mg, ít nhất 50 mg, ít nhất 75 mg, hoặc ít nhất 100 mg, hoặc lượng bất kỳ ở giữa chúng. Trong một số phương án, các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC hoặc các dược phẩm được đông khô được lưu trữ ở nhiệt độ giữa 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu. Trong một số phương án, một hoặc nhiều của các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC hoặc các dược phẩm được mô tả ở đây được cung cấp ở dạng lỏng trong vật chứa được bịt kín khí, ví dụ, vật chứa chỉ ra lượng và nồng độ của chất. Trong một số phương án, dạng lỏng của chế phẩm được dùng được cung cấp trong vật chứa được bịt kín khí là ít nhất 0,25 mg/ml, ít nhất 0,5 mg/ml, ít nhất 1 mg/ml, ít nhất 2,5 mg/ml, ít nhất 5 mg/ml, ít nhất 8 mg/ml, ít nhất 10 mg/ml, ít nhất 15 mg/ml, ít nhất 25 mg/ml, ít nhất 50 mg/ml, ít nhất 75 mg/ml, hoặc ít nhất 100 mg/ml ADC. Dạng lỏng có thể được lưu trữ ở nhiệt độ giữa 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu.

[00209] Trong một số phương án, các kháng thể được bộc lộ, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa. Dung dịch có thể tiêm này có thể chứa dạng liều lỏng hoặc đông khô trong lọ bằng đá lửa hoặc hồ phách, ampun, hoặc ống tiêm nhồi sẵn, hoặc dụng cụ phân phối hoặc lưu trữ đã biết khác.

[00210] Các chế phẩm được mô tả ở đây có thể có nhiều dạng khác nhau. Chúng bao gồm, ví dụ, dạng liều lỏng, bán rắn và rắn, như dung dịch lỏng (ví dụ, dung dịch tiêm

được và truyền được), dịch phân tán hoặc huyền phù, viên nén, viên tròn, bột, liposom và thuốc đạn. Dạng phụ thuộc vào phương thức sử dụng và việc sử dụng để điều trị dự kiến.

[00211] Trong các phương án khác nhau, việc điều trị bao gồm liều bolus đơn lẻ hoặc việc dùng lặp lại chế phẩm kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC qua đường dùng được chấp nhận.

[00212] Các bệnh nhân có thể được đánh giá về các mức độ của kháng nguyên đích trong mẫu nhất định (ví dụ các mức độ của tế bào biểu hiện kháng nguyên mục tiêu) để hỗ trợ việc xác định phác đồ dùng liều hữu hiệu nhất, v.v.. Phương án ví dụ là phương pháp xác định xem bệnh nhân có đáp ứng với việc điều trị với kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC theo sáng chế hay không, bao gồm việc cung cấp mẫu sinh học từ bệnh nhân và cho mẫu sinh học này tiếp xúc với kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC. Các mẫu sinh học ví dụ bao gồm mô hoặc dịch cơ thể, như dịch tiết viêm, máu, huyết thanh, dịch ruột, mẫu phân, hoặc sinh thiết khối u (ví dụ, sinh thiết khối u có nguồn gốc từ bệnh nhân mắc hoặc có nguy cơ mắc ung thư biểu hiện kháng nguyên mục tiêu, ví dụ, ung thư biểu hiện mesothelin). Trong một số phương án, mẫu (ví dụ, mô và/hoặc dịch cơ thể) có thể được lấy từ đối tượng, và phương pháp miễn dịch học thích hợp có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo sự biểu hiện protein của kháng nguyên đích (ví dụ, mesothelin). Những đánh giá như vậy cũng được sử dụng cho mục đích theo dõi trong suốt quá trình điều trị, và hữu ích để đánh giá sự thành công trong điều trị kết hợp với việc đánh giá các thông số khác.

[00213] Trong một số phương án, hiệu quả của kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC có thể được đánh giá bằng cách cho mẫu khối u từ đối tượng tiếp xúc với kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC và đánh giá tốc độ phát triển hoặc thể tích khối u. Trong một số phương án, khi kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC đã được xác định là có hiệu quả, nó có thể được dùng cho đối tượng.

[00214] Các phương pháp trị liệu trên có thể được kết hợp với bất kỳ một trong nhiều phác đồ điều trị phẫu thuật, hóa trị liệu hoặc xạ trị bổ sung. Trong một số phương án, các kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC hoặc các chế phẩm được bộc lộ ở đây được đồng tạo chế phẩm và/hoặc được đồng sử dụng với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung, ví dụ, một hoặc nhiều các tác nhân hóa trị liệu. Ví dụ không

làm giới hạn sáng chế về chất hóa trị liệu bao gồm chất alkyl hóa, ví dụ, mù tạt nitơ, các hợp chất etylenimin, và alkyl sulphonat; các chất chống chuyển hóa, ví dụ, axit folic, các chất đối kháng purin hoặc pyrimidin; các chất chống phân bào, ví dụ, chất kháng tubulin như eribulin hoặc eribulin mesylat (Halaven™), vinca alkaloid, và auristatin; chất kháng sinh gây độc tế bào; hợp chất mà làm hư hỏng hoặc cản trở sự biểu hiện hoặc sự sao chép ADN, ví dụ, chất gắn rãnh nhỏ ADN; và chất đối kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng. Theo một số phương án, tác nhân hóa trị liệu có thể là tác nhân gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào. Các ví dụ của các chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất chống phân bào, chẳng hạn như eribulin hoặc eribulin mesylat (Halaven™), auristatin (ví dụ, monomethyl auristatin E (MMAE), monomethyl auristatin F (MMAF)), maytansinoid (ví dụ, maytansin), dolastatin, duostatin, cryptophycin, vinca alkaloid (ví dụ, vincristin, vinblastin), taxan, taxol, và colchicin; anthracyclin (ví dụ, daunorubicin, doxorubicin, dihydroxyanthracindion); các chất kháng sinh gây độc tế bào (ví dụ, mitomycin, actinomycin, duocarmycin (ví dụ, CC-1065), auromycin, duomycin, calicheamicin, endomycin, phenomycin); các chất alkyl hóa (ví dụ, cisplatin); các chất xen vào giữa (ví dụ, ethidi bromua); chất ức chế topoisomeraza (ví dụ, etoposid, tenoposid); các đồng vị phóng xạ, chẳng hạn như At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212 hoặc 213, P32, và các đồng vị phóng xạ của luteti (ví dụ, Lu177); và độc tố có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật (ví dụ, ricin (ví dụ, ricin chuỗi A), độc tố bạch hầu, ngoại độc tố A *Pseudomonas* (ví dụ, PE40), nội độc tố, mitogellin, combrestatin, restrictocin, gelonin, alpha-sarcin, abrin (ví dụ, abrin chuỗi A), modeccin (ví dụ, modeccin chuỗi A), curicin, crotin, chất ức chế *Saponaire officinalis*, glucocorticoid).

[00215] Cũng được bộc lộ ở đây là các việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể, mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc ADC được bộc lộ trong việc sản xuất thuốc để điều trị ung thư, ví dụ, theo các phương pháp được mô tả ở trên. Trong một số phương án, các ADC được bộc lộ ở đây được sử dụng để điều trị ung thư, ví dụ, theo các phương pháp được mô tả ở trên.

[00216] Trong các phương án khác nhau, các bộ dụng cụ để sử dụng trong các ứng dụng trong phòng thí nghiệm và điều trị được mô tả ở đây nằm trong phạm vi của sáng chế. Bộ dụng cụ này có thể bao gồm chất mang, bao gói, hoặc vật chứa mà được chia ngăn để chứa một hoặc nhiều vật chứa chẳng hạn như lọ, ống, và tương tự, mỗi vật chứa

bao gồm một trong số các bộ phận riêng biệt để được sử dụng trong phương pháp được bộc lộ ở đây, cùng với nhãn hoặc tờ hướng dẫn bao gồm hướng dẫn sử dụng, chẳng hạn như việc sử dụng được mô tả ở đây. Bộ kit có thể có chứa vật chứa có chứa gốc thuốc. Sáng chế cũng đề xuất một hoặc nhiều kháng thể, các mảnh gắn kháng nguyên, và/hoặc các ADC, hoặc các dược phẩm của nó, được bao gói trong vật chứa được bịt kín khí, chẳng hạn như ampun hoặc túi, chỉ ra lượng của chất.

[00217] Các bộ dụng cụ có thể bao gồm vật chứa được mô tả ở trên và một hoặc nhiều vật chứa khác được kết hợp với nó mà bao gồm các nguyên liệu mong muốn theo quan điểm thị trường và người dùng, bao gồm chất đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm, ống tiêm; nhãn chất mang, bao gói, vật chứa, lọ và/hoặc ống liệt kê các chất chứa bên trong và/hoặc hướng dẫn sử dụng, và tờ hướng dẫn sử dụng với sự hướng dẫn sử dụng.

[00218] Nhãn có thể có trên hoặc cùng với vật chứa để chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng cho liệu pháp hoặc ứng dụng không trị liệu cụ thể, như ứng dụng tiên lượng, dự phòng, chẩn đoán hoặc trong phòng thí nghiệm. Nhãn cũng có thể chỉ ra hướng dẫn để sử dụng in vivo hoặc in vitro, như hướng dẫn được mô tả ở đây. Hướng dẫn và hoặc thông tin khác cũng có thể được bao gồm trên (các) vật gài hoặc (các) nhãn, mà được bao gồm với hoặc ở trên bộ kit. Nhãn có thể ở trên hoặc kèm theo vật chứa. Nhãn có thể ở trên vật chứa khi chữ cái, chữ số, hoặc ký tự khác tạo thành nhãn được đúc hoặc khắc vào bản thân vật chứa. Nhãn có thể được kèm theo vật chứa khi nó có mặt ở trong hộp đựng hoặc vật mang mà cũng giữ vật chứa, ví dụ như, dưới dạng vật gài bao gói. Nhãn có thể chỉ ra rằng hợp phần được sử dụng để chẩn đoán hoặc điều trị tình trạng bệnh, chẳng hạn như ung thư được mô tả trong bản mô tả này.

[00219] Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng các sửa đổi và sự thích ứng thích hợp khác của các phương pháp theo sáng chế được mô tả ở đây là hiển nhiên và có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các dạng tương đương thích hợp mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế hoặc các phương án được bộc lộ ở đây. Sáng chế đã được mô tả một cách chi tiết, sau đây sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ sau đây, mà được kết hợp chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm mục đích giới hạn sáng chế.

VÍ DỤ THỰC HIỆN SÁNG CHẾ

Ví dụ 1 Việc tạo ra kháng thể khảm đối với mesothelin ở người

[00220] Các kháng thể khảm chứa trình tự globulin miễn dịch ở thỏ và người được tạo ra theo các quy trình được mô tả dưới đây. Các kháng thể được phân tích về khả năng gắn với mesothelin của người và gắn epitop. Khả năng gây độc tế bào ADC ban đầu của các kháng thể kháng mesothelin khảm tái tổ hợp được đánh giá trong các dòng tế bào ở người biểu hiện các mức độ khác nhau của mesothelin. Các kháng thể dẫn đầu để người hóa và phát triển ADC được mô tả trong các Ví dụ 2-3.

1.1 Các chất phản ứng và các nguyên liệu

1.1.1 Các kháng thể

[00221] Các kháng thể được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây là dạng khảm (-xi) của thỏ-người của các kháng thể kháng mesothelin ở người và có cystein không được ghép đôi ở vị trí chuỗi nhẹ 80 (LCcys80). Các kháng thể đã được tinh sạch và khử cysteinyl như được mô tả dưới đây trong Phần 1.5. Hàm lượng protein cuối cùng được đánh giá bằng thử nghiệm BCA và SDS-PAGE.

1.1.2 Các tế bào gây độc có thể liên hợp và các ADC LCcys80

[00222] Các hợp cầu nối-gây độc tế bào được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây bao gồm Mal-PEG₂- Auristatin F. Các kháng thể được liên hợp với Mal-PEG₂-Auristatin F theo tỷ lệ mol 1:5 (mAb: phụ tải). Các kháng thể LCcys80 được liên hợp được tinh sạch sử dụng sắc ký khử muối với các cột khử muối HiTrap 2x5 mL (GE Healthcare) trên AKTA FPLC, sử dụng 1X DPBS làm đệm chạy. Hàm lượng protein cuối cùng được xác định bằng thử nghiệm BCA.

1.1.3 Các dòng tế bào khối u

[00223] Các dòng tế bào khối u ở người được sử dụng trong các phân tích các ADC thể khảm ở thỏ-người bao gồm A431-K5 (các tế bào u ác tính A431 ở người được chuyển nhiễm ổn định với mesothelin ở người, MSLN^{hi}), A431 (MSLN^{lo}) và OVCAR3 (ung thư biểu mô buồng trứng ở người, MSLN^{hi}). Các tế bào A431-K5 được lấy từ Viện Ung thư Quốc gia. Các dòng tế bào được sử dụng được lấy trực tiếp từ Bộ sưu tập Văn hóa Kiểu Mỹ (ATCC).

1.1.4 Các chất phản ứng khác

[00224] Tất cả các chất phản ứng được sử dụng đều được lấy từ các nhà cung cấp thương mại ở cấp độ nghiên cứu hoặc cao hơn, trừ khi có chỉ định khác.

1.2 Việc tạo ra các kháng thể ở thỏ đối với mesothelin ở người

[00225] cDNA mesothelin ở người từ vector p0301 được nhân dòng thành vector biểu hiện Aldevron (pB8-Mesothelin-hum). Hai con thỏ sau đó được chủng ngừa bằng vector miễn dịch pB8-mesothelin ở người. Sau bốn ứng dụng di truyền, huyết thanh miễn dịch được lấy vào ngày thứ 52 của quy trình tiêm chủng. Huyết thanh miễn dịch ở thỏ được pha loãng 1:1000 hoặc 1:5000 trong PBS chứa BSA 1%, và được kiểm tra bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy sử dụng các tế bào động vật có vú trước đó đã được chuyển nhiễm tạm thời với cADN mesothelin ở người được nhân bản thành vector biểu hiện Aldevron (pB1-mesothelin-hum) và các tế bào động vật có vú được chuyển nhiễm tạm thời với cADN không liên quan được nhân dòng vào cùng vector. Các kháng thể từ huyết thanh miễn dịch sau đó được phát hiện với 10 µg/mL IgG R-phycoerythrin kháng thỏ ở dê. (Southern Biotech, #4030-09). Việc chủng ngừa, đo dòng chảy tế bào và bảo quản lạnh tế bào được thực hiện bởi Aldevron (Dreiburg, Đức).

1.3 Sàng lọc thông lượng cao đối với các mẫu nuôi cấy sản xuất các kháng thể kháng mesothelin

1.3.1 Nuôi cấy tế bào

[00226] Tế bào nút hạch ở thỏ được bảo quản lạnh ($2,0 \times 10^7$ tế bào) được rã đông sau đó được hoạt hóa với 2,5 µg/mL lectin từ *Phytolacca americana* và được khôi phục bằng DNAza I trong một giờ ở 37°C với CO₂ 5%. Các tế bào được gieo ở 5 tế bào mỗi giếng trên đĩa 384 giếng với các tế bào nạp (các CHO biểu hiện CD154 ở thỏ) và được nuôi cấy trong IMDM hoàn chỉnh (IMDM được bổ sung FBS 10%, L-glutamin 2 mM, 1X MEM NEAA, Natri Pyruvat 1 mM, Penicillin 50 U/mL, Streptomycin 50 µg/mL, 2-Me 55 µM) chứa IL2 ở người 10,5 ng/mL và cytokin IL21 ở người 10,5 ng/mL (PeproTech).

1.3.2 Việc phân lập các kháng thể đa dòng và IgG ở thỏ đối với mesothelin ở người

[00227] Vào tuần thứ 2, các giếng sản xuất kháng thể IgG ở thỏ được xác định bởi IgG FRET sử dụng europium cryptat. Các giếng sản xuất IgG được sàng lọc sự hiện diện của kháng thể IgG Fcy ở thỏ bằng ELISA trên các đĩa được phủ với 1 µg/mL của mesothelin CHO-MT40. Các mẫu nuôi cấy tạo ra IgG ở thỏ đặc hiệu với mesothelin được xác nhận bằng việc sàng lọc ELISA trên 1 µg/mL của mesothelin và được sàng lọc đếm đối với 1 µg/mL của CD73-his. FRET và ELISA được thực hiện trên hệ thống robot Biomek® FX (Beckman).

1.3.3 Giải cứu gen mARN của các kháng thể ở thỏ đối với mesothelin của người

[00228] ARN tổng số được phân lập từ các giếng sản xuất các kháng thể kháng mesothelin IgG ở thỏ sử dụng bộ dụng cụ phân lập ARN tổng số RNAqueous™-96 (Ambion). cADN được tổng hợp và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng được khuếch đại bằng PCR sử dụng bộ dụng cụ RT-PCR một bước Platinum Taq (Invitrogen) sử dụng các đoạn mỗi nội bộ (Bảng 11). Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng được khuếch đại với các đoạn mỗi lồng nhau (Bảng 12) sử dụng bộ dụng cụ khuếch đại Platinum Taq và bộ quay vòng nhiệt (40 chu kỳ, 1 phút 94°C, 1 phút 54°C, 1,5 phút 68°C). Khuôn ADN được khuếch đại được quan sát trực quan bằng phương pháp điện di trên gel, được tinh sạch bằng bộ dụng cụ tinh sạch QIAquick 96 PCR (Qiagen) và trình tự ADN được xác định bởi GeneWiz (South Plainfield, NJ) bằng cách sử dụng các đoạn mỗi nội bộ (Bảng 13). Các trình tự ADN được phân tích đối với các họ thỏ gen V và gen J (IMGT/V-QUEST) và đối với cơ sở dữ liệu đoạn mỗi trong dung hợp nội bộ (Blastn). Các đoạn mỗi trong dung hợp (Bảng 14) được xác định hoặc được thiết kế chứa trình tự liên kết Fc ở người được thêm vào đầu 5' của đoạn mỗi gen V và J. Các đoạn mỗi được tổng hợp bởi IDT (Coralville, IA).

Bảng 11. Các trình tự đoạn mỗi được sử dụng cho RT-PCR một bước

Gen	Đoạn mỗi 5'	Đoạn mỗi 3'
Nặng	TYCTCCTGGTCRCTSYGCTC (SEQ ID NO: 37)	TTGGTGTTGGTGGCTGGGGTG (SEQ ID NO: 38)
Nhẹ	GGGCCCCCACTCAGCTGCTG (SEQ ID NO: 39)	GTTBTACTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 40)

Bảng 12. Các trình tự đoạn mỗi được sử dụng cho PCR

Gen	Đoạn mỗi 5'	Đoạn mỗi 3'
Nặng	TYCTCCTGGTCRCTSYGCTC (SEQ ID NO: 41)	TTGGTGTTGGTGGCTGGGGTG (SEQ ID NO: 42)

Nhẹ	ACTCAGCTGCTGGGGCTCCT (SEQ ID NO: 43)	GTTBTACTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 44)
-----	---	---

Bảng 13. Các trình tự đoạn mồi được sử dụng cho việc giải trình tự khuôn ADN

Gen	Đoạn mồi 3'
Nặng	TTGGTGTGTTGGTGGCTGGGTG (SEQ ID NO: 45)
Nhẹ	GTTBTACTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 46)

Bảng 14. Các trình tự đoạn mồi được sử dụng cho việc PCR trong dung hợp cho mẫu 345A12

Gen	Đoạn mồi 5'	Đoạn mồi 3'
Nặng	gccaccggcgtgcactccCAGTCGYTGGAG GAGTCCGGGGG (SEQ ID NO: 47)	gggcccttggtggatgcTGARGAGACRG TGACSAGGGTSCC (SEQ ID NO: 48)
Nhẹ	gccaccggcgtgcactccGCCTATGATATG ACCCAGACTCCA (SEQ ID NO: 49)	agccacagttcgTTTGACSACCACCTC GGTCCC (SEQ ID NO: 50)

1.3.4 Các mảnh PCR

[00229] Các miền biến đổi được khuếch đại PCR bao gồm 15 cặp bazơ ở các đầu 5' và 3' tương đồng với vị trí nhân bản trong vectơ dòng con. Các đoạn PCR được nhân dòng thành plasmid biểu hiện chứa gamma ở người (p1974 pC+75IZ-ldr-InFusion-hugamma) hoặc vùng hằng số kappa (p1975 pC+75IB-ldr-InFusion-hukappa) sử dụng bộ dụng cụ nhân dòng In-Fusion HD (Clontech) theo quy trình của nhà sản xuất. 1 µL của phản ứng trong dung hợp được biến nạp vào các tế bào bổ thể Stellar (Clontech) theo quy trình của nhà sản xuất. Các chất biến đổi được nuôi trong môi trường TB 1 mL (Teknova) qua đêm ở 37°C trên máy lắc đĩa vi chuẩn độ. Ngày hôm sau, các mẫu nuôi

cây được chuẩn bị nhỏ bằng bộ dụng cụ miniprep QIAprep 96 Turbo (Qiagen) sử dụng epMotion 5075 theo quy trình của nhà sản xuất.

1.3.5 Các đoạn tổng hợp gen

[00230] Các miền biến đổi nhẹ và nặng được người hóa được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong các tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO) và được tổng hợp bởi GeneArt. Các miền biến đổi được tổng hợp với trình tự khởi đầu dịch mã Kozak và trình tự dẫn đầu tiết Ig, và bao gồm 15 cặp bazơ ở các đầu 5' và 3' tương đồng với vị trí nhân bản trong vector dòng phụ. Các đoạn PCR được tổng hợp bởi GeneArt được nhân dòng phụ thành plasmit biểu hiện chứa gamma ở người (p1974 pC+75IZ-ldr-InFusion-hugamma) hoặc vùng hằng số kappa (p1975 pC+75IB-ldr-InFusion-hukappa) sử dụng bộ dụng cụ nhân dòng In-Fusion HD (Clontech). Tất cả các dòng vô tính đều được giải trình tự để xác nhận sự hiện diện và độ chính xác của các đoạn chèn.

1.4 Sản xuất mAb tạm thời

1.4.1 Các tế bào HEK

[00231] Đối với mỗi ml của 3×10^6 tế bào cần được chuyển nhiễm với ExpiFectamine (ThermoFisher), 333,3 ng HC plasmit và 333,3 ng LC plasmit được ủ trong 5-10 phút trong Opti-MEM 50 μ L (ThermoFisher). Tương tự, ExpiFectamine 2,67 μ L được ủ trong Opti-MEM 50 μ L. Dung dịch ExpiFectamine được thêm vào hỗn hợp ADN và ủ trong 20-30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp ADN: ExpiFectamine được thêm vào các tế bào trong khi xoay và được ủ ở 37°C, CO₂ 8%, lắc ở tốc độ 125 vòng/phút. Ngày tiếp theo, 5 μ L chất tăng cường 1 và 50 μ L chất tăng cường 2 mỗi mL tế bào được thêm vào quá trình chuyển nhiễm và tiếp tục ủ trong 7-10 ngày nữa. Sau 48-72 giờ, các tế bào được cho ăn ở nồng độ cuối cùng là Yeastolate 10 g/L (BD Biosciences), axit valeric 5 mM (Sigma-Aldrich) và CD nồng độ lipid 1:100 (ThermoFisher).

1.4.2 Các tế bào CHO

[00232] Đối với mỗi ml 6×10^6 tế bào cần được chuyển nhiễm bằng ExpiFectamine CHO (ThermoFisher), 500 ng HC plasmit và 500 ng LC plasmit được trộn trong Opti-PRO (ThermoFisher) với tổng thể tích 40 μ L. Tương tự, 3,2 μ L ExpiFectamine CHO được trộn lẫn trong 36,8 μ L Opti-PRO. Dung dịch ExpiFectamine CHO được thêm vào hỗn hợp ADN và ủ trong 1- 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp

ADN:ExpiFectamine CHO được thêm vào các tế bào trong khi xoay và được ủ ở 37°C, CO₂ 8%, lắc ở tốc độ 125 vòng/phút. Ngày tiếp theo, 6 µL chất tăng cường và 160 µL thức ăn cho mỗi mL tế bào được thêm vào quá trình chuyển nhiễm, và các tế bào được chuyển đến 32°C, CO₂ 5%. Vào ngày thứ 5, thêm 160 µL thức ăn cho mỗi mL tế bào được thêm vào. Vào ngày 12 đến ngày 14, các dịch nổi được thu hoạch.

1.5 Việc tinh sạch mAb và khử cystein hóa

1.5.1 Việc tinh sạch kháng thể

[00233] Nhựa protein A khả năng cao Prosep-vA (Millipore) được cân bằng với DPBS, và 50 µL được bổ sung vào 2 mL của mẫu. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, môi trường và nhựa được bổ sung vào đĩa lọc và được rửa hai lần bằng DPBS 1 mL. Mẫu được rửa giải từ nhựa bằng cách bổ sung 400 µL Glycine 0,1 M, độ pH 2,9 sau đó ly tâm ở 15000 x g trong 30 giây. Mẫu được trung hòa với 20 µL Tris 1 M, độ pH 8,0. Các mẫu được cô đến khoảng 100 µL bằng cách ly tâm ở 15000 xg trong 5 phút sử dụng Amicon Ultra 0,5 mL, bộ lọc cắt 10k (Millipore) và được trao đổi đệm thành DPBS bằng cách sử dụng các cột khử muối Zeba 0,5 mL, 7K MWCO, theo quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ mAb được xác định bằng cách đo AU280 và được chuyển đổi thành mg/mL sử dụng hệ số tắt của mAb.

1.5.2 Khử mũ cystein

[00234] Việc tinh sạch được thực hiện sử dụng nền tinh sạch AKTA Xpress (GE Healthcare). Tối 1 L môi trường được điều hòa được tải lên cột MabSelect 5 mL (GE Healthcare) được cân bằng trong natri phosphat 20 mM, NaCl 150 mM, độ pH 7,0. Cột được rửa kỹ bằng dung dịch đệm cân bằng sau khi chất tải cho đến khi quan sát được đường nền ổn định. Vật liệu gắn được rửa giải sử dụng glyxin 100 mM, độ pH 2,9. Vật liệu được rửa giải ngay lập tức được bơm vào cột khử muối HiPrep 26/10 (GE Healthcare) được cân bằng trong dung dịch muối đệm phosphat 1X (PBS) và được rửa giải trong cùng dung dịch đệm. Các phân đoạn đỉnh được gộp chung. Vật liệu được phân tích hàm lượng protein bằng thử nghiệm BCA (ThermoFisher) và điện di bằng cách khử và không khử SDS-PAGE.

1.6 Sàng lọc ban đầu và xác định đặc điểm của các kháng thể kháng mesothelin thể khả tái tổ hợp cho sự phát triển ADC

[00235] Các kháng thể kháng mesothelin được biểu hiện tạm thời và được nuôi cấy trong 96 đĩa giếng sâu sử dụng môi trường Expi-293. Các kháng thể từ dịch nổi được tinh sạch và được khử cysteinyl hóa như được mô tả ở trên. Các kháng thể được liên hợp sử dụng Mal-PEG₂-Auristatin F dưới dạng phụ tải sử dụng tỷ lệ mol là 1:5 (mAb:phụ tải). Các kháng thể được liên hợp được khử muối để loại bỏ phụ tải tự do dư thừa sử dụng các đĩa khử muối quay Thermo Zeba.

1.7 Đặc đính gắn

1.7.1 Việc tạo nhóm epitop kháng mesothelin sử dụng Octet

[00236] Epitop gắn kháng thể với mesothelin ban đầu được phân tích đặc tính sử dụng Octet, với đầu Streptavidin, sử dụng thử nghiệm gắn được tùy chỉnh. Việc gắn epitop của các kháng thể kháng mesothelin được chuẩn hóa với epitop được gắn bởi kháng thể kháng mesothelin đã biết, MORAb-009 (Amatuximab). Các kháng thể được phân nhóm dựa trên việc gắn của chúng với các epitop giống nhau, gần đó hoặc khác với MORAb-009. Các bước được lặp lại cho đến khi tất cả các kháng thể được căn chỉnh với việc tạo nhóm epitop khác. Ái lực gắn được xếp hạng là cao, trung bình và thấp dựa trên các kết quả Octet. Tất cả các bước gắn được tiến hành trong bộ đệm PBST chứa BSA 0,2%.

1.7.2 Phân tích gắn cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore)

[00237] Ái lực gắn kháng thể kháng mesothelin với mesothelin được đo bởi BIAcore (BIAcore T-100, GE healthcare, #1426075), sử dụng chip CM5 sêri S. Các nồng độ kháng thể được điều chỉnh tới 1 $\mu\text{g/mL}$ và mesothelin (50 μg) tới 100 nM trong 1X HBS-P+ đệm (GE Healthcare). Chip bắt kháng thể kháng người được chuẩn bị theo quy trình của nhà sản xuất sử dụng chip CM5 với trình hướng dẫn cố định. Các mức kháng thể bắt cuối cùng là 8000-9000 RU, trong HBS-P+. Chip được chuẩn bị cho thử nghiệm với năm chu kỳ tiêm đệm 300 giây sau đó là tái sinh 30 giây, tất cả đều ở tốc độ 30 $\mu\text{L/phút}$ trên tất cả bốn tế bào dòng. Các kháng thể được bắt trên các tế bào dòng 2-4 bằng cách tiêm liên tiếp các dung dịch phối tử riêng lẻ trong 90 giây ở 10 $\mu\text{L/phút}$. Việc tiêm phân tích được thực hiện theo phương thức động học một vòng bằng cách tiêm liên tiếp các dung dịch chất phân tích từ nồng độ thấp đến nồng độ cao trong 240 giây mỗi lần với tốc độ 30 $\mu\text{L/phút}$. Sự phát hiện là 2-1, 3-1, 4-1. Tham chiếu kép được thực hiện

bởi chuỗi các lần tiêm bắt phối tử giống hệt nhau, sau đó là 5 lần tiêm chỉ đệm trong 240 giây mỗi lần, phân ly trong 1800 giây và tái sinh như trên. Tất cả các phối tử được phân tích để gắn với mesothelin trong bản sao. Phân tích động học được thực hiện sử dụng phần mềm BIAEvaluation sử dụng mô hình khớp Langmuir 1:1. Các hằng số tỷ lệ bật, tỷ lệ giảm và ái lực được tính trung bình từ các lần chạy bản sao.

1.8 Phân tích khả năng gây độc tế bào in vitro

[00238] Các tế bào A431, A431-K5, và OVCAR3 được nuôi cấy phụ và gieo ở 5000 tế bào/giếng trong môi trường phát triển hoàn chỉnh trong các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng, và được ủ ở 37°C, CO₂ 5% qua đêm (16 giờ). Các chất phản ứng thử nghiệm được pha loãng lần lượt theo tỷ lệ 1:3 trong các đĩa pha loãng giếng sâu 2 mL, bắt đầu ở 200 nM (tổng cộng 10 lần pha loãng). Các mẫu được pha loãng (100 µL) được thêm vào các đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của các mẫu thử ở 100 nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, CO₂ 5% trong 5 ngày nữa. Môi trường sau đó được loại bỏ, và các đĩa được rửa một lần với 200 µL DPBS, nhuộm bằng 50 µL dung dịch tím kết tinh 0,2% ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó được rửa kỹ bằng nước máy. Các đĩa được làm khô trong không khí, và tím kết tinh được hòa tan với 200 µL dung dịch SDS 1%. Các đĩa được đọc ở 570 nm. Dữ liệu được phân tích sử dụng GraphPad Prism 6.

1.9 Các kết quả

1.9.1 Miễn dịch ở thỏ

[00239] Hai con thỏ đã được miễn dịch ADN với plasmit pB8-mesothelin ở người cho bốn ứng dụng di truyền. Huyết thanh miễn dịch được lấy ở ngày thứ 52 của quy trình miễn dịch, được pha loãng 1:1000 hoặc 1:5000 trong PBS chứa BSA 1%, và được thử nghiệm bằng phương pháp đo tế bào dòng sử dụng các tế bào biểu hiện mesothelin. Huyết thanh từ cả hai con thỏ được miễn dịch được gắn với các tế bào biểu hiện mesothelin, mà là các tế bào được chuyển nhiễm với pB1-mesothelin-hu (Hình 1, các đường cong thấp hơn). Ngược lại, huyết thanh của các thỏ được miễn dịch không gắn các tế bào được chuyển nhiễm với cADN không liên quan (Hình 1, các đường con cao hơn).

1.9.2 Sàng lọc thông lượng cao của các mẫu nuôi cấy tạo ra các kháng thể đa dòng ở thỏ đối với mesothelin ở người

[00240] Các tế bào nút lympho ở thỏ được thu hoạch và bảo quản lạnh. Các tế bào (2×10^7 tế bào) từ nút lympho được rửa đông được gieo ở 5 tế bào mỗi giếng trên đĩa 384 giếng với các tế bào cấp và được nuôi cấy trong IMDM hoàn chỉnh chứa 10,5 ng/mL IL-2 ở người và 10,5 ng/mL cytokin IL-21 ở người. Các giếng sản xuất kháng thể IgG ở thỏ được xác định hai tuần sau khi gieo thông qua IgG FRET sử dụng europium cryptat và 18715 mẫu nuôi cấy sản xuất IgG được sàng lọc bởi ELISA cho khả năng phản ứng mesothelin ở người. Tám mươi lăm mẫu nuôi cấy đặc hiệu với mesothelin được xác nhận lại về khả năng phản ứng với mesothelin và được sàng lọc để đối với khả năng phản ứng với CD73 ở người. Có 54 mẫu nuôi cấy được xác nhận tạo ra kháng thể Fc γ ở thỏ mà gắn với mesothelin trên 0,2 OD₄₅₀ mà không có phản ứng chéo với CD73 (Hình 2). Các kết quả ELISA sơ cấp được thể hiện bởi tập hợp các thanh ngoài cùng bên phải, các kết quả ELISA thứ cấp được thể hiện bởi tập hợp các thanh ngoài cùng bên trái, và việc gắn CD73 ở người được thể hiện bởi tập hợp các thanh ở giữa.

1.9.3 RT-PCR, giải trình tự, và nhân dòng các vùng biến đổi

[00241] ARN tổng số được phân lập từ 54 mẫu nuôi cấy đã được xác nhận tạo ra các kháng thể kháng mesothelin IgG ở thỏ, cADN được tổng hợp bằng RT-PCR, và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng được khuếch đại PCR. Năm mươi hai chuỗi ADN được phân tích sử dụng các họ thỏ gen V và gen J (IMGT/V-QUEST) và 51 trình tự được khuếch đại PCR với các đoạn mồi đặc hiệu cho việc nhân dòng dung hợp trong thành các vector biểu hiện vùng không đổi (Hình 3). Tổng cộng 48 kháng thể được nhân dòng vào các vector biểu hiện vùng không đổi ở người và sau đó được chuyển nhiễm vào các tế bào expi293F. Kháng thể được phát hiện ở 45 trong số 51 mẫu chuyển nhiễm (Hình 4), các vùng biến đổi ở thỏ được nhân dòng dung hợp trong vào các vector biểu hiện vùng không đổi ở người.

1.9.4 Sàng lọc ban đầu của các ADC đối với các tế bào biểu hiện mesothelin

[00242] Các kháng thể kháng mesothelin ở người (rb-hu-xi anti-MSLN) của thỏ thể khảm được tinh sạch theo phương pháp được mô tả trong Phần 1.5. Nồng độ protein của các kháng thể được tinh sạch được xác định (Hình 5). Để hoàn thành việc sàng lọc kháng thể kháng mesothelin để phát triển ADC, quá trình liên hợp vi mô của kháng thể kháng

mesothelin với Mal-PEG₂ Auristatin F được thực hiện, và các ADC được xác định đặc tính trong thử nghiệm hiệu lực dựa trên tế bào in-vitro sử dụng các dòng tế bào OVCAR3, A431-K5 và A431, trong đó OVCAR3 và A431-K5 biểu hiện mức cao của mesothelin và A431 (MSLN) được sử dụng làm dòng tế bào đối chứng để đánh giá tính đặc hiệu và khả năng tiêu diệt ngoài mục tiêu của các ADC (Hình 6).

1.9.5 Việc gắn epitop của các kháng thể kháng mesothelin

[00243] Epitop gắn với mesothelin của 48 kháng thể kháng mesothelin được xác định đặc tính sử dụng Octet như được chỉ ra trong Phần 1.7.1. Sáu epitop khác nhau được xác định cho các kháng thể, và 102A6 được quan sát thấy không có việc gắn ở định dạng hiện tại bởi Octet (Hình 7). Ái lực gắn kháng thể với mesothelin được đo bởi BIAcore, như được chỉ ra trong Phần 1.7.2. Các kết quả ái lực gắn được tóm tắt trong Bảng 15.

Bảng 15. Ái lực gắn kháng thể kháng mesothelin với mesothelin

Nhóm epitop	Đường cong	k_a (1/Ms)	k_d (1/giây)	K_D (M)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
	M09-3	1,95E+06	2,92E-04	1,50E-10	40,19	0,646
	55B4-1	1,67E+06	8,32E-03	4,98E-09	42,33	1,72
	55B4-2	1,04E+06	5,52E-03	5,33E-09	42,6	0,586
MORAb-009	62B10-1	2,10E+06	8,57E-03	4,08E-09	47,6	3,54
	62B10-2	9,91E+05	6,71E-03	6,77E-09	46,58	0,398
	131F9-1	8,36E+05	7,23E-03	8,65E-09	48,89	0,458
	131F9-2	8,71E+05	6,79E-03	7,79E-09	48,71	0,639
	145D4-1	8,05E+05	6,83E-03	8,48E-09	50,61	0,489
	145D4-2	8,69E+05	6,90E-03	7,95E-09	51,21	0,681
	342P20-1	1,74E+06	2,27E-04	1,30E-10	29,15	0,498
	342P20-2	2,32E+06	2,51E-04	1,08E-10	27,51	0,447
	Xi-33O11	1,99E+06	6,68E-04	3,35E-10	35,89	0,169
	43F8-1	7,10E+05	6,37E-03	8,97E-09	35,29	0,48
#1	43F8-2	7,77E+05	5,82E-03	7,48E-09	36,43	0,78
	201C15-1	2,74E+05	1,29E-04	4,70E-10	63,95	0,75
	201C15-2	2,64E+06	3,45E-04	1,31E-10	58,09	0,568
	X-237N18	1,27E+06	4,28E-03	3,38E-09	41,45	0,295

	Xi-393L14	1,10E+06	2,57E-04	2,33E-10	46,47	0,627
#3	Xi-383I18(AuF)	1,01E+06	2,81E-04	2,80E-10	43,9	0,494
	346C6-1	6,82E+05	4,81E-04	7,06E-10	44,85	0,218
	346C6-2	1,15E+06	6,09E-04	5,29E-10	45,06	0,503
	345A12-1	2,89E+06	4,12E-04	1,43E-10	39	0,793
#5	345A12-2	2,85E+06	3,89E-04	1,36E-10	38,63	0,833
	120N18-1	6,26E+05	5,26E-04	8,41E-10	50,28	0,323
	120N18-2	6,57E+05	5,13E-04	7,80E-10	50,89	0,395
	82M2-1	7,18E+05	4,35E-04	6,06E-10	47,12	0,493
#6	82M2-2	8,98E+05	4,74E-04	5,28E-10	48,64	0,961
M09/#2	264E24-1	4,01E+05	5,81E-05	1,45E-10	48,8	0,347
lai	264E24-2	4,10E+05	5,47E-05	1,34E-10	49,33	0,423
M09/#3	238B22-1	2,60E+05	3,03E-03	1,17E-08	153,1	6,95
lai	238B22-2	4,31E+05	6,03E-03	1,40E-08	57,04	0,318

[00244] Dựa vào các kết quả ở trên, mười lăm kháng thể mà bao phủ tất cả các nhóm epitop được lựa chọn để đo đặc tính và việc liên hợp theo quy mô, như được chỉ ra trong Bảng 16. 102A6A cũng được lựa chọn dựa trên hiệu lực in-vitro mong muốn khi được liên hợp với auristatin F.

Bảng 16. Mười lăm kháng thể kháng mesothelin được chọn lọc và các nhóm epitop của chúng

Nhóm epitop	Các kháng thể dẫn
-------------	-------------------

Nhóm #1	33O11, 210C15
Nhóm #2	111B10, 324O5, 178F16, 264E24
Nhóm #3	237N18, 383I18, 393L14, 346C6
Nhóm #4	62B10, 55B4, MORAb009
Nhóm #5	120N18, 345A12
Không gắn	102A6A

Ví dụ 2 Việc người hóa các ADC kháng mesothelin

[00245] Các kháng thể kháng mesothelin được người hóa được tạo ra theo các quy trình được mô tả dưới đây. Các kháng thể và các ADC được phân tích về hoạt tính gắn được giữ lại với mesothelin ở người và hiệu lực tiêu diệt tế bào đối với các tế bào biểu hiện mesothelin. Các kháng thể cũng được tìm hiểu đặc tính về mặt lý sinh để tải thuốc, kết tụ, ổn định nhiệt, và ổn định huyết thanh và chất nền. Các kháng thể và ADC được người hóa dẫn được đánh giá in vivo, như được mô tả trong Ví dụ 3.

1

2.1 Các chất phản ứng và các nguyên liệu

2.1.1 Các kháng thể

[00246] Các kháng thể được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây có cystein không được ghép đôi ở vị trí chuỗi nhẹ 80 (LCcys80) và bao gồm cả dạng thể khảm ở thỏ-người (-xi) và được người hóa (-zu) của các kháng thể kháng mesothelin ở người 33O11, 201C15, 111B10, 324O5, 178F16, 264E24, 237N18, 383I18, 393L14, 346C6, 62B10, 55B4, MORAb009, 120N18, 345A12, và 102A6A2. Các kháng thể được tinh sạch theo mẻ sử dụng nhựa protein A khả năng cao Prosep-vA và các cột khử muối Zeba. Môi trường điều hòa được tinh sạch và được khử cystein hóa như mô tả trong Phần 1.5 (Ví dụ 1). Hàm lượng protein cuối cùng được đánh giá thông qua thử nghiệm BCA và SDS-PAGE.

2.1.2 Khả năng gây độc tế bào có thể liên hợp và các ADC LCcys80

[00247] Các hợp chất cầu nối-tế bào độc tố được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây bao gồm maleimit-VCP-eribulin, maleimit-VCP-cryptophycin, và maleimit-VCP-eribulin dime. Các kháng thể được liên hợp được tinh sạch sử dụng phép sắc ký khử muối với các cột khử muối HiTrap (GE Healthcare) được cân bằng trong 1X DPBS. Hàm lượng protein cuối cùng được xác định bằng thử nghiệm BCA.

2.1.3 Các dòng tế bào khối u

[00248] Các dòng tế bào khối u ở người được sử dụng trong các phân tích ADC thể khả ở thỏ-người bao gồm A431 (các tế bào u ác tính ở người, MSLN^{neg}), A3 (A431 được chuyển nhiễm ổn định với mesothelin ở người, MSLN^{hi}) OVCAR3 (các tế bào ung thư biểu mô buồng trứng ở người, MSLN^{hi}), HEC-251 (nội mạc tử cung ở người, MSLN^{med}) và H226 (ung thư trung biểu mô tế bào vảy phổi ở người, MSLN^{lo}). Tất cả các dòng tế bào được sử dụng đều được lấy trực tiếp từ Bộ sưu tập môi trường nuôi cấy kiểu Mỹ (ATCC), ngoại trừ A3, mà được tạo ra tại Morphotek từ dòng tế bào gốc A431 và HEC-251, mà được lấy từ JCRB.

2.1.4 Các chất phản ứng khác

[00249] Tất cả các chất phẩm ứng được sử dụng đều được lấy từ các nhà cung cấp thương mại ở cấp độ nghiên cứu hoặc cao hơn, trừ khi có chỉ định khác.

2.2 Xác định đặc tính lý sinh của các ADC

2.2.1 Phân tích kết tụ SEC-HPLC

[00250] Phân tích SEC-HPLC được tiến hành sử dụng hệ thống Agilent 1200 HPLC. Cột bảo vệ AdvanceBio SEC 300A (2,7 μ m, 7,8 x 50 mm, số seri 0006344424-13, số lô 0006344424) được kết nối với cột phân tích AdvanceBio SEC 300A (2,7 μ m, 7,8 x 300 mm, số seri 0006336837-4, số lô 0006336837), được cân bằng trong natri phosphat 0,1 M, natri clorua 0,15 M, IPA 5%, độ pH 7,4, ở tốc độ dòng 0,5 mL/phút.

[00251] Việc kết tụ của các LCcys80 ADC được phân tích bằng phép sắc ký lỏng hiệu năng cao, loại trừ kích thước (SEC-HPLC) sử dụng Agilent 1200 HPLC. Các kháng thể và ADC được chuẩn bị ở 2 mg/mL trong 1X DPBS, 8 μ L (16 μ g) của mỗi mẫu được tiêm và chạy trong 36 phút. Tất cả dữ liệu được phân tích sử dụng phần mềm Agilent

ChemStation. Phần trăm kết tụ, phần trăm đơn phân và phần trăm phân mảnh được báo cáo.

2.2.2 Phân tích DAR phép sắc ký tương tác kỵ nước (HIC-HPLC)

[00252] DAR được phân tích sử dụng phép sắc ký tương tác kỵ nước (HIC-HPLC) trên hệ thống Agilent HPLC 1260. Các mẫu được tiêm lên cột TSKgel Ethyl-5PW (TOSOH Bioscience, 7,5 mm ID x 7,5 cm, 10 µm, kích thước không xốp), và được rửa giải từ cột với 3 phút cân bằng trong 100% pha động A, 15 phút gradien (0-100% B), 5 phút giữ ở 100% B, 1 phút thay đổi thành 100% A và 5 phút cân bằng lại trong 100% pha động A, ở 0,7 mL/phút. Pha động A là natri phosphat 25 mM, amoni sulfat 1,5 M, độ pH 7,0. Pha động B là natri phosphat 25 mM, isopropanol 25%, độ pH 7,0. Việc phát hiện được thực hiện ở 280 nm (tham chiếu 320 nm). DAR được xác định bởi công thức:

$$[AUC+1 + 2(AUC+2) + 3(AUC+3) + \dots n(AUC+n)]/\Sigma AUC_{tot}$$

trong đó AUC + 1 là diện tích dưới đường cong của đỉnh kháng thể tương ứng với ADC được liên hợp với một tế bào độc tố, và AUC + 2 là diện tích dưới đường cong đối với đỉnh kháng thể tương ứng với ADC được liên hợp với hai tế bào độc tố. ΣAUC_{tot} là diện tích được kết hợp dưới đường cong cho các đỉnh được liên hợp và không được liên hợp (DAR = 0, 1 và 2).

2.2.3 Phân tích DAR khối phổ/phép sắc ký lỏng (LC-MS)

[00253] DAR cũng được phân tích sử dụng phương pháp LC-MS với HPLC Waters Alliance với việc phát hiện SQD/PDA. Các mẫu được bơm lên cột Proteomix RP-1000 (5 µm, 1000 Å, 4,6 mm x 15 cm, Sepax) ở 65°C, và được rửa giải bởi 3 phút cân bằng ở 25% B, 27 phút gradien tuyến tính từ 25%-55% B, 5 phút giữ ở 55% B, 1 phút thay đổi thành 90% B, 5 phút giữ ở 90% B, 1 phút thay đổi trở lại 25% B và 5 phút cân bằng lại ở 25% B. Pha động A là TFA 0,1% trong nước và pha động B là TFA 0,1% trong axetonitril. Rửa giải sau đó được chia tỷ lệ 10:1 vào các bộ phát hiện PDA và SQD. Bộ dò SQD được thiết lập là ES dương, điện áp mao dẫn ở 3,5 KV, điện áp nón ở 50 V, bộ chiết ở 5 V và các thấu kính RF ở 0,3 V, nhiệt độ nguồn ở 150°C, nhiệt độ khử khô ở 350°C. Dữ liệu khối lượng được thu thập ở 200-2000 m/z trong 40 phút, chế độ liên tục và thời gian quét 1 giây. Dữ liệu được phân tích và giải mã ngoại tuyến sử dụng MassLynx và MaxEnt1. DAR được tính toán sử dụng công thức:

$$2[[AUCLC+1 + 2(AUCLC+2) + 3(AUCLC+3) + \dots + n (AUCLC+n)]/\Sigma ILC_{tot}] + 2[[AUCHC+1 + 2(AUCHC+2) + 3(AUCHC+3) + \dots + n (AUCHC+n)]/\Sigma AUCHC_{tot}]$$

trong đó $AUCLC + 1$ là diện tích dưới đường cong của đỉnh chuỗi nhẹ được liên hợp với một tế bào độc tố, $AUCLC + 2$ là diện tích dưới đường cong của đỉnh chuỗi nhẹ được liên hợp với hai tế bào độc tố, v.v.. $AUCHC$ là diện tích dưới đường cong của các chuỗi nặng tương ứng, và $\Sigma AUCLC_{tot}$ và $\Sigma AUCHC_{tot}$ lần lượt là diện tích được kết hợp dưới đường cong của tất cả các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng không được liên hợp và được liên hợp.

2.3 Đặc đính gắn

2.3.1 Việc tạo nhóm epitop kháng mesothelin sử dụng Octet

[00254] Epitop gắn kháng thể với mesothelin ban đầu được phân tích đặc tính sử dụng Octet, với đầu Streptavidin, sử dụng thử nghiệm gắn được tùy chỉnh. Việc gắn epitop của các kháng thể kháng mesothelin được chuẩn hóa với epitope được gắn bởi kháng thể kháng mesothelin đã biết, MORAb-009. Các kháng thể được phân nhóm dựa trên việc gắn của chúng với các epitop giống nhau, gần đó hoặc khác với MORAb-009. Các bước được lặp lại cho đến khi tất cả các kháng thể được căn chỉnh với việc tạo nhóm epitop khác. Ái lực gắn được xếp hạng là cao, trung bình và thấp dựa trên các kết quả octet. Tất cả các bước gắn được tiến hành trong bộ đệm PBST chứa BSA 0,2%.

2.3.2 Phân tích gắn cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore)

[00255] Ái lực gắn kháng thể kháng mesothelin với mesothelin được đo bởi BIAcore (BIAcore T-100, GE healthcare, #1426075), sử dụng chip CM5 sêri S. Các nồng độ kháng thể được điều chỉnh tới 1 $\mu\text{g/mL}$ và mesothelin (50 μg) tới 100 nM trong 1X HBS-P+ đệm (GE Healthcare). Chip bắt kháng thể kháng người được chuẩn bị theo quy trình của nhà sản xuất sử dụng chip CM5 với trình hướng dẫn cố định. Các mức kháng thể bắt cuối cùng là 8000-9000 RU, trong HBS-P+. Chip được chuẩn bị cho thử nghiệm với năm chu kỳ tiêm đệm 300 giây sau đó là tái sinh 30 giây, tất cả đều ở tốc độ 30 $\mu\text{L/phút}$ trên tất cả bốn tế bào dòng. Các kháng thể được bắt trên các tế bào dòng 2-4 bằng cách tiêm liên tiếp các dung dịch phối tử riêng lẻ trong 90 giây ở 10 $\mu\text{L/phút}$. Việc tiêm phân tích được thực hiện theo phương thức động học một vòng bằng cách tiêm liên tiếp các dung dịch chất phân tích từ nồng độ thấp đến nồng độ cao trong 240 giây mỗi lần với tốc độ 30 $\mu\text{L/phút}$. Sự phát hiện là 2-1, 3-1, 4-1. Tham chiếu kép được thực hiện

bởi chuỗi các lần tiêm bắt phối tử giống hệt nhau, sau đó là 5 lần tiêm chỉ đệm trong 240 giây mỗi lần, phân ly trong 1800 giây và tái sinh như trên. Tất cả các phối tử được phân tích để gắn với mesothelin trong bản sao. Phân tích động học được thực hiện sử dụng phần mềm BIAEvaluations sử dụng mô hình khớp Langmuir 1:1. Các hằng số tỷ lệ bật, tỷ lệ giảm và ái lực được tính trung bình từ các lần chạy bản sao.

2.4 Phân tích ổn định nhiệt nhiệt lượng quét vi sai (DSC)

[00256] Nhiệt lượng kế quét vi sai mao quản VP (VP-CapDSC; Microcal, VP-CapDSC, # 12-07-149 với đồ thị Origin-7 và Phần mềm MicroCal VP-Cap Mao DSC v.2.0) được sử dụng để giải mã và so sánh cấu trúc bậc cao hơn và sự ổn định định của các mảnh F (ab ') 2 khác nhau và các đối chứng. Các mẫu được chuẩn bị trên đĩa xét nghiệm 96 giếng (Nguồn cung cấp phân tích Microliter) sử dụng dung dịch Contrad 20% và được phân tích trong bộ lấy mẫu tự động ở 10°C.

2.5 Phân tích hội tụ đẳng điện mao dẫn (cIEF)

[00257] Các chất phản ứng lấy mẫu tự động được nạp đầy theo các quy trình cài đặt và khởi động CFR. Hemoglobin được sử dụng làm tiêu chuẩn ổn định hệ thống. Cài đặt mặc định cho phân tích dữ liệu mở được sử dụng. Khoảng thời gian hội tụ #1 được thực hiện trong 1 phút ở 1500 V cho cả các mẫu và các tiêu chuẩn phù hợp hệ thống. Khoảng thời gian hội tụ #2 được thực hiện trong 5 phút ở 3000 V đối với các tiêu chuẩn về tính phù hợp hệ thống và 11 phút ở 3000 V đối với các mẫu TIGC và các đối chứng bộ đệm phù hợp. Các mẫu TIGC trùng lặp được sử dụng khoảng thời gian hội tụ #2 ở 4,5 phút và tất cả các mẫu đều được đánh dấu với tiêu chuẩn phù hợp hệ thống. Các mẫu được tích hợp tự động sử dụng thông số chiều rộng đỉnh là 0,1 và ngưỡng là 5 và được tích hợp giữa pI 7,5 - 9,4.

2.6 Việc điều chế của các ADC DAR2 và DAR6 MORAb-109

[00258] Dòng tế bào CHOZN 345A12-HC15-LC4 CHOZN được nuôi cấy trong túi sòng (20 L) cho đến khi khả năng sống <30% và được cô đến 2 L sử dụng TFF. Kháng thể được bắt trên nhựa khí quyển A3 được hiệu chuẩn trước trong natri phosphat 20 mM, EDTA 10 mM, độ pH 7,2, được rửa trong cùng dung dịch đệm cho đến khi đạt được đường cơ sở ổn định (để loại bỏ vật liệu không được gắn), sau đó giảm trên cột trong 8 giờ sử dụng natri phosphat 20 mM, EDTA 10 mM, cystein 10 mM, độ pH 7,2 ở tốc độ dòng chảy thấp, sau đó được oxy hóa lại trên cột trong 60 giờ sử dụng Tris 20

mM, độ pH 7,5. Vật liệu được gắn được rửa giải trong glyxin 0,1 M, độ pH 3,0, sau đó được lọc trong 1X PBS, EDTA 2 mM, độ pH 7,4 và cô đến > 10 mg/mL. Khả năng phục hồi cuối cùng là 100%.

[00259] Đối với DAR2 MORAb-109, maleimit-VCP-eribulin được thêm (trong DMSO) với tỷ lệ mol 1:2,5 (mAb:phụ tải) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi liên hợp, vật liệu được pha loãng đến 2 mg/mL, được lọc vào 1X PBS, EDTA 2 mM để loại bỏ phụ tải cầu nối không được liên hợp và được cô đến 5 mg/mL. Vật liệu DAR2 được tinh sạch bằng sắc ký Ether-5PW HIC điều chế. Vật liệu cuối cùng được phân tích đặc tính bởi SEC-HPLC, RP-HPLC và HIC-HPLC.

[00260] Đối với DAR6 MORAb-109, kháng thể được tinh sạch/được khử cysteinyl hóa được pha loãng tới 7,5 mg/mL trong 1X PBS, EDTA 2 mM và được giảm thêm bằng cách thêm lượng tương đương của TCEP 250 μ M trong cùng dung dịch đệm trong 50 phút, sau đó tổng thể tích bằng của Propylen glycol 50% trong 1X DPBS/EDTA 1mM được bổ sung, sau đó cuối cùng là maleimit-VCP-eribulin ở tỷ lệ mol 1:8 (mAb:phụ tải), được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. ADC được tinh sạch bởi phép sắc ký G-25 để loại bỏ phụ tải không được liên hợp và được điều chế trong 1X PBS, EDTA 2 mM. Vật liệu cuối cùng được phân tích đặc tính bởi SEC-HPLC, RP-HPLC và HIC-HPLC.

2.7 Độ ổn định huyết thanh in vitro

[00261] Các ADC kháng mesothelin (maleimit-VCP-eribulin dưới dạng phụ tải) được điều chế ở 0,5 mg/mL trong PBS hoặc huyết thanh ở người. Các mẫu được ủ ở 37°C trong 0, 24, 48, 72, 96, hoặc 240 giờ, sau đó được chuyển sang -80°C để bảo quản. Tất cả các mẫu được rã đông đến nhiệt độ môi trường xung quanh, và độ pha loãng duy nhất 1:2000 để thử nghiệm. Các mẫu được kiểm tra tổng mAb, tổng ADC và hiệu lực trên cơ sở trong tế bào. Thử nghiệm tổng mAb được phát triển theo định dạng kẹp từng bước trên Gyrolab XP, được bắt với mesothelin được biotin hóa và được phát hiện với Alexa Fluor 647 kháng IgG1 Fc. Các khoảng có thể định lượng đối với tổng mAb và các thử nghiệm ADC nguyên vẹn lần lượt là 6,25-800 ng/mL và 6,25-800 ng/mL. Đường cong tiêu chuẩn và các QC được tạo ra với MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin).

2.8 Sự ổn định nền nhạy DAR in vitro của các ADC MORAb-109

[00262] MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin) DAR 2 được điều chế ở 0,1 mg/mL trong hoặc PBS hoặc huyết thanh ở người, khỉ, chuột hoặc chuột trong ba lần. Các mẫu được ủ ở 37°C trong 0, 24, 48, 72, 96 hoặc 240 giờ. Các mẫu lấy ra từ mỗi thời điểm được chuyển đến -80°C để bảo quản. Phân tích được thực hiện sử dụng thử nghiệm đo giao thoa lớp sinh học không chứa nhãn. Các mẫu nền được pha loãng tới 1:20 trong 1X PBS chứa Tween-20 0,05% và BSA 1% (đệm thử nghiệm). Các mẫu đối chứng của MORAb-109 DAR 0, DAR 1, DAR 2 và DAR 6 được pha loãng tới 0,1 mg/mL trong chất nền phù hợp. Các mẫu đối chứng âm tính là chỉ 5% chất nền. Mesothelin được biotin hóa ở 5 µg/mL trong dung dịch đệm thử nghiệm được bắt trên các đầu cảm biến sinh học SA streptavidin (300 giây; Pall-ForteBio), tiếp theo là việc bắt các mẫu ổn định được pha loãng và các đối chứng (300 giây). Tải trọng sau đó được định lượng bằng cách gắn kháng thể kháng eribulin 5E4 thể khảm ở thỏ-người ở 100 mg/mL. Việc kết hợp được giám sát trong 300 giây, tại thời điểm đó việc gắn đạt đến trạng thái cân bằng. Mức gắn ở cuối pha phân ly (R_{eq}) được xác định cho mỗi mẫu ở 295 giây của việc liên kết. Độ ổn định được xác định bằng cách vẽ biểu đồ phần trăm R_{eq} tương ứng với t_0 , trong đó:

phần trăm $R_{eq} = R_{eq}t_x / R_{eq}t_0$ [100] và $t_x = 0 - 240$ giờ.

2.9 Phân tích khả năng gây độc tế bào in vitro

[00263] Các tế bào A431, A3, OVCAR3, HEC-251 và H226 được nuôi cấy phụ và được gieo ở 5000 tế bào/giếng trong môi trường sinh trưởng hoàn chỉnh trong các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng, và được ủ ở 37°C, CO₂ 5% qua đêm (16 giờ). Các chất phản ứng thử nghiệm được pha loãng lần lượt theo tỷ lệ 1:3 trong các đĩa pha loãng giếng sâu 2 mL, bắt đầu ở 200 nM (tổng cộng 10 lần pha loãng). Các mẫu được pha loãng (100 µL) được thêm vào các đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của các mẫu thử ở 100 nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, CO₂ 5% trong 5 ngày nữa. Môi trường sau đó được loại bỏ, và các đĩa được rửa một lần với 200 µL DPBS, nhuộm bằng 50 µL dung dịch tím kết tinh 0,2% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và sau đó được rửa kỹ bằng nước máy. Các đĩa được làm khô trong không khí, và tím kết tinh được hòa tan với 200 µL dung dịch SDS 1%. Các đĩa được đọc ở 570 nm. Dữ liệu được phân tích sử dụng GraphPad Prism 6.

2.10 Các kết quả

2.10.1 Sàng lọc ban đầu của các ADC eribulin kháng mesothelin được người hóa

[00264] Mười lăm kháng thể kháng mesothelin đã được nhân bản phụ, được biểu hiện và được tinh sạch theo quy mô, và được liên hợp sử dụng maleimide-VCP-eribulin làm phụ tải ở vị trí Cys80. Tất cả các ADC được tinh sạch và được phân tích đặc tính sử dụng SEC-HPLC để phân tích kết tụ, HIC-HPLC để phân tích DAR và thử nghiệm dựa trên tế bào với các dòng tế bào A431-A3 (MSLN^{hi}), A431 (MSLN^{lo}) và OVCAR3 (MSLN^{hi}). Các tế bào được xử lý với ADC trong 6 giờ sau đó được rửa sạch, hoặc được xử lý trong 48 giờ (các tế bào A431-A3 và A431) hoặc 72 giờ (các tế bào OVCAR3) để so sánh hiệu lực. Dữ liệu đặc tính được tóm tắt trong Bảng 17. Dựa trên dữ liệu đặc điểm bên dưới, sáu kháng thể (in đậm) được lựa chọn cho việc người hóa.

Bảng 17. Đặc tính của mười lăm ADC eribulin kháng mesothelin

					SEC- HPLC	SEC- HPLC- 15% IPA	thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)					
Số	Tên mẫu	Kết luận (mg/mL)	Lot	DA R	% Mono me mAb	% Mono me ADC	A3- 6hr	A3- 48hr	A43 1- 6hr	A43 1- 48hr	OVCAR 3- 6giờ	OVCAR 3-72hr
1	33O11- VCP- Eribulin	0,46	0275 0- 83G	2,00	95,4	97,58	0,9 0	0,50	>100	>100	2,74	4,59
2	111B10 -VCP- Eribulin	0,98	0275 0- 83H	2,00	89,9	93,69	0,3 0	0,14	>100	>100	3,11	3,15
3	324O5- VCP- Eribulin	0,97	0275 0-83I	2,00	83,5	85,92	1,1 5	0,72	>100	>100	3,33	2,40
4	178F16 -VCP- Eribulin	0,99	0275 0-83J	2,00	81,4	84,54	0,6 5	0,38	>100	>100	1,36	0,08

5	237N1 8-VCP- Eribuli n	0,83	0275 0- 83K	2,00	92,8	95,84	0,5 1	0,24	>100	>100	14,65	4,41
6	383I18- VCP- Eribuli n	0,71	0275 0-84I	1,83	93,5	95,80	1,0 6	0,83	>100	>100	16,25	2,16
7	393L14 -VCP- Eribuli n				93,0	93,88	1,7 0	1,18	>100	>100	13,37	4,04
8	62B10- VCP- Eribuli n	0,48	0275 0-84J	2,00	98,7	46,84	0,6 4	0,33	>100	>100	11,70	1,84
9	55B4- VCP- Eribuli n	0,42	0275 0- 84K	2,00	98,4	73,44	0,5 5	0,27	>100	>100	32,17	1,33
10	120N1 8-VCP- Eribuli n	0,3	0275 0- 83G	2,00	97,4	61,42	1,6 7	0,98	>100	>100	2,16	0,20
11	201C1 5- VCP- n	0,61	0275 0- 83H	2,00	94,3	95,84	0,7 1	0,54	>100	>100	2,83	0,05

	Eribuli n											
1 2	346C6- VCP- Eribuli n	0,9	0275 0-83I	2,00	91,4	92,28	0,9 5	0,29	>100	>100	8,20	0,49
1 3	264E24 -VCP- Eribuli n	0,66	0275 0-83J	1,63	46,2?	73,67	1,0 4	0,74	>100	>100	1,71	0,14
1 4	345A1 2- VCP- Eribuli n	0,4	0275 0- 83K	2,00	95,7	98,53	0,9 5	0,80	>100	>100	0,66	0,09
1 5	102A6 A- VCP- Eribuli n	0,19	0275 0- 83D	2,00	98,1	67,87	0,3 8	0,21	>100	>100	1,92	0,12
1 6	102A6 B- VCP- Eribuli n	0,31	0275 0- 83L	2,00	97,9	19,02	0,8 4	0,53	>100	>100	1,85	0,14
1 7	1552- VCP-	0,63	0275 0- 83F	1,89	97,1	97,20	>10 0	58,7 8	>100	>100	>100	10,60

	Eribulin											
18	Eribulin	6mM					4,08	1,09	2,86	0,00	2,81	0,25

2.10.2 Việc người hóa HC1-LC1 và khả năng gây độc tế bào in vitro của các ADC

[00265] Các trình tự cho các vùng 102A6A2, 11B10, 201C15, 345A12 và 346C6 Fv ở thỏ được BLAST để có sự tương đồng gần nhất với các trình tự protein miền biến đổi dòng mầm ở người sử dụng các công cụ IGBLAST (Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI)) và IMGT/DomainGapAlign (Hệ thống thông tin ImMunoGeneTics quốc tế (IMGT®)). Các trình tự khung ở thỏ được thay thế bằng các trình tự dòng mầm ở người tương đồng gần nhất để tạo ra các biến thể được người hóa được ghép CDR (HC1 và LC1). Hai gốc cuối cùng của FWRH2 được xác định Kabat được giữ lại như các gốc ở thỏ. Phần dư FWRH3 được xác định Kabat cuối cùng được giữ lại cho 11B10. Môtip RESPECT-L Cys80 và Ala83 trong vùng Vk được giữ lại cho tất cả các dòng vô tính. Sau khi các kháng thể được người hóa được tạo ra, cả kháng thể khảm và kháng thể được người hóa được liên hợp với ba phụ tải khác nhau (maleimit-VCP-eribulin, maleimit-VCP-cryptophycin và maleimit-VCP-eribulin dime) thay đổi tính kỵ nước. Ái lực gắn với mesothelin được đo bởi BIAcore đối với tất cả các kháng thể, và các ADC được phân tích đặc tính đối với phần trăm (%) kết tụ, DAR và hiệu lực in-vitro, như được tóm tắt trong Bảng 18. Các phụ tải hiệu lực của các ADC kháng mesothelin được người hóa cũng được đo và được tóm tắt trong Bảng 19. Các ADC có các giá trị EC50 tiêu diệt tế bào nano mol thấp trong tất cả năm dòng tế bào được thử nghiệm.

Bảng 18. Tóm tắt đặc tính cho các ADC kháng mesothelin được người hóa và thể khảm dẫn

mAb gốc		ADC									
Nhóm	epitop	Ái lực		Phụ tải	HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)			
		k _a (10 ⁵ M ⁻¹ sec ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ sec ⁻¹)			K _D (10 ⁻⁹ M)	% kết tụ				% monome
33011	xi			Thuốc-cầu nối	DAR		%	A431	OVCAR3	HEC-251	H226 A3
				VCP-eribulin	1,92	8,97	91,03	40,67	0,008	3,950	>100
				VCP-cryptophycin	1,87	12,74	87,26	6,79	0,010	0,110	0,06
	zu			VCP-eribulin dime	1,17	32,70	67,30	1,40	0,030	0,33	0,93
				VCP-eribulin	1,69	1,42	98,58	~100	0,064	26,500	>100
				VCP-cryptophycin	1,33	0,90	99,10	22,50	0,066	5,35	5,81

mAb gốc			ADC												
Nhóm	epitop	Ái lực		Phụ tải	HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)							
		k _a (10 ⁵ M ⁻¹ sec ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ sec ⁻¹)			K _D (10 ⁻⁹ M)	Thuốc-cầu nối	DAR	% kết tụ	% monome	A431	OVCAR3	HEC-251	H226 A3	
					VCP-eribulin dime	1,63	1,08	98,92	2,01	0,025	0,31	0,22	0,04		
					VCP-eribulin	1,90	4,25	95,75	38,10	0,004	13,960	~100	0,05		
111B10	xi	6,5	3,9	6,3	VCP-cryptophycin	1,86	8,83	91,17	10,93	0,011	1,600	2,66	0,016		
					VCP-eribulin dime	1,85	9,25	90,75	0,96	0,007	0,06	0,71	0,011		
		5,1	3	6,5	VCP-eribulin	1,81	3,64	96,36	68,92	0,014	27,42	>100	0,12		
	zu														

mAb gốc			ADC												
Nhóm epitop	Ái lực			Phụ tải	HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)							
	k _a (10 ⁵ M ⁻¹ sec ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ sec ⁻¹)	K _D (10 ⁻⁹ M)			% kết tụ	% monome								
201C15	xi	1	2,4	0,26	1,1	Thuốc-cầu nối	DAR	% kết tụ	% monome	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3	
							VCP-cryptophycin	1,76	1,80	98,20	4,30	0,011	0,820	1,36	0,015
						VCP-eribulin dime	1,78	4,47	95,53	1,68	0,007	0,13	1,15	0,025	
						VCP-eribulin	1,85	1,62	98,38	48,50	0,004	14,82	~100	0,27	
						VCP-cryptophycin	1,75	2,10	97,90	8,08	0,012	0,540	1,02	0,12	
						VCP-eribulin dime	0,96	0,00	100,00	0,63	<0,003	0,10	0,64	0,065	

mAb gốc		ADC						
Nhóm	epitop	Ái lực		Phụ tải	HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)
		k_a (10^5 M^{-1} sec^{-1})	k_d (10^{-3} sec^{-1})			% % kết tụ	% monome	
zu		K _D (10^{-9} M)		Thuốc-cầu nối	DAR			HEC- 251 A3
				VCP-eribulin	1,80	5,84	94,16	OVCAR3 A431
				VCP- cryptophycin	1,74	11,51	88,49	20,42 H226
				VCP-eribulin dime	1,75	9,94	90,06	0,28 0,082
xi	346C6			VCP-eribulin	1,56	5,28	94,72	5,73 ~100
		3,8	0,49	VCP- cryptophycin	1,52	8,28	91,72	0,190 1,21 0,043

mAb gốc		ADC											
Nhóm epitop	Ái lực	Phụ tải		HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)						
		k _a (10 ⁵ M ⁻¹ sec ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ sec ⁻¹)	K _D (10 ⁻⁹ M)	Thuốc-cầu nối	DAR	% kết tụ	% monome	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
	zu												
					VCP-eribulin dime	1,60	10,43	89,57	1,32	0,026	0,09	0,99	0,035
					VCP-eribulin	1,63	4,48	95,52	72,86	1,180	32,54	>100	0,55
		133 93		8,9	VCP-cryptophycin	1,65	13,70	86,30	2,30	0,380	0,800	2,21	0,13
					VCP-eribulin dime	1,68	4,86	95,14	1,36	0,140	0,34	1,86	0,13
345A12	xi	5	26	0,42	0,12	VCP-eribulin	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

mAb gốc			ADC								
Nhóm epitop	Ái lực		Phụ tải	HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)				
	k_a (10^5 M^{-1} sec^{-1})	k_d (10^{-3} sec^{-1}) M									
		K_D (10^{-9} M)	Thuốc-cầu nối	DAR	% kết tụ	% monome	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
			VCP-cryptophycin	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
			VCP-eribulin dime	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
			VCP-eribulin	1,72	4,24	95,76	63,49	0,004	20,70	>100	0,091
	35	2,1	VCP-cryptophycin	1,60	6,17	93,83	3,03	<0,003	0,350	0,69	0,01
			VCP-eribulin dime	1,59	5,05	94,95	1,04	<0,003	0,06	0,79	0,016

mAb gốc			ADC							
Nhóm epitop	Ái lực		Phụ tải	HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)			
	k _a (10 ⁵ M ⁻¹ sec ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ sec ⁻¹)			K _D (10 ⁻⁹ M)	% kết tụ		% monome		
									Thuốc-cầu nối	DAR
102A6A2	xi	n.b.	n.b	VCP-eribulin	n/a	89,50	36,18	0,024	0,280	H226 A3
				VCP-cryptophycin	n/a	100,00	9,52	0,110	0,21	0,11
				VCP-eribulin dime	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	zu	n.b.	n.b	VCP-eribulin	1,87	3,60	57,44	0,046	8,67	3,02
				VCP-cryptophycin	1,87	3,64	3,54	0,021	0,054	0,0092

mAb gốc			ADC									
Nhóm	Ái lực			Phụ tải	HIC-Etyl	SEC-HPLC		Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào, EC50 (nM)				
	k _a (10 ⁵ M ⁻¹ sec ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ sec ⁻¹)	K _D (10 ⁻⁹ M)			% kết tụ	% monome					
				Thuốc-cầu nối	DAR		%	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
				VCP-eribulin dime	1,68	1,74	98,26	1,40	0,047	0,05	0,50	0,018
155D5	xi			VCP-eribulin dime	1,62	14,42	81,63	1,20	0,210	0,47	1,50	1,41
				Eribulin	n/a	n/a	n/a	0,47	0,11	0,2	5,3	1,03
				Cryptophycin	n/a	n/a	n/a	0,8	0,24	0,43	1,94	1,01
				VCP-DiOH Eribulin Dime	n/a	n/a	n/a	0,03	<0,003	0,003	0,32	0,08

Bảng 19. Hiệu lực dựa trên tế bào in-vitro của các phụ tải

	Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào dựa trên tế bào EC50 (nM)				
	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
Eribulin	0,47	0,11	0,2	5,3	1,03
Cryptophycin	0,8	0,24	0,43	1,94	1,01
VCP-DiOH Eribulin Dime	0,03	<0,003	0,003	0,32	0,08

2.10.3 Tinh chỉnh người hóa

[00266] Do mất việc gắn mesothelin đối với các dòng 201C15, 345A12 và 346C6, các đột biến tiếp theo được yêu cầu để duy trì việc gắn với mesothelin. Các trình tự Fv được ghép từ vỏ và CDR được sử dụng để tạo ra trong các mô hình silico của các miền biến đổi. Cấu trúc lý thuyết của các mô hình ở vỏ và được người hóa được xếp chồng lên nhau, và các gốc gần với các CDR được phân tích về ảnh hưởng cấu trúc tiềm năng lên cấu trúc tổng thể của các vòng CDR. Các gốc khác nhau giữa các trình tự được người hóa và ở vỏ được xác định. Hầu hết các gốc khác nhau không nằm ở giao diện dime hoặc ở xa các CDR. Một số gốc trong các vùng VH và VK được tìm ra là ở gần (trong vòng 5 Å) các CDR, và đã được phân tích thêm.

[00267] Hai vùng được người hóa trong vùng VH được xác định là có thể cản trở sự gắn kháng nguyên ở các dòng nhân bản 201C15, 345A12 và 346C6. Các đầu tận cùng N cho tất cả các dòng nhân bản là một axit amin trong HC1 dài hơn trong trình tự ở vỏ. Ngoài ra, mỗi loại có sự mất 2 axit amin trong FWRH3 (các gốc 72-73). Đối với mỗi dòng trong số các dòng này, năm axit amin đầu tiên và sáu axit amin xung quanh việc xóa FWRH3 (các gốc 71-76) của HC1 được quay trở lại các trình tự ở vỏ. Gốc 93 của 345A12 cũng được quay trở lại vỏ trong HC5. Đối với LC1, đầu tận cùng N của 201C15, 345A12 và 346C6 được quay trở lại trình tự ở vỏ. Một gốc trong FWRL3 của 201C5 (gốc 67) và 345A12 (gốc 70) được xác định là có tiềm năng tương tác với các CDR và một gốc trong FWRL2 của 346C6 (gốc 36) được xác định tương tự.

2.10.4 345A12 siêu người hóa

[00268] Với việc xác định các gốc ở thỏ bổ sung trong Vκ là yếu tố quan trọng cho việc gắn kháng nguyên, các đột biến tiếp theo của 345A12 được tạo ra để làm tăng số lượng các gốc ở người trên khắp các vùng VH và Vκ. Việc phân tích của mô hình in silico xác định các gốc 35, 48, 49, 57, 58, 61, 62, 63 và 64 trong VH và các gốc 1, 3, 24, 55, và 70 trong Vκ.

2.10.5 Việc xác định đặc tính lý sinh của các kháng thể 345A12 được siêu người hóa

[00269] Các kháng thể 345A12 siêu người hóa được tinh sạch từ 350 mL môi trường nuôi cấy tế bào quy mô lớn và được điều chế trong 1X DPBS. Các kháng thể được cô để đánh giá đặc tính vật lý-hóa học. Như được thể hiện trong Bảng 20, sự kết hợp của HC10-LC7 và HC15-LC7 được kết tủa trong bước cô, có thể do pI tương đối thấp hoặc độ hòa tan kém. Các kháng thể được tinh sạch được phân tích bởi BIAcore đối với ái lực gắn mesothelin, và dữ liệu được tóm tắt trong Bảng 21 dưới đây.

Bảng 20. Việc tóm tắt của các kháng thể 345A12 được người hóa được tinh sạch

mAbs	Dịch nổi Thể tích (mL)	Năng suất tinh sạch	mAb-VCP- DiOH Eribulin Dime, năng suất	mAb-VCP- Eribulin, Năng suất	Cô tới 5 mg/mL
345A12- HC10- LC4	350mL	77,5mg @ 5,1mg/mL	3,9mg @ 1,3mg/mL, 78%	11mg @ 5,0mg/mL, 73%	Có
345A12- HC10- LC7	350mL	78mg @ 5,2mg/mL	4,5mg @ 1,6mg/mL, 90%	8,1mg ở 2,7mg/mL, 54%	Không, kết tủa

345A12- HC15- LC4	350mL	191mg @ 8,3mg/mL	4,2mg @ 1,4mg/mL, 84%	11mg @4,85mg/mL, 73%	Có
345A12- HC15- LC7	350mL	87,2mg @ 4,0mg/mL	3,3mg @1,1mg/mL, 66%	4,6mg @ 1,54mg/mL, 31%	Không, kết tủa

Bảng 21. Ái lực gắn với mesothelin đối với 345A12 được người hóa

	Kết tụ	Liên hợp	Ái lực											
			Vòng 1			Vòng 2			Vòng 3			Vòng 4		
	%													
	Monome	% Liên hợp	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
Thể khảm			2,63E+0604	4,64E-10	1,76E-10									
HC1-LC2	88,85	1,6	2,59E+0604	4,32E-10	1,67E-10	2,47E+0604	3,04E-10	1,13E-10						
HC1-LC4	82,96	1,33				2,35E+0604	2,57E-10	1,18E-10	1,96E+0604	1,30E-10	6,61E-11	1,35E+0604	1,61E-10	1,19E-10
HC1-LC7	87,23	1,29							1,83E+0604	1,40E-10	7,66E-11	1,38E+0604	1,79E-10	1,29E-10
HC10-LC4	80,73	1,32							1,80E+0604	1,52E-10	8,47E-11	1,21E+0604	1,80E-10	1,49E-10

HC10- LC7	82,75	1,21																	1,26E+06	1,89E- 04	1,50E- 10
HC15- LC4	86,56	1,3																	1,44E+06	1,12E- 04	7,79E- 11
HC15- LC7	92,7	1,42																	1,49E+06	1,16E- 04	7,82E- 11

2.10.6 Các phân tích DSC và cIEF

[00270] Các đường cong nóng chảy nhiệt của các mảnh F(ab')₂ được phân tích bởi DSC. Các biên dạng của HC15-LC4 F(ab')₂ và HC10-LC4 F(ab')₂ được thể hiện trong Hình 8.

[00271] pI của các 345A12-HC10-LC4 và 345A12-HC15-LC4 mAb được phân tích bởi cIEF. pI thay đổi trong các đơn vị 0,06 pH giữa mỗi mAb, 8,19 cho 345A12-HC10-LC4 và 8,25 cho 345A12-HC15-LC4 (Bảng 22).

Bảng 22. Phân tích cIEF

Tên mẫu	pI	% Các đỉnh axit	% Đỉnh trung tính	% Các đỉnh bazơ
345A12-HC10-LC4	8,19	24,412	57,171	18,417
345A12-HC15-LC4	8,25	34,787	50,790	14,424

2.10.7 Độ ổn định huyết thanh

[00272] Đánh giá độ ổn định huyết thanh ở PBS/người của các ADC 345A12-HC10-LC4 và 345A12-HC15-LC4 được thử nghiệm trong tối đa 10 ngày, như được mô tả trong Phần 2.7. Dữ liệu được tóm tắt trong Bảng 23 dưới đây.

Bảng 23. Sự ổn định huyết thanh ở PBS/người in vitro của các ADC zu345A12-VCP-eribulin, HC15-LC4 so với HC10-LC4

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
1	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=0, trong huyết thanh ở người	1:2,000	231	2,14	462	N/A	258	1,42	516	N/A
2	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=24, trong huyết thanh ở người	1:2,000	221	4,59	442	-4,3	190	1,70	380	-26,4
3	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin	1:2,000	208	0,840	416	-10,0	154	3,19	308	-40,3

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
	T=48, trong huyết thanh ở người									
4	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=72, trong huyết thanh ở người	1:2,000	213	1,46	426	-7,8	142	1,66	284	-45,0
5	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=96, trong huyết thanh ở người	1:2,000	210	2,55	420	-9,1	105	21,5	210	-59,3

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
6	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=240, trong huyết thanh ở người	1:2,000	207	4,27	414	-10,4	97,0	6,31	194	-62,4
7	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=0, trong huyết thanh ở người	1:2,000	284	0,387	568	N/A	278	4,84	556	N/A
8	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin	1:2,000	282	4,19	564	-0,7	229	2,71	458	-17,6

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
	T=24, trong huyết thanh ở người									
9	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=48, trong huyết thanh ở người	1:2,000	273	0,103	546	-3,9	180	1,87	360	-35,3
10	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=72, trong huyết thanh ở người	1:2,000	258	0,744	516	-9,2	144	0,436	288	-48,2

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
11	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=96, trong huyết thanh ở người	1:2,000	270	0,669	540	-4,9	135	3,13	270	-51,4
12	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=240, trong huyết thanh ở người	1:2,000	270	1,48	540	-4,9	111	0,669	222	-60,1
13	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=0, trong PBS	1:2,000	180	1,03	360	N/A	229	1,40	458	N/A

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
14	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=24, trong PBS	1:2,000	184	0,583	368	2,2	187	2,07	374	-18,3
15	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=48, trong PBS	1:2,000	166	3,12	332	-7,8	177	1,64	354	-22,7
16	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=72, trong PBS	1:2,000	180	0,829	360	0,0	177	2,00	354	-22,7
17	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin	1:2,000	179	1,73	358	-0,6	174	3,87	348	-24,0

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
	T=96, trong PBS									
18	Zu345A12-HC10LC4-VCP-Eribulin T=240, trong PBS	1:2,000	171	0,915	342	-5,0	131	6,24	262	-42,8
19	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=0, trong PBS	1:2,000	225	1,14	450	N/A	233	0,325	466	N/A
20	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=24, trong PBS	1:2,000	226	1,45	452	0,4	209	3,53	418	-10,3

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
21	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=48, trong PBS	1:2,000	233	0,754	466	3,6	210	0,942	420	-9,9
22	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=72, trong PBS	1:2,000	210	4,03	420	-6,7	186	2,11	372	-20,2
23	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin T=96, trong PBS	1:2,000	247	10,4	494	9,8	182	0,0585	364	-21,9
24	Zu345A12-HC15LC4-VCP-Eribulin	1:2,000	226	0,514	452	0,4	145	6,91	290	-37,8

Mẫu #	Mô tả mẫu	Độ pha loãng	Tổng Ab				ADC nguyên vẹn			
			Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0	Kết luận trung bình (ng/mL)	%CV	Kết quả được điều chỉnh (µg/mL)	% Khác biệt với T=0
	T=240, trong PBS									

2.10.8 Sự ổn định nền của 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin trong các nền khác nhau sử dụng thử nghiệm Octet nhạy DAR

[00273] 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin (DAR2) được phân tích sự ổn định in vitro trong huyết thanh và huyết tương ở chuột, chuột nhắt, khỉ lông xám, và người. ADC được ủ trong chất nền ở 0,1 mg/mL trong 1 tuần, và các mốc thời gian được loại bỏ sau 1, 2, 3, 4 và 10 ngày. Phân tích được thực hiện sử dụng thử nghiệm dựa trên Octet (đo suy lượng bằng máy đo hai lớp) nhạy DAR như được mô tả trong Phần 2.3.1. Các kết quả được thể hiện trên Hình 9. 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin (DAR2) chứng minh khả năng giải phóng phụ tải phụ thuộc vào thời gian, với mức giải phóng trung bình 20% sau 10 ngày ủ ở 37°C.

2.10.9 Các môi trường nuôi cấy tạo ra các kháng thể đa dòng và IgG ở thỏ đối với mesothelin ở người

[00274] Vào tuần thứ 2, các giếng sản xuất kháng thể IgG ở thỏ được xác định bởi IgG FRET sử dụng europium cryptat. Các giếng sản xuất IgG được sàng lọc sự hiện diện của kháng thể IgG Fcγ ở thỏ bằng ELISA trên các đĩa được phủ với 1 µg/mL của mesothelin CHO-MT40. Các mẫu nuôi cấy tạo ra IgG ở thỏ đặc hiệu với mesothelin được xác nhận bằng việc sàng lọc ELISA trên 1 µg/mL của mesothelin và được sàng lọc đếm đối với 1 µg/mL của CD73-his. FRET và ELISA được thực hiện trên hệ thống robot Biomek® FX (Beckman).

Ví dụ 3 Các nghiên cứu in vivo

[00275] Các ADC bao gồm các kháng thể kháng mesothelin được người hóa dẫn và các thể liên hợp eribulin được đánh giá ở chuột sử dụng các mô hình mảnh ghép khác loại ung thư phổi và dạ dày ở người và mô hình mảnh ghép khác loại có nguồn gốc từ bệnh nhân u trung biểu mô (PDX) ở người theo quy trình được mô tả dưới đây. Hoạt động kháng ung thư và khả năng gây độc ngoài mục tiêu của các loài DAR khác nhau của các ADC được đánh giá.

3.1 Các chất phản ứng và các nguyên liệu

3.1.1 Các kháng thể

[00276] Các kháng thể được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây có cystein không được ghép đôi ở vị trí chuỗi nhẹ 80 (LCcys80) và bao gồm cả các dạng được người hóa (-zu) và thể khảm ở thỏ-người (-xi) của các kháng thể kháng mesothelin ở người xi345A12-HC1-LC2, xi102A6A2-HC1-LC2, zu345A12-HC1-LC2, zu345A12-HC10-LC4, và zu345A12-HC15-LC4.

3.1.2 Các tế bào gây độc có thể liên hợp và các ADC LCcys80

[00277] Các hợp chất cầu nối-tế bào độc tố được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây bao gồm maleimit-VCP-eribulin và maleimit-VCP-diOH eribulin dime.

3.1.3 Các dòng tế bào khối u

[00278] Dòng tế bào NSCLC ở người NCI-H2110, dòng tế bào ung thư dạ dày ở người NCI-N87 và dòng tế bào ung thư trung biểu mô ở người HAY đã được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây. Tất cả các dòng tế bào được sử dụng đều được lấy trực tiếp từ Bộ sưu tập môi trường nuôi cấy kiểu Mỹ (ATCC), ngoại trừ các tế bào HAY, mà được lấy từ NCI.

3.1.4 Các chất phản ứng khác

[00279] Tất cả các chất phản ứng được sử dụng đều được lấy từ các nhà cung cấp thương mại ở cấp độ nghiên cứu hoặc cao hơn, trừ khi có chỉ định khác.

3.2 Nghiên cứu hiệu quả và sàng lọc in vivo trong các mô hình mảnh ghép khác loại ung thư ở người

3.2.1 Các động vật nghiên cứu

[00280] Chuột cái IGS CD-1 (Charles River, 7-9 tuần tuổi) được sử dụng cho nghiên cứu liều dung nạp tối đa (MTD), chuột cái NOD.CB17-SCID (Phòng thí nghiệm Jackson) được sử dụng cho các nghiên cứu mảnh ghép khác loại NCI-H2110 và HAY, và chuột trụi lông NCr cái (Taconic, 5 tuần tuổi) được sử dụng cho các nghiên cứu mảnh ghép khác loại NCI-N87. Khi đến nơi, các con vật được làm quen trong 5-7 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn

tiệt trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được gắn thẻ tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

3.2.2 Nuôi cấy tế bào

[00281] Các tế bào NCI-H2110, NCI-N87, hoặc HAY được bảo quản lạnh từ trữ lượng đông lạnh được nuôi cấy trong môi trường chứa các chất bổ sung cần thiết. Các tế bào được nuôi cấy phụ trong môi trường hoàn chỉnh trong 2 con đường trước khi được sử dụng để cấy in vivo.

3.2.3 Cấy ghép khối u, quy trình ghi danh, và việc điều trị

[00282] Các tế bào được tạo huyền phù trong PBS được trộn lẫn với Matrigel đá lạnh theo tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) đến nồng độ cuối cùng là $1,0 \times 10^8$ tế bào/mL hoặc $5,0 \times 10^7$ tế bào/mL đối với các tế bào NCI-H2110 và HAY. Chuột được tiêm dưới da 100 μ L/chuột hỗn hợp tế bào và được giám sát về khối lượng cơ thể và sự phát triển của khối u. Các phép đo được thực hiện bằng thước cặp kỹ thuật số 3 lần hàng tuần bắt đầu từ ngày thứ 3 sau khi cấy.

3.2.4 Việc đo và việc điều trị khối u

[00283] Thể tích khối u đã được tính toán sử dụng công thức: $W \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Chuột được chọn ngẫu nhiên thành 5 con mỗi nhóm sau khi khối u được cấy ghép đạt thể tích trung bình là 100 mm³. Việc điều trị được tiêm tĩnh mạch với thể tích 200 μ L. Khối lượng cơ thể ở giai đoạn cuối được đo và ghi lại vào cuối mỗi nghiên cứu.

3.2.5 Phân tích thống kê

[00284] Các thể tích khối u của các con vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng ANOVA hai chiều đo lặp lại, sau đó là bài kiểm tra sau Bonferroni. So sánh sự phát triển khối u trong mỗi nhóm thử nghiệm cũng được thực hiện sử dụng cùng phân tích thống kê.

3.3 Các nguyên cứu hiệu quả in vivo trong mô hình PDX u trung biểu mô ở người

3.3.1 Các động vật nghiên cứu

[00285] Chuột cái NMRI nu/nu (Janvier Labs, 5-6 tuần) đã được thích nghi ít nhất 4 ngày khi đến nơi trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được đánh dấu tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

3.3.2 Cấy ghép khác loại

[00286] Vào ngày 0 của nghiên cứu, các khối u Meso 7212 được loại bỏ khỏi 5 con chuột hiến tặng trong các điều kiện vô trùng. Mô khối u của đối tượng hiến tặng được cắt thành các mảnh 2 x 2 mm và được đặt trong đĩa Petri vô trùng được phủ nước muối 0,9%. Song song đó, các động vật thụ thể được điều trị tiêm dưới da bằng Metacam® giảm đau (2 mg/kg) và sau đó được gây mê bằng liều tiêm tĩnh mạch duy nhất (0,15 mL/chuột) với Etomidat-Lipuro® (12 mg/kg). Vết rạch dọc nông trên da 5-8 mm ở sườn trái được thực hiện. Đầu của kéo phẫu thuật được đưa vào vết rạch, trực tiếp qua sườn, và được sử dụng để tạo thành túi trong khoảng dưới da. Một mảnh khối u trên mỗi chuột được cấy vào túi sử dụng nhíp phẫu thuật. Vết rạch được đóng lại bằng kẹp kim loại và con vật được đưa trở lại lồng sạch.

3.3.3 Quy trình thí nghiệm

[00287] Trong quá trình phát triển khối u, các đường kính khối u được đo sử dụng thước cặp kỹ thuật số (Mitutoyo). Các con vật được phân chia ngẫu nhiên vào các nhóm thí nghiệm theo thể tích khối u của chúng (tiêu chí đưa vào đối với thể tích khối u, 0,1 - 0,3 cm³). Các thể tích khối u và các khối lượng cơ thể được ghi lại hai lần mỗi tuần.

3.3.4 Việc điều trị

[00288] Eribulin được tiêm tĩnh mạch với liều 0,2, 0,3 và 3,2 mg/kg vào ngày ngẫu nhiên. MORAb-109 (DAR 0, 2, và 6) được tiêm tĩnh mạch với liều 10,0 mg/kg vào ngày ngẫu nhiên hoặc liều 2,5 mg/kg trong bốn ngày liên tiếp. Thể tích dùng là 10 mL/kg cho việc tiêm tĩnh mạch cho tất cả các nhóm thí nghiệm.

3.3.5 Các phân tích thống kê

[00289] Các thống kê mô tả được thực hiện trên dữ liệu về thể tích khối u và khối lượng cơ thể. Các thể tích khối u của động vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều đo lặp lại, sau đó là bài kiểm tra

sau Bonferroni. Ngoài ra, việc so sánh sự phát triển khối u của động vật trong mỗi nhóm cũng được thực hiện với cùng phân tích thống kê.

3.4 Các kết quả - Các nghiên cứu hiệu quả và sàng lọc in vivo

3.4.1 Nghiên cứu M109-004-2016: Việc sàng lọc in vivo của các ADC dime eribulin 345A12-HC1-LC2 và 102A6A2 HC1-LC2 trong mô hình mảnh ghép khác loại NSCLC ở người

[00290] Sàng lọc in vivo so sánh hai dòng kháng thể kháng mesothelin (345A12-HC1-LC2 và 102A6A2-HC1-LC2) được thực hiện trên mô hình mảnh ghép khác loại NCI-H2110 ung thư phổi không phải tế bào nhỏ ở người (NSCLC) NCI-H2110. Chuột được điều trị với 345A12-HC1-LC2-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg hoặc 102A6A2-HC1-LC2-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg. Hoạt động kháng khối u và các thay đổi khối lượng cơ thể cho cả hai ADC được thể hiện trên Hình 10A và Hình 10B, một cách tương ứng.

3.4.2 Nghiên cứu M109-006-2017: Đánh giá sơ bộ về liều dung nạp tối đa (MTD) của các 345A12-HC1-LC2 và 345A12-HC15-LC4 eribulin dime ADC ở chuột CD-1

[00291] Các thay đổi khối lượng cơ thể của chuột cái CD-1 được đo sau khi dùng 5, 10, 15, hoặc 20 mg/kg 345A12-HC1-LC2-diOH eribulin dime ADC, hoặc 5, 10, hoặc 20 mg/kg 345A12-HC15-LC4-diOH eribulin dime ADC. Các thay đổi khối lượng cơ thể cho mỗi ADC được thể hiện trên Hình 11A và Hình 11B, một cách tương ứng.

3.4.3 Nghiên cứu M109-007-2017: Việc sàng lọc in vivo của các 345A12-HC10-LC4 và 345A12-HC15-LC4 eribulin dime ADC trong mô hình mảnh ghép khác loại NSCLC ở người

[00292] Sàng lọc in vivo so sánh hai dòng kháng thể kháng mesothelin bổ sung (345A12-HC10-LC4 và 345A12-HC15-LC4) được thực hiện trên mô hình mảnh ghép khác loại NSCLC NCI-H2110 ở người. Chuột được điều trị với 345A12-HC10-LC4-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg hoặc 345A12-HC15-LC4-diOH eribulin dime ADC ở 2,5 mg/kg. Hoạt động kháng khối u và các thay đổi khối lượng cơ thể cho cả hai ADC được thể hiện trên Hình 12A và Hình 12B, một cách tương ứng.

[00293] Dòng 345A12-HC15-LC4 được lựa chọn dựa trên hoạt động kháng khối u và biên dạng khả năng gây độc của nó dưới dạng dòng ứng viên cho kháng thể được sử dụng trong MORAb-109 ADC.

3.4.4 Nghiên cứu M109-010-2018: Hiệu quả kháng khối u của các loài DAR2 và DAR6 của 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin ADC (MORAb-109) trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày ở người

[00294] Hai loài DAR (DAR2 và DAR6) của 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin ADC (MORAb-109) được so sánh trong mô hình mảnh ghép khác loại NCI-N87 ung thư dạ dày ở người với liều 10 mg/kg. Cả hai loài DAR2 và DAR6 ADC chứng minh các đáp ứng kháng khối u bền và tương tự (Hình 13A), với khối lượng giảm ít hoặc không giảm được quan sát thấy sau khi dùng một trong hai loài DAR (Hình 13B).

3.4.5 Nghiên cứu M109-010-2018: Hiệu quả kháng khối u của các loài DAR2 và DAR6 của 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin ADC (MORAb-109) trong mô hình mảnh ghép khác loại u trung biểu mô ở người

[00295] Hai loài DAR (DAR2 và DAR6) của 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin ADC (MORAb-109) được so sánh trong mô hình mảnh ghép khác loại u trung biểu mô HAY ở người. Cả hai loài DAR2 và DAR6 ADC chứng minh các đáp ứng kháng khối u bền và tương tự nhau ở chuột được điều trị với một liều duy nhất (5 mg/kg) của MORAb-109, trong khi eribulin một mình (được dùng ở MTD (3,2 mg/kg) hoặc ở lượng mol tương đương của eribulin như được tìm thấy trong MORAb-109 (0,1 mg/kg)) cho thấy các tác dụng kháng khối u hạn chế (Hình 14A). Khối lượng cơ thể giảm cấp tính và tạm thời được quan sát thấy ở những con chuột được điều trị với liều MTD của eribulin, trong khi không có sự giảm khối lượng cơ thể nào được quan sát thấy ở những con chuột được điều trị bằng ADC (Hình 14B).

3.4.6 Hiệu quả kháng khối u của MORAb-109 (DAR6) trong mô hình u trung biểu mô PDX ở người

[00296] Hiệu quả kháng khối u của 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin ADC (MORAb-109) (DAR6) được nghiên cứu trong mô hình u trung biểu mô PDX ở người, Meso7212 (MV15369). Hai phác đồ điều trị khác nhau được thử nghiệm: một lần dùng duy nhất 10 mg/kg MORAb-109 hoặc bốn lần dùng hàng ngày liên tiếp 2,5 mg/kg. Cả hai phác đồ điều trị MORAb-109 cho thấy các đáp ứng chống khối u bền và tương đương

nhau, trong khi lượng mol tương đương của eribulin đơn lẻ (0,2 mg/kg) cho thấy tác dụng chống khối u hạn chế. (Hình 15A). Cả hai phương pháp điều trị MORAb-109 ADC đều cho thấy hoạt tính kháng khối u tăng lên đáng kể so với liều MTD của eribulin đơn lẻ ($P < 0,05$). Các thay đổi khối lượng cơ thể cho tất cả các việc điều trị được thể hiện trên Hình 15B.

3.4.7 Hiệu quả kháng khối u của MORAb-109 (DAR2 và DAR6) trong mô hình u trung biểu mô PDX ở người

[00297] Hiệu quả kháng khối u của hai loài DAR (DAR2 và DAR6) của 345A12-HC15-LC4-VCP-eribulin ADC (MORAb-109) được nghiên cứu trong mô hình u trung biểu mô PDX ở người, Meso7212 (MV16071), ở liều dùng duy nhất là 10 mg/kg. Cả hai loài DAR2 và DAR6 của MORAb-109 thể hiện các đáp ứng kháng khối u bền và có thể so sánh, trong khi lượng mol tương đương của eribulin đơn lẻ (0,3 mg/kg) và loài MORAb-109 không được liên hợp eribulin (DAR0) cho thấy không có tác dụng kháng khối u hoặc tác dụng hạn chế (Hình 16A). Không có việc giảm khối lượng cơ thể nào được quan sát thấy ở nhóm bất kỳ (Hình 16B). Không có sự khác biệt thống kê về tác dụng kháng khối u giữa các loài DAR2 và DAR6 của MORAb-109.

Ví dụ 4 Việc biểu hiện mesothelin (MSLN) và hiệu lực in vitro

4.1 Các phương pháp

[00298] Khả năng gây độc tế bào: Tế bào được nuôi cấy phụ và được gieo ở 5000 tế bào/giếng trong môi trường sinh trưởng hoàn chỉnh trong các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng, và được ủ ở 37°C, CO₂ 5% qua đêm (16 giờ). Các chất phản ứng thử nghiệm được pha loãng lần lượt theo tỷ lệ 1:3 trong các đĩa pha loãng giếng sâu 2 mL, bắt đầu ở 200 nM (tổng cộng 10 lần pha loãng). Các mẫu được pha loãng (100 µL) được thêm vào các đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của các mẫu thử ở 100 nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, CO₂ 5% trong 5 ngày nữa. Môi trường sau đó được loại bỏ, và các đĩa được rửa một lần với 200 µL DPBS, nhuộm bằng 50 µL dung dịch tím kết tinh 0,2% ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó được rửa kỹ bằng nước máy. Các đĩa được làm khô trong không khí, và tím kết tinh được hòa tan với 200 µL dung dịch SDS 1%. Các đĩa được đọc ở 570 nm. Dữ liệu được phân tích cho việc xác định IC₅₀ sử dụng GraphPad Prism 6. Phân tích tương quan được thực hiện trong GraphPad Prism sử dụng phân tích Spearman không phải thông số.

4.2 Các kết quả

[00299] Mỗi tương quan giữa hiệu lực của MORAb-109 (DAR6) và biểu hiện mesothelin đã được quan sát thấy ở tất cả các dòng tế bào (Hình 17; các Bảng 24 và 25).

[00300] Đối với MORAb-109 (DAR2), khi các dòng tế bào có biểu hiện mesothelin thấp hơn (nhuộm FACS cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) <80) bị loại khỏi phân tích, mỗi tương quan đáng kể giữa hiệu lực và việc biểu hiện mesothelin được quan sát thấy (Hình 17; các Bảng 24 và 25). Hiệu lực của MORAb-109 (DAR2) tương quan với việc biểu hiện mesothelin ở các mức biểu hiện mesothelin cao hơn.

Bảng 24. Việc biểu hiện mesothelin và việc phân tích tương quan hiệu lực (DAR2 và DAR6)

	MSLN (MFI) so với Eribulin	MSLN (MFI) so với MORAb109	MSLN (MFI) so với MORAb109(DAR6)	MSLN (MFI) so với MORAb109_ MSLN cao
Spearman r				
r	-0,1113	-0,2906	-0,6773	-0,6267
Khoảng tin cậy 95%	-0,3935 đến 0,1902	-0,5472 đến 0,01591	-0,8093 đến -0,4803	-0,8502 đến -0,2118
Giá trị P				
P (2 đuôi)	0,4566	0,0557	<0,0001	0,0054
Tóm tắt giá trị P	ns	ns	****	**

Giá trị P chính xác hoặc xấp xỉ?	Xấp xỉ	Xấp xỉ	Xấp xỉ	Xấp xỉ
Mức đáng kể (alpha = 0,05)	Không	Không	Có	Có
Số lượng các cặp XY	47	44	48	18

Bảng 25. Các dòng tế bào được sử dụng trong việc biểu hiện mesothelin và việc phân tích tương quan hiệu lực

Các dòng tế bào	MSLN (MFI)	Hiệu lực in-vitro, IC50, nM		
		Eribulin	MORAb10 9(DAR2)	MORAb109 (DAR6)
EGI-1	14,8	1,48	187,8	15,45
TFK1	132,81	1,27		5,65
SNU-245	23,9	78,24	355,8	
SNU-478	53,8	1,58	227,5	55,16
SNU-1196	40,2	1,14	128,4	6,49
T-47D	4,4	0,68	95,86	22,04
JIMT-1	36,4	0,39	61,8	11,4
HCC1806	189,3	0,37	35,54	0,24
HEC-1-A	16,5	0,68	140,7	23,7

HEC-1-B	16,9	0,54	66,29	1,6
HEC-251	53,3	0,5	67,15	0,67
MFE-280	45,1	3,24	196,5	164,9
NCI-H292	108,6	0,58	147,3	6,37
NCI-H322	83,9	0,46	62,84	3,62
NCI-H1355	11,5	0,67	79,77	7,09
NCI-H1355-được phân loại	32,7	0,7	96,92	6,48
NCI-H1573	17,4		60,41	6,46
NCI- H1568/MSLN	4474	0,44	1,69	1,08
NCI-H1650	31,5	0,61	92,2	4,09
NCI- H1650/MSLN	1865,5	0,84	1	0,57
NCI-H2110	112,2	0,32	52,23	4,17
NCI-H2126	73,6	0,53	87,89	10,82
PC9	11,24	0,56	85,14	15,22
H226	725,3	0,66	7,46	0,13
NCI-H23	4,42	0,6	66,74	17,31
Lu65	13,13	0,56		15,85
NCI-H460	8,56	35,29		

MOR/CPR	120,79	3,69		5,68
A549	14,2	2,72	276	41,33
CNE2	147,7	0,49	69,55	1,64
HK1	39,2	0,89	197,5	5,88
HNE-1	110,8	0,87	239,2	2,03
HNE-1-T1	79,3	1,03	347	11,28
HONE1	108,6	0,89	197,5	5,88
SUNE1	212,4	0,56	77,8	0,27
CaOV-3	137,6	0,44	20,93	0,51
COV362	113,5	2,78	193	45,29
HAC-2	172,3	26,65	228	320
Kuramochi	211,2	0,89	897,8	0,1
OVCAR3 A1	220	0,15	0,005	0,005
AsPC1	33,47	1,62		3,13
BxPC3	15,59	0,66	86,2	5,88
Capan-2	36	1,21	138	1,99
A431	5,6	0,55	71,51	14,17
A431-K5	1430,3	1,5	0,45	0,35
NCI-N87	125,8	0,11	14,7	0,1
MKN1	22,06	0,96	20,14	2,89

MKN74	7,73	0,78	66,96	9,62
SNU216	94,91	1,78	73,42	0,29
MKN45	57,94	3,65	100	10,39
MKN7	18,48	0,58	86,53	10,39

Ví dụ 5 Đáp ứng liệu của MORAb-109 trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày (NCI-N87) ở người

5.1 Các phương pháp

5.1.1 Hiệu quả in vivo

[00301] Đông vật: Chuột trụi lông NCr cái (Taconic), 5 tuần tuổi tại thời điểm mới đến được làm quen trong 5-7 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được gắn thẻ tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

[00302] Nuôi cấy tế bào: Các tế bào NCI-N87 được bảo quản lạnh được rã đông và nuôi trong môi trường chứa các chất bổ sung cần thiết. Các tế bào được nuôi cấy phụ trong môi trường hoàn chỉnh trong 2 con đường trước khi được sử dụng để cấy in vivo.

[00303] Cấy ghép khối u, quy trình ghi danh, và việc điều trị: Huyền phù tế bào trong PBS được trộn với Matrigel đá lạnh ở tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) đến nồng độ cuối cùng là $1,0 \times 10^8$ tế bào/mL. 100 μ L/chuột của hỗn hợp được tiêm dưới da. Chuột được giám sát sức khỏe lâm sàng bằng các phép đo khối lượng cơ thể và khối u bằng thước cặp kỹ thuật số, 3 lần mỗi tuần, bắt đầu vào ngày thứ 3 sau khi cấy ghép.

[00304] Việc đo và việc điều trị khối u: Thể tích khối u (TV) (mm^3) được tính toán sử dụng công thức: $W (\text{mm}) \times L (\text{mm}) \times D (\text{mm}) \times \pi/6$. Khi các khối u đạt trung bình khoảng 100 mm^3 , các con vật được chọn ngẫu nhiên thành 5 con mỗi nhóm. Việc điều trị được đưa vào tĩnh mạch với thể tích 200 μ L của vật phẩm thử nghiệm. Vào cuối nghiên cứu, khối lượng cơ thể cuối cùng được đo và được ghi lại.

[00305] Phân tích thống kê: Các thống kê mô tả được thực hiện trên dữ liệu của thể tích khối u và khối lượng cơ thể. Các thể tích khối u của động vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều đo lặp lại sau đó là bài kiểm tra sau Bonferroni. Ngoài ra, việc so sánh sự phát triển khối u của động vật trong mỗi nhóm được thực hiện với cùng phân tích thống kê.

5.1.2 Dược động lực học (PK)

[00306] Phân tích PK được thực hiện sử dụng cả thử nghiệm ADC nguyên vẹn và thử nghiệm tổng số kháng thể. Tổng số kháng thể dùng để chỉ tổng số của tất cả các loài, bao gồm cả loài liên hợp và không liên hợp (nghĩa là, $\text{DAR0} + \text{DAR1} + \text{DAR2} + \dots +$

DARn), trong khi ADC nguyên vẹn dùng để chỉ tất cả các loài liên hợp (nghĩa là, DAR1 + DAR2 + ... + DARn). Thử nghiệm tổng số kháng thể sử dụng mesothelin được biotin hóa để bắt. Thử nghiệm ADC nguyên vẹn sử dụng đoạn Fab kháng eribulin 5E4 được biotin hóa để bắt và Fc kháng người được đánh dấu AlexaFluor647 để phát hiện. Phân tích mẫu được thực hiện trên máy phân tích Gyros. Phân tích dữ liệu được thực hiện trong WatsonLIMS 7.4.1 và được vẽ trong Microsoft Excel.

5.2 Các kết quả

[00307] Hiệu quả phụ thuộc vào liều đã được quan sát đối với các khoảng liều của MORAb-109 (DAR2) từ 5 mg/kg đến 25 mg/kg (Hình 18A và 18B). Không có việc giảm khối lượng cơ thể nào được quan sát thấy ở nhóm liều bất kỳ (Hình 18C). Sự tiếp xúc phụ thuộc vào liều lượng của ADC được quan sát thấy ở động vật được điều trị, như được chỉ ra bởi sự gia tăng AUC phụ thuộc vào liều (Hình 19 và Bảng 26).

Bảng 26. PK của MORAb-109 (chuẩn độ liều lượng) ở chuột mang khối u NCI-N87

Liều (mg/kg)	ADC nguyên vẹn hoặc tổng Ab	T _{1/2} (giờ)	V _{dss} (mL/kg)	CL (mL/kg/giờ)	AUC (µg*giờ/kg)	C _{max} (µg/mL)
5	nguyên vẹn	125,1	78,7	0.509	9512	62,9
	tổng	173,9	75,1	0.316	14375	73,2
10	nguyên vẹn	148,2	99,5	0.475	19559	105
	tổng	231,6	89,6	0.259	31631	123
15	nguyên vẹn	142,1	81,1	0.414	34557	169
	tổng	209,2	68,8	0.236	56134	205

20	nguyên vẹn	151,5	90,9	0.429	43852	214
	tổng	218,6	70,6	0.230	75718	270
25	nguyên vẹn	143,5	91,1	0.463	51253	271
	tổng	226,1	78,2	0.240	88099	322

Ví dụ 6 Hiệu quả kháng khối u in vivo của MORAb-109 trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư buồng trứng (OVCAR-3-A1-T1) ở người

6.1 Các phương pháp

[00308] Động vật: Chuột NOD.CB17-SCID cái (Jackson Laboratory), 5 tuần tuổi tại thời điểm mới đến được làm quen trong 5-7 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được gắn thẻ tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

[00309] Nuôi cấy tế bào: Các tế bào OVCAR-3-A1-T1 được bảo quản lạnh được rã đông và nuôi trong môi trường chứa các chất bổ sung cần thiết. Các tế bào được nuôi cấy phụ trong môi trường hoàn chỉnh trong 2 con đường trước khi được sử dụng để cấy in vivo.

[00310] Cấy ghép khối u, quy trình ghi danh, và việc điều trị: Huyền phù tế bào trong PBS được trộn với Matrigel đá lạnh ở tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) đến nồng độ cuối cùng là $5,0 \times 10^7$ tế bào/mL. 100 μ L/chuột của hỗn hợp được tiêm dưới da. Chuột được giám sát sức khỏe lâm sàng bằng các phép đo khối lượng cơ thể và khối u bằng thước cặp kỹ thuật số, 3 lần mỗi tuần, bắt đầu vào ngày thứ 3 sau khi cấy ghép.

[00311] Việc đo và việc điều trị khối u: Thể tích khối u (TV) (mm^3) được tính toán sử dụng công thức: $W (\text{mm}) \times L (\text{mm}) \times D (\text{mm}) \times \pi/6$. Khi các khối u đạt trung bình khoảng 100 mm^3 , các con vật được chọn ngẫu nhiên thành 5 con mỗi nhóm. Việc điều trị được đưa vào tĩnh mạch với thể tích 200 μ L của vật phẩm thử nghiệm. Vào cuối nghiên cứu, khối lượng cơ thể cuối cùng được đo và được ghi lại.

[00312] Phân tích thống kê: Các thống kê mô tả được thực hiện trên dữ liệu của thể tích khối u và khối lượng cơ thể. Các thể tích khối u của động vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều đo lặp lại sau đó là bài kiểm tra sau Bonferroni. Ngoài ra, việc so sánh sự phát triển khối u của động vật trong mỗi nhóm được thực hiện với cùng phân tích thống kê.

6.2 Các kết quả

[00313] MORAb-109 (DAR2) chứng minh sự chậm phát triển của khối u trong mô hình mảnh ghép khác loại OVCAR-3-A1-T1 ung thư buồng trứng ở người (Hình 20A và Hình 20B).

Ví dụ 7 Hiệu quả kháng khối u in vivo của MORAb-109 trong mô hình NSCLC PDX ở người (LC-F-25)

7.1 Các phương pháp

[00314] Động vật: Chuột cái athymic (nu/nu) ngoại lai (HSD: Athymic Nude-Foxn1nu), 5 tuần tuổi tại thời điểm mới đến được làm quen với ít nhất 4 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được đánh dấu tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

[00315] Cấy ghép khác loại: LC-F-25 được thiết lập như khối u đang phát triển (P9.1.1/0) từ ung thư biểu mô tuyến phổi không phải tế bào nhỏ nguyên phát từ bệnh nhân là người. LC-F-25 có sự biểu hiện MSLN thấp hơn về mức độ tích cực và cường độ tổng thể, dựa trên phân tích hóa mô miễn dịch (IHC), so với các loại khối u khác (chẳng hạn như, ví dụ, LXFA-737 (Ví dụ 8)).

[00316] Quy trình thí nghiệm: Ba mươi một (31) con chuột có khối u LC-F-25 đang phát triển được thiết lập (P9.1.1/0) giữa 108 và 288 mm³ được phân bổ để điều trị khi thể tích khối u trung bình và trung vị lần lượt đạt 153,5 và 126 mm³.

[00317] Việc điều trị: Hiệu quả được đánh giá trong 4 nhóm, mỗi nhóm từ 7 đến 8 con chuột:

- ☐ Trong nhóm 1, phương tiện được định liều ở 5 mL/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày thứ 1.

- Trong các nhóm 2 và 3, eribulin được định lượng tương ứng ở 0,1 mg/kg (5 mL/kg) và 3,2 mg/kg (6,4 mL/kg), i.v., liều duy nhất vào ngày thứ 1.
- Trong nhóm 4, MORAb-109 được định liều ở 10 mg/kg (5 mL/kg), i.v., liều duy nhất vào ngày thứ 1.

[00318] Các khối u được đo và con chuột được cân hai lần một tuần trong suốt thời gian thí nghiệm.

[00319] Phân tích thống kê: Phân tích thống kê được thực hiện cho mỗi phép đo bằng thử nghiệm so sánh phi thông số Mann-Whitney. Mỗi nhóm được điều trị được so sánh với nhóm đối chứng.

7.2 Các kết quả

[00320] MORAb-109 (DAR2) được tiêm với liều duy nhất 10 mg/kg qua đường tĩnh mạch được dung nạp tốt mà không bị giảm khối lượng cơ thể bởi chuột mang khối u LC-F-25 (Hình 21B). MORAb-109 (DAR2) chứng minh sự chậm phát triển khối u ở 10 mg/kg trong mô hình LC-F-25 NSCLC PDX (Hình 21A).

[00321] Eribulin được cung cấp với liều duy nhất ở 0,1 mg/kg (lượng mol tương đương của phụ tải trong MORAb-109 khi được dùng ở liều 10 mg/kg) bằng đường tĩnh mạch được dung nạp tốt bởi chuột mang khối u LC-F-25 nhưng không gây ra ức chế phát triển khối u đáng kể về mặt thống kê (Hình 21A và Hình 21B).

[00322] Eribulin được dùng với liều duy nhất ở 3,2 mg/kg (liều dùng MTD của chuột hoặc cao hơn 32 lần so với lượng mol của eribulin trong MORAb-109 khi được dùng ở 10 mg/kg) bằng đường tĩnh mạch được dung nạp tốt bởi chuột mang khối u LC-F-25, nhưng gây ra việc giảm nhẹ và tạm thời khối lượng cơ thể từ 3 đến 10 ngày sau khi dùng (Hình 21B). Ở liều này, eribulin gây ra sự ức chế phát triển khối u đáng kể về mặt thống kê, với sự thoái lui một phần khối u ở 6 trong số 8 con chuột (Hình 21A).

Ví dụ 8 Hiệu quả kháng khối u in vivo của MORAb-109 trong mô hình NSCLC PDX ở người (LXFA-737)

8.1 Các phương pháp

[00323] Động vật: Chuột cái NMRI nu/nu (CrI: NMRI-Foxn1nu), 4 đến 6 tuần tuổi.

[00324] Cây ghép khác loại: LXFA-737 được thiết lập dưới dạng khối u đang phát triển (P14N4) từ bệnh ung thư biểu mô tuyến phổi không phải tế bào nhỏ nguyên phát từ bệnh nhân là người. LXFA-737 có sự biểu hiện MSLN vừa phải về cường độ tổng thể và phần trăm dương tính cao hơn, dựa trên phân tích IHC, liên quan đến các loại khối u khác (chẳng hạn như, ví dụ, LC-F-25 (Ví dụ 7)).

[00325] Quy trình thí nghiệm: Các động vật được giám sát cho đến khi việc cấy ghép khối u đạt tiêu chuẩn thể tích nghiên cứu là 50-250 mm³ (ví dụ, 80–200 mm³) ở số lượng đủ các động vật. Các con chuột được phân thành các nhóm, nhằm vào các thể tích khối u trung bình và trung vị của nhóm có thể so sánh được. Ngày ngẫu nhiên được chỉ định là ngày 0.

[00326] Việc điều trị: Hiệu quả được đánh giá trong 4 nhóm, mỗi nhóm từ 6 đến 7 con chuột:

- ☐ Trong nhóm 1, phương tiện được định liều ở 5 mL/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày thứ 1.
- ☐ Trong các nhóm 2 và 3, eribulin được định liều tương ứng ở 0,2 mg/kg và 3,2 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày thứ nhất.
- ☐ Trong nhóm 4, MORAb-109 được định liều ở 10 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày thứ 1.

[00327] Các khối u được đo và con chuột được cân hai lần một tuần trong suốt thời gian thí nghiệm. Ngày đầu tiên dùng liều là ngày 1, một ngày sau khi phân nhóm ngẫu nhiên (ngày 0).

[00328] Phân tích thống kê: Ước chế sự phát triển của khối u, Giá trị thử nghiệm/đối chứng theo % (Tối thiểu T/C): Giá trị thử nghiệm so với đối chứng (T/C theo %) được tính toán từ tỷ lệ của các giá trị thể tích khối u còn lại trung bình (RTV) của các nhóm thử nghiệm so với đối chứng vào ngày X nhân với 100. Thể tích khối u tăng gấp đôi và thời gian tăng gấp bốn (Td, Tq) đối với các nhóm kiểm tra và đối chứng

được xác định là khoảng thời gian (tính theo ngày) cần thiết để nhóm đạt RTV trung bình là 200% hoặc 400%.

8.2 Các kết quả

[00329] MORAb-109 (DAR2) chứng minh hiệu quả kháng khối u mạnh mẽ (T/C tối thiểu, 2,3% vào ngày thứ 41) ở 10 mg/kg trong mô hình LXFA-737 NSCLC PDX (Hình 22A) và Tq của nó không đạt được trong suốt quá trình nghiên cứu. MORAb-109 được cho ở liều duy nhất cũng được dung nạp tốt mà không bị giảm khối lượng cơ thể bởi chuột mang khối u LXFA-737. (Hình 22B).

[00330] Eribulin được dùng với liều duy nhất 3,2 mg/kg (liều dùng MTD của chuột hoặc cao hơn 32 lần so với lượng mol của eribulin trong MORAb-109 khi được dùng ở 10 mg/kg) bằng đường tĩnh mạch được dung nạp tốt bởi chuột mang khối u LXFA-737, cho thấy hiệu quả kháng khối u (T/C tối thiểu, 4,2% vào ngày 27), và Tq của nó là 80,1%. Tuy nhiên, eribulin gây giảm khối lượng cơ thể nhẹ và tạm thời sau khi dùng (Hình 22A và Hình 22B). Liều duy nhất là 0,2 mg/kg, gấp đôi lượng mol của eribulin trong MORAb-109 khi được dùng ở 10 mg/kg, cho thấy hiệu quả kháng khối u hạn chế (T/C tối thiểu, 51,1% vào ngày thứ 44).

Ví dụ 9 Đáp ứng liều của MORAb-109 trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày (NCI-N87) ở người

9.1 Các phương pháp

9.1.1 Hiệu quả in vivo

[00331] Động vật: Chuột trụi lông NCr cái (Taconic), 5 tuần tuổi tại thời điểm mới đến được làm quen trong 5-7 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được gắn thẻ tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

[00332] Nuôi cấy tế bào: Các tế bào NCI-N87 được bảo quản lạnh được rã đông và nuôi trong môi trường chứa các chất bổ sung cần thiết. Các tế bào được nuôi cấy phụ trong môi trường hoàn chỉnh trong 2 con đường trước khi được sử dụng để cấy in vivo.

[00333] Cấy ghép khối u, quy trình ghi danh, và việc điều trị: Huyền phù tế bào trong PBS được trộn với Matrigel đá lạnh ở tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) đến nồng độ cuối cùng là $1,0 \times 10^8$ tế bào/mL. 100 μ L/chuột của hỗn hợp được tiêm dưới da. Chuột được giám

sát sức khỏe lâm sàng bằng các phép đo khối lượng cơ thể và khối u bằng thước cặp kỹ thuật số, 3 lần mỗi tuần, bắt đầu vào ngày thứ 3 sau khi cấy ghép.

[00334] Việc đo và việc điều trị khối u: Thể tích khối u (TV) (mm^3) được tính toán sử dụng công thức: $W (\text{mm}) \times L (\text{mm}) \times D (\text{mm}) \times \pi/6$. Khi các khối u đạt trung bình khoảng 100 mm^3 , các con vật được chọn ngẫu nhiên thành 5 con mỗi nhóm. Việc điều trị được đưa vào tĩnh mạch với thể tích $200 \mu\text{L}$ của vật phẩm thử nghiệm. Vào cuối nghiên cứu, khối lượng cơ thể cuối cùng được đo và được ghi lại.

[00335] Phân tích thống kê: Các thống kê mô tả được thực hiện trên dữ liệu của thể tích khối u và khối lượng cơ thể. Các thể tích khối u của động vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều đo lặp lại sau đó là bài kiểm tra sau Bonferroni. Ngoài ra, việc so sánh sự phát triển khối u của động vật trong mỗi nhóm được thực hiện với cùng phân tích thống kê.

9.1.2 Dược động lực học (PK)

[00336] Phân tích PK được thực hiện sử dụng cả thử nghiệm ADC nguyên vẹn và thử nghiệm tổng số kháng thể. Tổng số kháng thể dùng để chỉ tổng số của tất cả các loài, bao gồm cả loài liên hợp và không liên hợp (nghĩa là, $\text{DAR0} + \text{DAR1} + \text{DAR2} + \dots + \text{DARn}$), trong khi ADC nguyên vẹn dùng để chỉ tất cả các loài liên hợp (nghĩa là, $\text{DAR1} + \text{DAR2} + \dots + \text{DARn}$). Thử nghiệm tổng kháng thể sử dụng mesothelin được biotin hóa để bắt và Fc kháng người được đánh dấu AlexaFluor647 để phát hiện. Thử nghiệm ADC nguyên vẹn sử dụng 5E4 kháng eribulin được biotin hóa để bắt và Fc kháng người được đánh dấu AlexaFluor647 để phát hiện. Phân tích mẫu được thực hiện trên máy phân tích Gyros. Phân tích dữ liệu được thực hiện trong WatsonLIMS 7.4.1 và được vẽ trong Microsoft Excel. Eribulin được định lượng sử dụng LC-MS từ các mẫu huyết tương, khối u và tủy xương.

9.1.3 LC-MS

[00337] $20\text{-}50 \mu\text{L}$ huyết tương MORAb-109 (DAR2) từ những con chuột riêng lẻ hoặc $50 \mu\text{L}$ huyết tương được gộp bằng nhau từ những con chuột đã dùng MORAb-109 (DAR6) được sử dụng để phân tích. Dynabeads M-280 streptavidin ($100 \mu\text{L}$) được ủ với $3 \mu\text{g}$ của thể liên hợp biotin IgG-Fc PK ở người chọn lọc bắt trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được rửa với đệm HBS-EP. Các mẫu huyết tương được pha loãng trong đệm HBS-EP sau đó được trộn với các hạt được tạo phức/được rửa để bắt các phức

MORAb-109, được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được rửa hai lần trong đệm HBS-EP. Các hạt được rửa chứa phức được khử glycosyl hóa với Rapid PNGaseF (1 μ L) trong đệm PNGaza trong 1 giờ ở 37°C, sau đó được rửa một lần trong đệm HBS-EP. Việc rửa giải MORAb-109 được bắt/được glycosyl hóa được thực hiện với 10% axetonitril w/0,1% axit formic (30 μ L). Các mẫu được phân tích nguyên vẹn hoặc giảm khối lượng bằng phân tích Synapt G2/UPLC lớp M.

9.2 Các kết quả

[00338] Hiệu quả kháng khối u và sự thay đổi khối lượng cơ thể trong mô hình mảnh ghép khác loại NCI-N87 ung thư dạ dày ở người được điều trị bằng liều duy nhất MORAb-109 (DAR2 hoặc DAR6) ở 10 mg/kg được thể hiện trên Hình 23A và Hình 23B, một cách tương ứng.

[00339] Phân tích PK của MORAb-109 (DAR2), MORAb-109 (DAR6), và kháng thể không được liên hợp được thể hiện trên Bảng 27. Tổng kháng thể cho không liên hợp và MORAb-109 (DAR2) là tương tự, trong khi MORAb-109 (DAR6) là thấp hơn, cho thấy rằng MORAb-109 (DAR2) ổn định trong tuần hoàn.

[00340] Việc phân tích DAR của các ADC từ các mẫu huyết tương chỉ ra rằng tỷ lệ giải phóng phụ tải là cao hơn đối với các loài DAR6 và góp phần vào các mức huyết tương cao hơn của eribulin (các Bảng 28 và 29).

Bảng 27. Biên dạng PK của MORAb-109 (DAR2 và DAR6) ở chuột mang khối u NCI-N87

DAR2						
Các thông số	Đơn vị	ADC	Tổng Ab	ERI huyết tương	ERI khối u	ERI tủy xương
CL _{tot}	mL/giờ/kg	0,71	N/A	N/A	N/A	N/A
V _{dSS}	mL/kg	121	N/A	N/A	N/A	N/A

AUC _{0-inf}	mg×giờ/mL	14,2	20,9	44,0 (ng×giờ/mL)	17,8 (μg×giờ/mL)	9,9 (μg×giờ/mL)
T _{max}	giờ	N/A	0,17	0,17	24	1
C _{max}	μg/mL	N/A	137	0,65 (ng/mL)	64 (ng/g)	121 (ng/g)
T _{1/2}	giờ	134	191	59	162	151
DAR6						
CL _{tot}	mL/giờ/kg	0,73	N/A	N/A	N/A	N/A
V _{dss}	mL/kg	100	N/A	N/A	N/A	N/A
AUC _{0-inf}	mg×giờ/mL	13,7	14,4	121 (ng×giờ/mL)	16,0 (μg×giờ/mL)	6,7 (μg×giờ/mL)
T _{max}	giờ	N/A	0,17	1	24	3
C _{max}	μg/mL	N/A	148	2,6 (ng/mL)	96 (ng/g)	94 (ng/g)
T _{1/2}	giờ	103	129	33	98	76
Ab trần						
CL _{tot}	mL/giờ/kg		0,54			
V _{dss}	mL/kg		126			
AUC _{0-inf}	mg×giờ/mL		18,5			

C _{max}	µg/mL		183
T _{1/2}	giờ		<u>164</u>

Bảng 28. DAR của MORAb-109 (DAR2) trong huyết tương

Giờ	1	2	3	DAR trung bình
0.167	1,92	1,93	1,94	1,93
8	1,88	1,86	1,92	1,89
24	1,83	1,86	1,90	1,86
48	1,87	1,82	1,83	1,84
96	1,83	1,65	1,78	1,75
168	1,69	1,75	1,63	1,69
336	1,38	1,54	1,64	1,52
504	1,08	1,18	1,63	1,30

Bảng 29. DAR của MORAb-109 (DAR6) trong huyết tương

Thời gian (giờ)	Chuỗi L	Chuỗi H	DAR trung bình
0.167	1,52	1,23	5,52
8	1,46	1,13	5,18
24	1,26	0,81	4,15
48	1,25	0,71	3,91
96	1,27	0,44	3,42

168	0,93	0,38	2,61
336	0,86	0,35	2,41
504	N.D.	N.D.	N.A.

Ví dụ 10 So sánh 345A12 HC15 LC4 với ái lực gắn anetumab

10.1 Các phương pháp

[00341] Các kháng thể: 345A12 HC15 LC4 (kháng thể kháng mesothelin trong MORAb-109) và anetumab. Các trình tự cho anetumab, kháng thể kháng mesothelin ở người, được nêu trong Bảng 30.

[00342] Ái lực gắn: Các phép đo gắn được thực hiện trong bộ đệm HBS-P + trên thiết bị BIAcore T-100. Các kháng thể được pha loãng tới 1 µg/mL trong HBS-P +. Các mẫu được ly tâm ở 14000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó dịch nổi được chuyển sang ống BIAcore 1,5 mL mới và được đậy nắp. Mesothelin (50 µg) được pha loãng thành 100 nM trong bộ đệm 1xHBS-P +, sau đó pha loãng nối tiếp 5 lần ở 100, 20, 4, 0,8 và 0,16 nM trong các ống BIAcore và được đậy nắp. Chip bắt kháng thể kháng người được chuẩn bị theo quy trình của nhà sản xuất sử dụng chip CM5 với trình hướng dẫn cố định. Các mức kháng thể bắt cuối cùng là 8000-9000RU, trong HBS-P +. Chip được chuẩn bị cho thử nghiệm với năm chu kỳ tiêm đệm 300 giây sau đó là tái sinh 30 giây, tất cả đều ở tốc độ 30 µL/phút trên tất cả bốn tế bào dòng.

[00343] Các kháng thể được bắt trên các tế bào dòng 2-4 bằng cách tiêm liên tiếp các dung dịch phối tử riêng lẻ trong 90 giây ở 10 µL/phút. Việc tiêm phân tích được thực hiện theo phương thức động học một vòng bằng cách tiêm liên tiếp các dung dịch chất phân tích từ nồng độ thấp đến nồng độ cao trong 240 giây mỗi lần với tốc độ 30 µL/phút. Sự phát hiện là 2-1, 3-1, 4-1. Tham chiếu kép được thực hiện bởi chuỗi các lần tiêm bắt phối tử giống hệt nhau, sau đó là 5 lần tiêm chỉ đệm trong 240 giây mỗi lần, phân ly trong 1800 giây và tái sinh như trên. Tất cả các phối tử được phân tích để gắn với mesothelin trong bản sao. Phân tích động học được thực hiện sử dụng phần mềm BIAEvaluations sử dụng mô hình khớp Langmuir 1:1. Các hằng số tỷ lệ bật, tỷ lệ giảm và ái lực được tính trung bình từ các lần chạy bản sao.

10.2 Các kết quả

[00344] 345A12 HC15 LC4 thể hiện ái lực cao hơn 40 lần so với anetumab (Bảng 31). 345A12 HC15 LC4 giữ lại ái lực gắn với mesothelin ở khí lỏng xám, trong khi anetumab không gắn với mesothelin ở khí lỏng xám. Không kháng thể nào gắn với mesothelin ở chuột.

Bảng 30. Các trình tự anetumab

Chuỗi IgG	NA/AA	SEQ ID	Trình tự
Chuỗi nặng	Amino axit	51	QVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTSYWIGWVRQAPGKLEWMGIIDPGD SRTRYSPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYCYCARGQLYGGTYMDGW GGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
	Axit nucleic	52	CAGGTTGAACTGGTTCAGTCTGGCGCC GAAGTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCCT GAAGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGCT ACAGCTTCACCAGCTATTGGATCGGCT GGGTTCGACAGGCCCTGGCAAAGGA CTGGAATGGATGGGAATCATCGACCC CGGCGACAGCAGAACCAGATACAGCC

Chuỗi IgG	NA/AA	SEQ ID	Trình tự
			CTAGCTTTCAGGGCCAAGTGACCATCA GCGCCGACAAGAGCATCAGCACAGCC TACCTGCAGTGGTCTAGCCTGAAAGCC AGCGACACCGCCATGTACTATTGTGCC AGAGGCCAGCTGTACGGCGGCACCTA TATGGATGGATGGGGCCAGGGCACAC TGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAA AGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTC CTAGCAGCAAGAGCACATCTGGTGGA ACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG GATTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTG TCCTGGAATAGCGGAGCACTGACAAG CGGCGTGACACATTTCCAGCTGTGCT GCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGTC TAGCGTCGTGACAGTGCCTAGCAGCTC TCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCT CCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGC GGACCCTCCGTTTTCTGTTCACCT AAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAG CAGGACCCCTGAAGTGACCTGTGTGGT GGTGATGTGTCCCACGAGGACCCAG AAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACA GCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAAC GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC

Chuỗi IgG	NA/AA	SEQ ID	Trình tự
			CAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGA GAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCAAGAGAACCCCAGGTTTACACA CTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGAC CAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCT CGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCC AGCCTGAGAACAACACTACAAGACAACC CCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCA TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTG GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAA CGTGTTTCAGCTGTTCTGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AAAGCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAA
Chuỗi nhẹ	Amino axit	53	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIG GYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYGVNNR PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDE ADYYCSSYDIESATPVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	Axit nucleic	54	GATATTGCTCTGACACAGCCTGCCAGC GTGTCCGGATCTCCTGGCCAGAGCATC ACAATCAGCTGTACCGGCACAAGCAG CGACATCGGCGGCTACAATAGCGTGT CCTGGTATCAGCAGCACCCCGGAAAG GCCCCTAAGCTGATGATCTACGGCGTG AACAACAGACCCAGCGGCGTGTCCAA

Chuỗi IgG	NA/AA	SEQ ID	Trình tự
			TAGATTTCAGCGGCAGCAAGAGCGGCA ATACCGCCTCTCTGACAATTAGCGGAC TGCAGGCCGAGGACGAGGCCGATTAC TACTGCAGCAGCTACGACATCGAGAG CGCCACACCTGTGTTTGGCGGCGGAAC AAAAGTACAGTGCTGGGCCAACCTA AGGCCGCTCCTAGCGTTACACTGTTCC CACCTAGCAGCGAGGAACTGCAGGCT AACAAGGCCCACTCGTGTGCCTGATC AGCGATTTTTTACCCTGGCGCCGTGACA GTGGCCTGGAAAGGCGATAGTTCTCCT GTGAAGGCCGGCGTGGAAACCACCAC ACCTAGCAAGCAGAGCAACAACAAAT ACGCCGCCAGCTCCTACCTGAGCCTGA CACCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGA TCCTACAGCTGCCAAGTGACCCACGA GGGCAGCACCGTGGAAAAACAGTGG CCCCTACCGAGTGCAGC

Bảng 31. Việc gắn của 345A12 HC15 LC4 và anetumab với mesothelin ở người, khỉ lông xám, và chuột

		$k_a(M^{-1}sec^{-1})$	$K_d(sec^{-1})$	$K_D(M)$
Người	345A12 HC15 LC4	$1,46 \pm 0,05 \times 10^6$	$2,85 \pm 0,14 \times 10^{-4}$	$1,95 \pm 0,16 \times 10^{-10}$
	anetumab	$1,68 \pm 0,64 \times 10^5$	$1,12 \pm 1,00 \times 10^{-3}$	$7,26 \pm 2,29 \times 10^{-9}$
Khí lông xám	345A12 HC15 LC4	$1,05 \pm 1,15 \times 10^4$	$7,51 \pm 5,76 \times 10^{-4}$	$8,86 \pm 5,16 \times 10^{-8}$
	anetumab	không gắn	không gắn	không gắn
Chuột	345A12 HC15 LC4	không gắn	không gắn	không gắn
	anetumab	không gắn	không gắn	không gắn

Ví dụ 11 Việc so sánh MORAb-109 với BAY 94-9343 - hiệu lực in vitro

11.1 Các phương pháp

[00345] Các ADC: MORAb-109 (DAR2 và DAR6) và anetumab ravtansin (BAY 94-9343) được đánh giá. Anetumab ravtansin, còn được gọi là BAY 94-9343, là một ADC bao gồm anetumab được liên hợp với chất ức chế maytansinoid tubulin DM4 thông qua cầu nối chứa disulfit (cầu nối SPDB có thể khử [N-succinimidyl 4- (2-pyridyldithio) butanoat]). BAY 94-9343 được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 15.

[00346] Khả năng gây độc tế bào: Tế bào được nuôi cấy phụ và được gieo ở 5000 tế bào/giếng trong môi trường sinh trưởng hoàn chỉnh trong các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng, và được ủ ở 37°C, CO₂ 5% qua đêm (16 giờ). Các chất phản ứng thử nghiệm được pha loãng lần lượt theo tỷ lệ 1:3 trong các đĩa pha loãng giếng sâu 2 mL, bắt đầu ở 200 nM (tổng cộng 10 lần pha loãng). Các mẫu được pha loãng (100 µL) được thêm vào các đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của các mẫu thử ở 100 nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, CO₂ 5% trong 5 ngày nữa. Môi trường sau đó được loại bỏ, và các đĩa được rửa một lần với 200 µL DPBS, nhuộm bằng 50 µL dung dịch tím kết tinh 0,2% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và sau đó được rửa kỹ bằng nước máy. Các đĩa được làm khô trong không khí,

và tím kết tinh được hòa tan với 200 μ L dung dịch SDS 1%. Các đĩa được đọc ở 570 nm. Dữ liệu được phân tích cho việc xác định IC₅₀ sử dụng GraphPad Prism 6.

11.2 Các kết quả

[00347] MORAb-109 (DAR2 và DAR6) cho thấy khả năng gây độc tế bào đặc hiệu trên các dòng tế bào dương tính MSLN (Bảng 32). Ngược lại, BAY 94-9343 chứng minh khả năng tiêu diệt trên cả các dòng tế bào dương tính MSLN và âm tính MSLN.

Bảng 32. Việc so sánh hoạt tính in vitro trên các dòng tế bào MSLN⁺ và MSLN⁻

	Hiệu lực dựa trên tế bào in vitro, IC ₅₀ , nM					
	OVCAR3-A1	NCI-H1568/MSLN	NCI-H292	BxPC3	A431	SKOV3
MORAb109_DAR2	0,01	2,17	>300	88,24	109,30	213,80
MORAb109_DAR6	0,02	1,09	4,80	2,66	20,12	21,77
Eribulin	0,02	0,14	0,11	0,13	0,18	0,14
BAY 94-9343	0,41	0,15	3,07	2,53	5,31	0,81
DM4	0,10	0,57	0,24	0,57	0,71	0,28
anetumab	>100	>100	>300	>300	>300	>300
	% Tiêu diệt tối đa					

MORAb109_DA R2	98,39	73,49	58,22	90,62	84,97	58,41
MORAb109_DA R6	98,47	77,89	75,34	94,63	90,76	72,79
Eribulin	99,31	74,39	85,37	97,28	93,04	72,82
BAY 94-9343	100,00	75,10	84,15	97,33	96,82	74,99
DM4	100,00	77,49	92,40	97,98	92,52	81,89
anetumab	19,80	5,50	15,15	25,73	18,58	31,55
Sự biểu hiện MSLN (MFI)	220,0	4474,0 0	108,6	15,59	5,6	20

Ví dụ 12 Việc so sánh MORAb-109 với BAY 94-9343 - Tính đặc hiệu

12.1 Các phương pháp

[00348] Khả năng gây độc tế bào: Tế bào được nuôi cấy phụ và được gieo ở 5000 tế bào/giếng trong môi trường sinh trưởng hoàn chỉnh trong các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng, và được ủ ở 37°C, CO₂ 5% qua đêm (16 giờ). Các chất phản ứng thử nghiệm được pha loãng lần lượt theo tỷ lệ 1:3 trong các đĩa pha loãng giếng sâu 2 mL, bắt đầu ở 200 nM (tổng cộng 10 lần pha loãng). Các mẫu được pha loãng (100 µL) được thêm vào các đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của các mẫu thử ở 100 nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, CO₂ 5% trong 5 ngày nữa. Môi trường sau đó được loại bỏ, và các đĩa được rửa một lần với 200 µL DPBS, nhuộm bằng 50 µL dung dịch tím kết tinh 0,2% ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó được rửa kỹ bằng nước máy. Các đĩa được làm khô trong không khí, và tím kết tinh được hòa tan với 200 µL dung dịch SDS 1%. Các đĩa được đọc ở 570 nm. Dữ liệu được phân tích cho việc xác định IC₅₀ sử dụng GraphPad Prism 6.

12.2 Các kết quả

[00349] Các thử nghiệm khả năng gây độc tế bào với kháng thể không liên hợp chứng minh khả năng tiêu diệt đặc hiệu của các tế bào biểu hiện mesothelin bởi MORAb-109 (DAR2) (Hình 25A), nhưng không phải BAY 94-9343 (Hình 25B). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, sự thiếu cạnh tranh bởi kháng thể không liên hợp được quan sát đối với BAY 94-9343 cho thấy sự giải phóng phụ tải, có thể dẫn đến việc tiêu diệt ngay cả khi việc gắn kháng thể bị chặn bởi đối thủ cạnh tranh không liên hợp. Sự giải phóng phụ tải này là thống nhất với các mức tương đối cao của khả năng gây độc tế bào được quan sát thấy đối với BAY 94-9343 trên các dòng tế bào âm tính mesothelin (Bảng 32). Việc giải phóng phụ tải cũng được quan sát trực tiếp trong Hình 27 (so sánh độ ổn định huyết tương).

Ví dụ 13 Việc so sánh MORAb-109 với BAY 94-9343 - Hoạt tính ADCC

13.1 Các phương pháp

[00350] Các tế bào CHO biểu hiện MSLN được rửa đông và được gieo 1000 tế bào/giếng (25 μ L) trong các đĩa nuôi cấy mô 96 giếng trong RPMI-4% Ultralow IgG FBS hoàn chỉnh. Các chất phản ứng thử nghiệm (kháng thể 345A12, MORAb-109 (DAR2) và BAY 94-9343) được pha loãng nối tiếp 1:2,5 bắt đầu từ 20 μ g/mL trong RPMI-4% IgG FBS cực thấp hoàn chỉnh, sau đó được chuyển (25 μ L) sang đĩa tế bào và được ủ ở 37 C, CO₂ 5% trong 60 phút. 6000 tế bào Jurkat-Effector (Promega) được rửa đông và được thêm (25 μ L) vào đĩa tế bào, và đĩa được ủ ở 37°C, CO₂ 5% trong 18-22 giờ.

[00351] Chất phản ứng thử nghiệm luciferaza được rửa đông trong bóng tối. 75 μ L chất phản ứng thử nghiệm luciferaza được thêm vào mỗi giếng, các đĩa được lắc trong 30 giây trên máy lắc đĩa. Các đĩa được đọc trên máy đo sáng sau khi ủ 5 phút.

13.2 Các kết quả

[00352] MORAb-109 (DAR2) và 345A12 HC15 LC4 có hoạt tính ADCC tương tự (Hình 26A và Bảng 33), trong khi BAY 94-9343 có hoạt tính ADCC yếu hơn so với anetumab (Hình 26B và Bảng 34).

Bảng 33. Hoạt tính ADCC - MORAb-109 và 345A12 HC15 LC4

345A12	MORAb-109
100%	96,9%

Bảng 34. Hoạt tính ADCC - BAY 94-9343 và anetumab

anetumab	BAY 94-9343
100%	65,06%

Ví dụ 14 Độ ổn định của MORAb-109 và BAY 94-9343 trong nền

14.1 Các phương pháp

[00353] Các ADC kháng MSLN được chuẩn bị ở 0,1 mg/mL trong huyết tương ở người hoặc chuột, các mẫu được ủ ở 37°C trong 0, 24, 48, 72, 96 và 240 giờ, sau đó được chuyển đến -80°C để bảo quản khi các mốc thời gian được đạt. Tất cả các mẫu được rã đông đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được pha loãng 1:100 để thử nghiệm. Thử nghiệm độ ổn định nhạy DAR được phát triển dưới định dạng kẹp từng bước trên Gyrolab. Thử nghiệm sử dụng mesothelin được biotin hóa để bắt sau khi chặn và gắn mẫu, và Alexa Fluor 647 kháng eribulin 5E4 Fab hoặc Alexa Fluor 647 kháng DM4 (Levena Biopharma) để phát hiện. Đường cong tiêu chuẩn và các đối chứng chất lượng được thực hiện với MORAb-109 và BAY 94-9343.

14.2 Các kết quả

[00354] MORAb-109 (DAR2) là ổn định hơn BAY 94-9343 ở cả huyết tương người và chuột (Hình 27).

Ví dụ 15 Hiệu quả kháng khối u của MORAb-109 và BAY 94-9343 trong mô hình mảnh ghép khác loại ung thư dạ dày (NCI-N87) ở người

15.1 Các phương pháp

15.1.1 Việc tạo ra BAY 94-9343

[00355] BAY 94-9343 là ADC bao gồm anetumab được liên hợp với chất ức chế maytansinoid tubulin DM4 thông qua cầu nối chứa disulfit (cầu nối SPDB có thể khử [N-succinimidyl 4- (2-pyridyldithio) butanoat]). Các trình tự từ anetumab được lấy từ cơ sở dữ liệu Beacon (Hanson-Wade). Các trình tự kháng thể (Bảng 30) được tạo ra từ

các oligonucleotit chồng lên nhau, được khuếch đại PCR, được nhân bản thành các plasmid biểu hiện và được xác nhận trình tự. Các vùng ổn định được tạo ra trong các tế bào 293F và các tế bào được phát triển cho đến khi khả năng sống sót <30%. Anetumab được tinh sạch từ môi trường được tạo điều kiện sử dụng phép sắc ký ái lực protein A. BAY 94-9343 được tạo ra bằng cách liên hợp phản ứng lysin với SPDB-DM4 (Levena BioPharma) để đạt được DAR là 3,7. Phụ tải không liên hợp được loại bỏ bằng phương pháp sắc ký khử muối.

15.1.2 Hiệu quả in vivo

[00356] Động vật: Chuột trụi lông NCr cái (Taconic), 5 tuần tuổi tại thời điểm mới đến được làm quen trong 5-7 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được gắn thẻ tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

[00357] Nuôi cấy tế bào: Các tế bào NCI-N87 được bảo quản lạnh được rã đông và nuôi trong môi trường chứa các chất bổ sung cần thiết. Các tế bào được nuôi cấy phụ trong môi trường hoàn chỉnh trong 2 con đường trước khi được sử dụng để cấy in vivo.

[00358] Cấy ghép khối u, quy trình ghi danh, và việc điều trị: Huyền phù tế bào trong PBS được trộn với Matrigel đã lạnh ở tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) đến nồng độ cuối cùng là $1,0 \times 10^8$ tế bào/mL. 100 μ L/chuột của hỗn hợp được tiêm dưới da. Chuột được giám sát sức khỏe lâm sàng bằng các phép đo khối lượng cơ thể và khối u bằng thước cặp kỹ thuật số, 3 lần mỗi tuần, bắt đầu vào ngày thứ 3 sau khi cấy ghép.

[00359] Việc đo và việc điều trị khối u: Thể tích khối u (TV) (mm^3) được tính toán sử dụng công thức: $W (\text{mm}) \times L (\text{mm}) \times D (\text{mm}) \times \pi/6$. Khi các khối u đạt trung bình khoảng 100 mm^3 , các con vật được chọn ngẫu nhiên thành 5 con mỗi nhóm. Việc điều trị được đưa vào tĩnh mạch với thể tích 200 μ L của vật phẩm thử nghiệm. Vào cuối nghiên cứu, khối lượng cơ thể cuối cùng được đo và được ghi lại.

[00360] Phân tích thống kê: Các thống kê mô tả được thực hiện trên dữ liệu của thể tích khối u và khối lượng cơ thể. Các thể tích khối u của động vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều đo lặp lại sau đó là bài kiểm tra sau Bonferroni. Ngoài ra, việc so sánh sự phát triển khối u của động vật trong mỗi nhóm được thực hiện với cùng phân tích thống kê.

15.2 Các kết quả

[00361] MORAb-109 (DAR2) và BAY 94-9343 đều chứng minh hiệu quả tương tự ở chuột mang khối u NCI-N87 (Hình 28A). Không có việc giảm khối lượng cơ thể nào được quan sát thấy ở nhóm nào (Hình 28B).

Ví dụ 16 Hiệu quả kháng khối u của MORAb-109 và BAY 94-9343 trong mô hình mảnh ghép khác loại u trung biểu mô (HAY) ở người

16.1 Các phương pháp

[00362] Động vật: Chuột NOD.CB17-SCID cái (Jackson Laboratory), 5 tuần tuổi tại thời điểm mới đến được làm quen trong 5-7 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được gắn thẻ tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

[00363] Nuôi cấy tế bào: Các tế bào HAY được bảo quản lạnh được rã đông và nuôi trong môi trường chứa các chất bổ sung cần thiết. Các tế bào được nuôi cấy phụ trong môi trường hoàn chỉnh trong 2 con đường trước khi được sử dụng để cấy in vivo.

[00364] Cấy ghép khối u, quy trình ghi danh, và việc điều trị: Huyền phù tế bào trong PBS được trộn với Matrigel đá lạnh ở tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) đến nồng độ cuối cùng là $5,0 \times 10^7$ tế bào/mL. 100 μ L/chuột của hỗn hợp được tiêm dưới da. Chuột được giám sát sức khỏe lâm sàng bằng các phép đo khối lượng cơ thể và khối u bằng thước cặp kỹ thuật số, 3 lần mỗi tuần, bắt đầu vào ngày thứ 3 sau khi cấy ghép.

[00365] Việc đo và việc điều trị khối u: Thể tích khối u (TV) (mm^3) được tính toán sử dụng công thức: $W (\text{mm}) \times L (\text{mm}) \times D (\text{mm}) \times \pi/6$. Khi các khối u đạt trung bình khoảng 100 mm^3 , các con vật được chọn ngẫu nhiên thành 5 con mỗi nhóm. Việc điều trị được đưa vào tĩnh mạch với thể tích 200 μ L của vật phẩm thử nghiệm. Vào cuối nghiên cứu, khối lượng cơ thể cuối cùng được đo và được ghi lại.

[00366] Phân tích thống kê: Các thống kê mô tả được thực hiện trên dữ liệu của thể tích khối u và khối lượng cơ thể. Các thể tích khối u của động vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều đo lặp lại sau đó là bài kiểm tra sau Bonferroni. Ngoài ra, việc so sánh sự phát triển khối u của động vật trong mỗi nhóm được thực hiện với cùng phân tích thống kê.

16.2 Các kết quả

[00367] MORAb-109 (DAR2) và BAY 94-9343 đều chứng minh hiệu quả tương tự ở chuột mang khối u HAY (Hình 29A). Không có việc giảm khối lượng cơ thể nào được quan sát thấy ở nhóm nào (Hình 29B).

Ví dụ 17 Hiệu quả kháng khối u của MORAb-109 và BAY 94-9343 trong mô hình u trung biểu mô PDX ở người (Meso7212)

17.1 Các phương pháp

[00368] Động vật: Chuột cái NMRI nu/nu (Janvier Labs), từ 5 đến 6 tuần tuổi tại thời điểm mới đến, được thích nghi ít nhất 4 ngày trước khi cấy. Các con vật được nhốt 3-5 chuột trên mỗi lồng thông gió với các viên thức ăn tiết trùng và chai nước có sẵn mà không chuẩn bị trước. Các con vật được đánh dấu tai và được cân trước khi bắt đầu nghiên cứu.

[00369] Cấy ghép khác loại: Vào ngày 0, các khối u Meso 7212 được loại bỏ khỏi năm con chuột hiến tặng trong điều kiện vô trùng. Mô khối u được cắt thành các mảnh 2 x 2 mm và được đặt trong đĩa Petri vô trùng được phủ nước muối 0,9%. Song song đó, các động vật thụ được điều trị tiêm dưới da giảm đau bằng Metacam® (2 mg/kg) và sau đó được gây mê bằng liều tiêm tĩnh mạch duy nhất (0,15 mL/chuột) với Etomidat-Lipuro® (12 mg/kg). Vết rạch dọc nông trên da 5-8 mm ở sườn trái được thực hiện. Đầu của kéo phẫu thuật được đưa vào vết rạch trực tiếp qua sườn và được sử dụng để tạo thành túi trong khoảng dưới da. Một mảnh khối u trên mỗi chuột được cấy vào túi sử dụng nhíp phẫu thuật. Cuối cùng, vết mổ được đóng lại bằng kẹp kim loại và con vật được đặt trong lồng sạch.

[00370] Quy trình thí nghiệm: Sau việc cấy ghép khác loại, việc ghép và việc lây lan của khối u ở chuột được kiểm soát ít nhất hai lần mỗi tuần bằng cách sờ nắn. Khi sờ thấy khối u, các phép đo đường kính khối u được thực hiện bằng thước cặp kỹ thuật số (Mitutoyo).

[00371] Trước khi bắt đầu điều trị, động vật được phân chia ngẫu nhiên vào các nhóm thí nghiệm theo thể tích khối u của chúng (tiêu chí bao gồm về thể tích khối u, 0,1-0,3 cm³). Từ ngày điều trị đầu tiên trở đi, các thể tích khối u và các khối lượng cơ thể được ghi lại hai lần mỗi tuần. Sự an toàn của động vật được kiểm soát hai lần mỗi ngày.

[00372] Việc điều trị: Tất cả các tác nhân được dùng qua đường tĩnh mạch dưới dạng liều duy nhất vào ngày ngẫu nhiên. Động vật trong nhóm đối chứng được điều trị bằng DPBS theo cách tương tự.

[00373] Phân tích thống kê: Các thống kê mô tả được thực hiện trên dữ liệu của thể tích khối u và khối lượng cơ thể. Các thể tích khối u của động vật từ mỗi nhóm điều trị được so sánh với nhóm đối chứng bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều đo lặp lại sau đó là bài kiểm tra sau Bonferroni. Ngoài ra, việc so sánh sự phát triển khối u của động vật trong mỗi nhóm cũng được thực hiện với cùng phân tích thống kê.

17.2 Các kết quả

[00374] MORAb-109 (DAR2) và BAY 94-9343 đều chứng minh sự thoái hóa của khối u ở chuột mang khối u Meso7212 (Hình 30A). Không có việc giảm khối lượng cơ thể nào được quan sát thấy ở nhóm nào (Hình 30B).

Ví dụ 18 Hiệu quả kháng khối u của MORAb-109 và BAY 94-9343 trong mô hình NSCLC PDX ở người (LXFA-586)

18.1 Các phương pháp

[00375] Động vật: Chuột cái NMRI nu/nu, 4 đến 6 tuần tuổi.

[00376] Cấy ghép khác loại: LXFA-586 được thiết lập khối u đang phát triển (T2N1M0) từ bệnh nhân là người bị ung thư biểu mô tuyến phổi không phải tế bào nhỏ nguyên phát.

[00377] Quy trình thí nghiệm: Các động vật được giám sát cho đến khi việc cấy ghép khối u đạt tiêu chuẩn thể tích nghiên cứu là 50-250 mm³ (ví dụ, 80–200 mm³) ở số lượng đủ các động vật. Các con chuột được phân thành các nhóm nhằm vào các thể tích khối u trung bình và trung vị của nhóm có thể so sánh được. Quá trình phân công cho các nhóm (ghi danh, ngẫu nhiên phân tầng) cũng có thể được gọi là ngẫu nhiên hóa. Ngày ngẫu nhiên được chỉ định là ngày 0 của thí nghiệm.

[00378] Việc điều trị: Hiệu quả được đánh giá trong 4 nhóm, mỗi nhóm từ 6 đến 7 con chuột:

- ☐ Trong nhóm 1, phương tiện được định liều ở 5 mL/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày thứ 1.

- Trong nhóm 2, BAY 94-9343 (DAR ~ 4) được định liều ở 25 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày 1.
- Trong nhóm 3, MORAb-109 (DAR2) được định liều ở 25 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày 1.
- Trong nhóm 4, eribulin được định liều ở 3,2 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày 1.

[00379] Các khối u được đo và con chuột được cân hai lần một tuần trong suốt thời gian thí nghiệm. Ngày đầu tiên dùng liều là ngày 1, một ngày sau khi phân nhóm ngẫu nhiên (ngày 0).

18.2 Các kết quả

[00380] MORAb-109 (DAR2) chứng minh hiệu quả kháng khối u mạnh mẽ (T/C tối thiểu, 1,8% vào ngày thứ 41) ở 25 mg/kg trong mô hình LXFA-586 NSCLC PDX (Hình 31A) và Tq của nó không đạt được trong suốt quá trình nghiên cứu. MORAb-109 được cho ở liều duy nhất cũng được dung nạp tốt mà không bị giảm khối lượng cơ thể bởi chuột mang khối u LXFA-586. (Hình 31B).

[00381] BAY 94-9343 (DAR ~ 4) chứng minh hiệu quả kháng khối u mạnh mẽ tương tự với MORAb-109 ở 25 mg/kg trong mô hình LXFA-586 NSCLC PDX (Hình 31A) và Tq của nó không đạt được trong suốt quá trình nghiên cứu. Tuy nhiên, lượng mol của phụ tải DM4 trong BAY 94-9343 gần gấp đôi lượng phụ tải eribulin trong MORAb-109.

[00382] Eribulin được dùng với liều duy nhất 3,2 mg/kg (liều dùng MTD của chuột hoặc cao hơn 32 lần so với lượng mol của eribulin trong MORAb-109 khi được dùng ở 10 mg/kg) bằng đường tĩnh mạch được dung nạp tốt bởi chuột mang khối u LXFA-586, và cho thấy hiệu quả kháng khối u (T/C tối thiểu, 14,8% vào ngày 21). Tuy nhiên, eribulin gây giảm khối lượng cơ thể nhẹ và tạm thời sau khi dùng (Hình 31A và Hình 31B).

Ví dụ 19 Hiệu quả kháng khối u của MORAb-109 và BAY 94-9343 trong mô hình NSCLC PDX ở người (LXFL-529)

19.1 Các phương pháp

[00383] Động vật: Chuột cái NMRI nu/nu, 4 đến 6 tuần tuổi.

[00384] Cấy ghép khác loại: LXFL-529 được thiết lập khối u đang phát triển (T3N1M0) từ bệnh nhân là người bị ung thư biểu mô tuyến phổi không phải tế bào nhỏ nguyên phát.

[00385] Quy trình thí nghiệm: Các động vật được giám sát cho đến khi việc cấy ghép khối u đạt tiêu chuẩn thể tích nghiên cứu là 50-250 mm³ (ví dụ, 80–200 mm³) ở số lượng đủ các động vật. Các con chuột được phân thành các nhóm nhằm vào các thể tích khối u trung bình và trung vị của nhóm có thể so sánh được. Quá trình phân công cho các nhóm (ghi danh, ngẫu nhiên phân tầng) cũng có thể được gọi là ngẫu nhiên hóa. Ngày ngẫu nhiên được chỉ định là ngày 0 của thí nghiệm.

[00386] Việc điều trị: Hiệu quả được đánh giá trong 6 nhóm, mỗi nhóm từ 6 đến 7 con chuột:

- ☐ Trong nhóm 1, phương tiện được định liều ở 5 mL/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày thứ 1.
- ☐ Trong nhóm 2, BAY 94-9343 (DAR ~ 4) được định liều ở 12,5 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày 1.
- ☐ Trong nhóm 3, eribulin được định liều ở 3,2 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày 1.
- ☐ Trong nhóm 4, MORAb-109 (DAR2) được định liều ở 25 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày 1.
- ☐ Trong nhóm 5, MORAb-109 (DAR2) được định liều ở 12,5 mg/kg, i.v., liều duy nhất vào ngày 1.
- ☐ Trong nhóm 6, MORAb-109 (DAR2) được định liều ở 12,5 mg/kg, i.v., các liều vào các ngày 1, 8, và 16.

[00387] Các khối u được đo và con chuột được cân hai lần một tuần trong suốt thời gian thí nghiệm. Ngày đầu tiên dùng liều là ngày 1, một ngày sau khi phân nhóm ngẫu nhiên (ngày 0).

19.2 Các kết quả

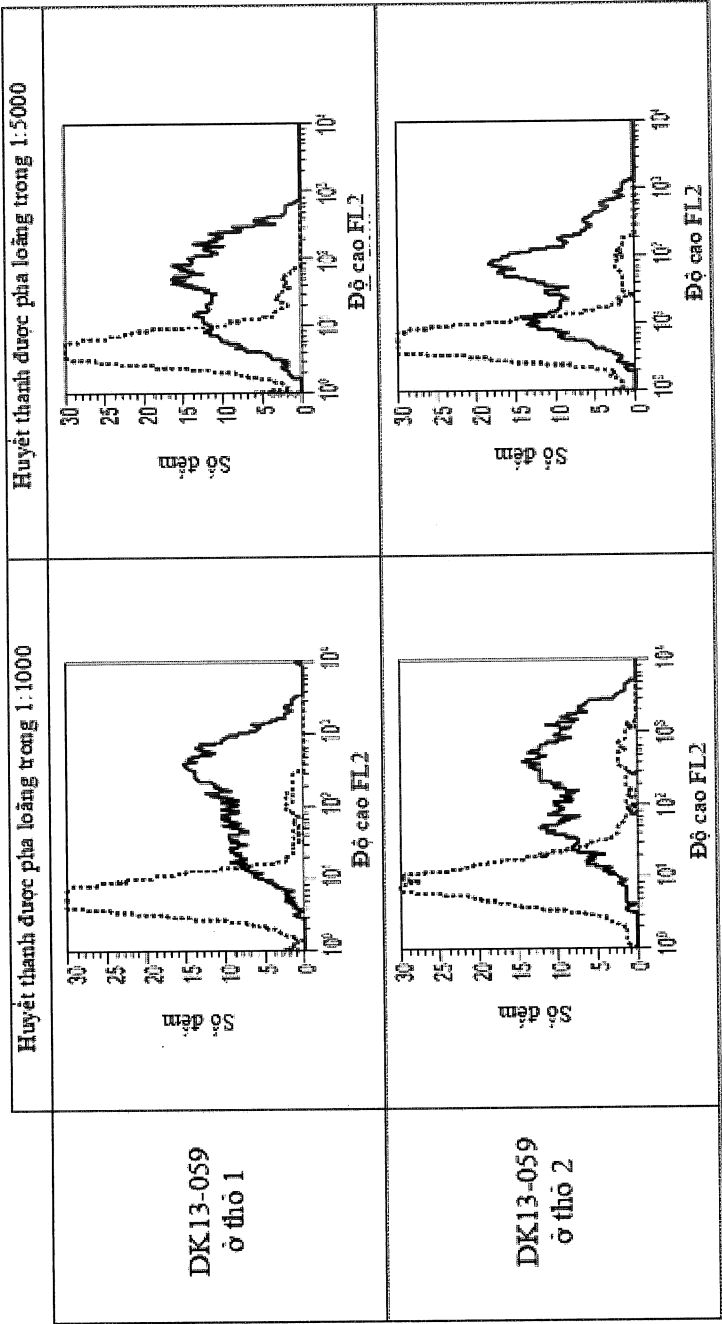
[00388] MORAb-109 (DAR2) chứng minh hiệu quả kháng khối u mạnh mẽ ở 12,5 và 25 mg/kg trong mô hình LXFL-529 NSCLC PDX (Hình 32A). MORAb-109 được cho ở liều duy nhất cũng được dung nạp tốt mà không bị giảm khối lượng cơ thể bởi chuột mang khối u LXFL-529. (Hình 32B).

[00389] Tuy nhiên, BAY 94-9343 (DAR ~ 4) ở mức 12,5 mg/kg (lượng mol tương đương của phụ tải DM4 dưới dạng lượng của phụ tải eribulin trong MORAb-109 ở 25 mg/kg) không chứng minh được hiệu quả kháng khối u (Hình 32A).

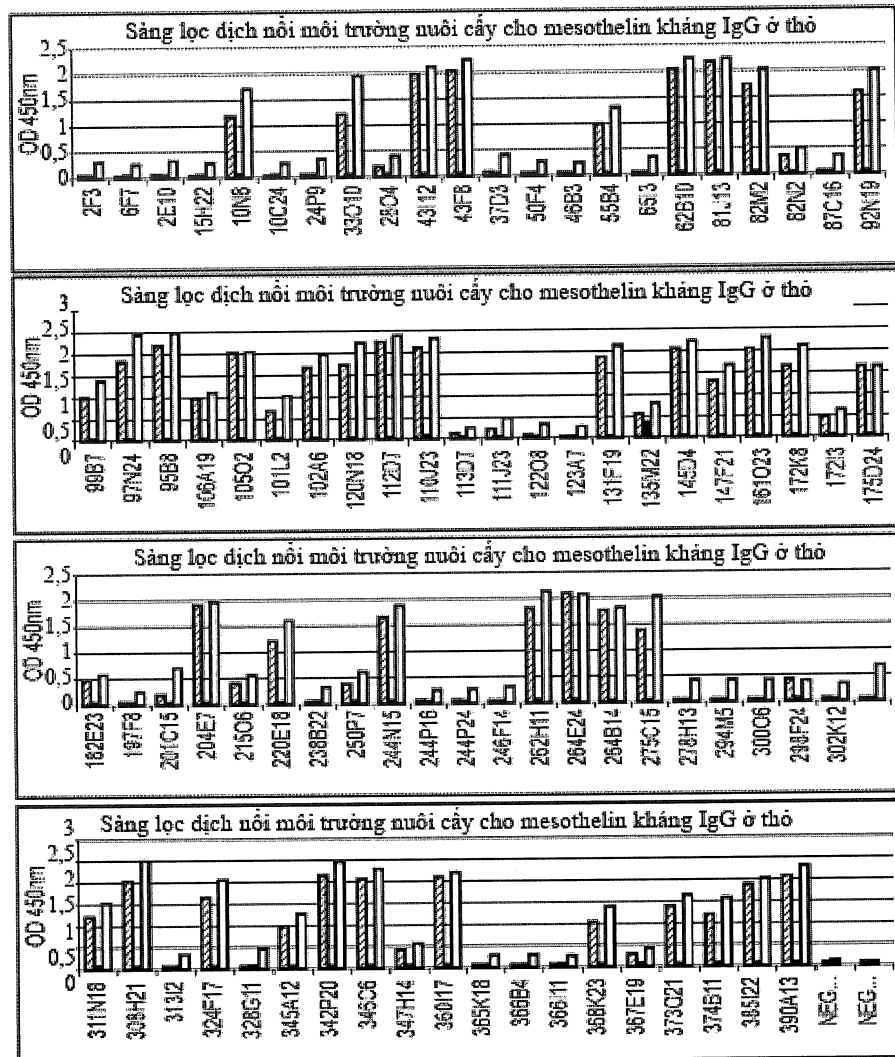
[00390] Eribulin được dùng với liều duy nhất 3,2 mg/kg (liều dùng MTD ở chuột) bằng đường tĩnh mạch được dung nạp tốt bởi chuột mang khối u LXFL-529 và cho thấy hiệu quả chống khối u. Tuy nhiên, eribulin gây giảm khối lượng cơ thể nhẹ và tạm thời sau khi dùng (Hình 32A và Hình 32B).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được phân lập, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có khả năng gắn với mesothelin và bao gồm các vùng xác định bổ sung chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2), và SEQ ID NO: 3 (HCDR3); và các vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2), và SEQ ID NO: 6 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc các vùng xác định bổ sung chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2), và SEQ ID NO: 9 (HCDR3); và các vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin có SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2), và SEQ ID NO: 12 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT.
2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 14.
3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 17, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18.
4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được liên hợp với tác nhân trị liệu.
5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 4, trong đó tác nhân trị liệu là eribulin.
6. Dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, và chất mang dược dụng.



Hình 1



Hình 2

	Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Chuoi nặng																	
Chuoi nhẹ																	
	Kb	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Chuoi nặng																	
Chuoi nhẹ																	
	Lân	Dòng	Lân	Dòng	Lân	Dòng	Lân	Dòng	Lân	Dòng	Lân	Dòng	Lân	Dòng	Lân	Dòng	
1	2012_10N6	9	2012_106A19	17	2012_172K8	25	2012_311N16	33	Đối chứng âm								
2	2012_33O10	10	2012_105O2	18	2012_172I3	26	2012_308H21										
3	2012_43I12	11	2012_110J23	19	2012_175D24	27	2012_324F17										
4	2012_55B4	12	2012_111J23	20	2012_176J15	28	2012_345A12										
5	2012_62B10	13	2012_131F19	21	2012_204E7	29	2012_346C8										
6	2012_82M2	14	2012_145D4	22	2012_215O6	30	2012_347H14										
7	2012_89B7	15	2012_147F21	23	2012_264B14	31	2012_360I17										
8	2012_95B8	16	2012_101L2	24	2012_300O6	32	2012_390A13										
	Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Chuoi nặng																	
Chuoi nhẹ																	
	Kb	17	18	19	20	21											
Chuoi nặng																	
Chuoi nhẹ																	
	Lân	Mẫu	Lân	Mẫu	Lân	Mẫu											
1	2012_28O4	9	2012_112D7	17	2012_368K23												
2	2012_43F8	10	2012_201C15	18	2012_367E19												
3	2012_82N2	11	2012_238B22	19	2012_373O21												
4	2012_92N19	12	2012_250P7	20	2012_385I22												
5	2012_97N24	13	2012_246F14	21	Đối chứng âm												
6	2012_161O23	14	2012_262H11														
7	2012_102A5	15	2012_264E24														
8	2012_120N18	16	2012_342P20														

Hình 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2012_1048 HC	2012_1048 LC	2012_106 A19-HC	2012_106 A19-LC	2012_172 K8-HC	2012_172 K8-LC	2012_311 M18-HC	2012_311 M18-LC	2012_28 O4-HC	2012_28 O4-LC	2012_11 2D7-HC	2012_11 2D7-LC
B	2012_3301 B-HC	2012_3301 B-LC	2012_105 O2-HC	2012_105 O2-LC	2012_172 B3-HC	2012_172 B3-LC	2012_308 H21-HC	2012_308 H21-LC	2012_4358 -HC	2012_4358 -LC	2012_201 C15-HC	2012_201 C15-LC
C	2012_431 C12-HC	2012_431 C12-LC	2012_110 J23-HC	2012_110 J23-LC	2012_175 B24-HC	2012_175 B24-LC	2012_324 F17-HC	2012_324 F17-LC	2012_8242 -HC	2012_8242 -LC	2012_238 B22-HC	2012_238 B22-LC
D	2012_5584 HC	2012_5584 LC	2012_131 J23-HC	2012_131 J23-LC	2012_178 J16-HC	2012_178 J16-LC	2012_345 A12-HC	2012_345 A12-LC	2012_92N 19-HC	2012_92N 19-LC	2012_250 P7-HC	2012_250 P7-LC
E	2012_628 E10-HC	2012_628 E10-LC	2012_131 F19-HC	2012_131 F19-LC	2012_204 E7-HC	2012_204 E7-LC	2012_346 C6-HC	2012_346 C6-LC	2012_97N 24-HC	2012_97N 24-LC	2012_248 F14-HC	2012_248 F14-LC
F	2012_82 F142-HC	2012_82 F142-LC	2012_145 D4-HC	2012_145 D4-LC	2012_215 O6-HC	2012_215 O6-LC	2012_347 H14-HC	2012_347 H14-LC	2012_161 Q23-HC	2012_161 Q23-LC	2012_252 H11-HC	2012_252 H11-LC
G	2012_99 G7-HC	2012_99 G7-LC	2012_147 F21-HC	2012_147 F21-LC	2012_264 B14-HC	2012_264 B14-LC	2012_369 H7-HC	2012_369 H7-LC	2012_102 A6-HC	2012_102 A6-LC	2012_254 E24-HC	2012_254 E24-LC
H	2012_95 H8-HC	2012_95 H8-LC	2012_101 L2-HC	2012_101 L2-LC	2012_300 C6-HC	2012_300 C6-LC	2012_390 A13-HC	2012_390 A13-LC	2012_120 N18-HC	2012_120 N18-LC	2012_342 P20-HC	2012_342 P20-LC

Hình 4

Giảng	Dòng	Tổng (g)
A1	2012_10N8	492,4
B1	2012_33C10	420,2
C1	2012_43I12	459,8
D1	2012_55B4	439,8
E1	2012_62B10	423,6
F1	2012_82M2	327,6
G1	2012_30B7	397
H1	2012_95B8	466,4
A2	2012_105A10	132,3
B2	2012_105C2	Quả thấp
C2	2012_110J23	521,8
D2	2012_111J23	Quả thấp
E2	2012_131F10	591
F2	2012_145D4	439,4
G2	2012_147F21	235,6
H2	2012_101L2	319,4
Giảng	Dòng	Tổng (g)
A3	2012_172A8	138,14
B3	2012_172I3	166,4
C3	2012_175D24	792,8
D3	2012_176J16	630
E3	2012_204E7	Quả thấp
F3	2012_215O8	246,6
G3	2012_264B14	1601,6
H3	2012_300O6	263,6
A4	2012_319N10	139,68
B4	2012_308A21	397,8
C4	2012_324F17	649,6
D4	2012_345A12	330,6
E4	2012_346O6	262,2
F4	2012_347H14	685,6
G4	2012_360I17	78,82
H4	2012_390A13	292,4
Giảng	Dòng	Tổng (g)
A5	2012_28O4	637,2
B5	2012_43F8	195,2
C5	2012_62M2	236,4
D5	2012_92N19	960,2
E5	2012_97N24	315,2
F5	2012_181O23	671
G5	2012_102A6	231,18
H5	2012_120N10	408,8
A6	2012_112D7	77,6
B6	2012_201C15	610
C6	2012_218B22	333,6
D6	2012_250P7	361,6
E6	2012_246F14	285,8
F6	2012_262H11	282,4
G6	2012_264E24	288,8
H6	2012_342P20	341,4

Hình 5

		GVGAR3		A431-K5		A431	
		EC50 (μ)	Tiến triển tại đầu (%)	EC50 (μ)	Tiến triển tại đầu (%)	EC50 (μ)	Tiến triển tại đầu (%)
2012_10N6	A1	5.21E-08	95.5	7.65E-08	82.4	-5.350e-008	32.9
2012_30N10	B1	2.27E-08	94.6	1.91E-08	76.7	-2.319e-007	21.3
2012_40N12	C1	2.42E-08	91.8	1.301E-08	80.7	-1.582e-006	45.6
2012_55B4	D1	2.92E-09	94.1	7.01E-10	69.0	-4.604e-006	21.9
2012_62B10	E1	3.67E-09	96.3	5.75E-10	85.5	-3.956e-008	26.3
2012_62U2	F1	1.64E-08	89.1	8.47E-10	77.3	-4.329e-007	16.4
2012_99E7	G1	4.97E-08	89.3	2.46E-08	79.4	-6.102e-007	49.8
2012_93E8	H1	4.15E-08	87.5	1.74E-08	77.5	-1.411e-007	34.0
2012_108A19	A2	7.85E-10	87.8	1.06E-08	74.5	-2.508e-005	18.4
2012_108O2	B2	1.97E-08	88.6	-0.00E+00	77.5	-1.004e-005	30.3
2012_110J23	C2	5.91E-08	85.3	4.27E-08	76.0	-3.027e-008	21.1
2012_111J23	D2	9.65E-09	85.7	-1.94E-008	80.4	-7.756e-007	13.3
2012_131F18	E2	6.84E-08	84.4	9.00E-10	79.9	-7.986e-007	22.9
2012_145D4	F2	4.89E-09	84.0	1.19E-08	80.7	-9.025e-007	21.9
2012_147F21	G2	4.91E-08	83.3	8.14E-09	84.2	-3.487e-006	30.7
2012_101L2	H2	1.06E-08	83.1	5.10E-09	77.3	-6.119e-008	23.6
2012_172K6	A3	7.74E-08	83.7	3.96E-09	84.6	-8.409e-008	15.9
2012_172J3	B3	7.24E-08	83.3	2.20E-08	81.3	-8.136e-008	22.8
2012_175O24	C3	6.61E-09	81.5	-2.570e-008	65.0	-6.037e-008	30.4
2012_176J16	D3	2.38E-08	78.4	9.17E-08	69.8	-8.135e-008	42.6
2012_204E7	E3	1.18E-08	88.5	-2.062e-008	63.5	-2.507e-008	8.6
2012_215O6	F3	-2.981e-011	87.7	1.407E-08	70.2	-8.772e-007	14.3
2012_264E14	G3	2.047E-08	85.9	1.78E-08	75.0	-3.977e-008	12.7
2012_300O6	H3	5.15E-09	85.2	1.507E-08	75.0	-8.050e-008	29.2
2012_311N18	A4	5.88E-08	83.6	6.931E-08	71.3	-7.831e-008	17.6

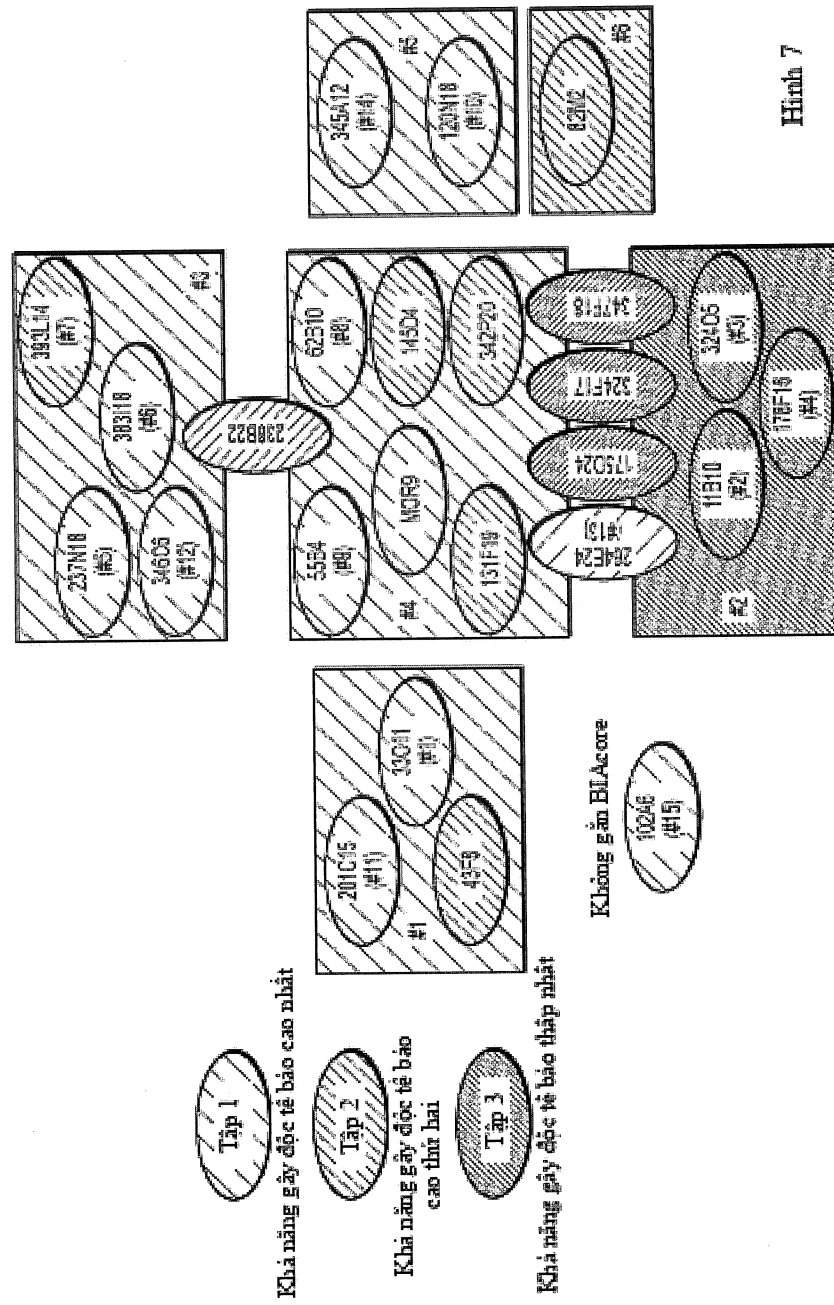
Tài Minh 6
(tiếp tục)

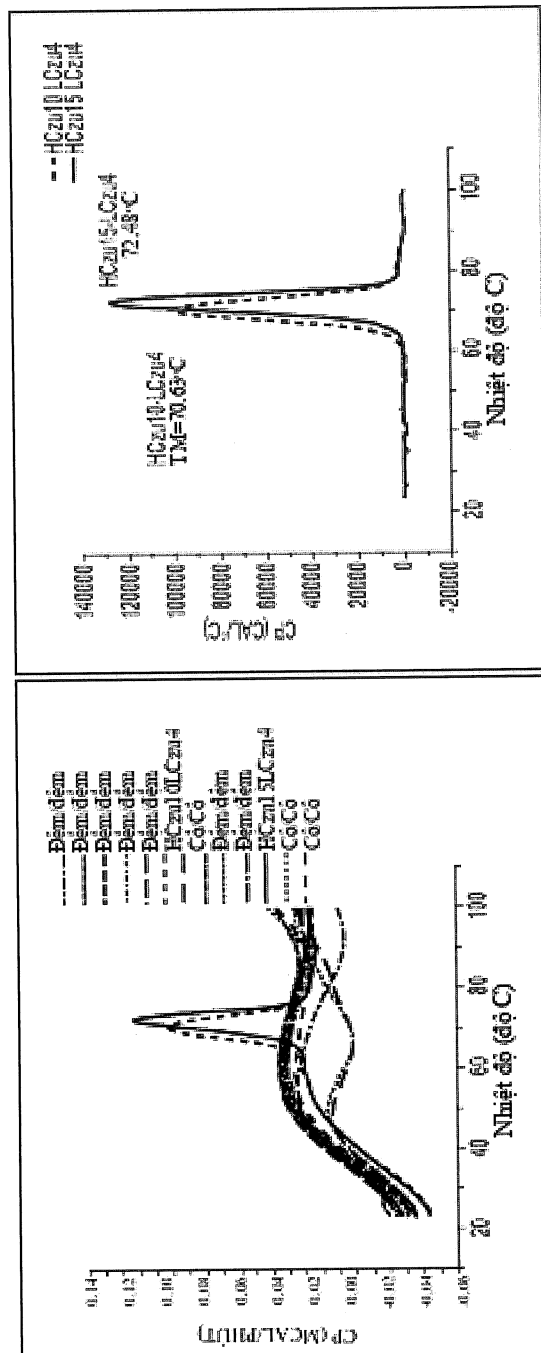
Hình 6

		ONCARO		AAS1-K5		AAS1	
		EC50 (nM)	Tỷ lệ diệt tế bào (%)	EC50 (nM)	Tỷ lệ diệt tế bào (%)	EC50 (nM)	Tỷ lệ diệt tế bào (%)
2012_303H21	B4	5.464E-09	84.2	-2.815E-008	61.5	-6.955E-008	14.2
2012_324H17	C4	8.897E-09	84.6	-2.467E-008	66.2	-2.356E-006	15.4
2012_345H12	D4	5.887E-09	87.3	1.468E-09	75.8	-8.451E-007	23.3
2012_346C6	E4	4.411E-09	86.2	6.677E-10	77.7	-1.985E-006	21.6
2012_347H14	F4	7.124E-09	88.3	1.669E-08	69.7	-6.963E-007	43.3
2012_360H17	G4	5.161E-09	89.7	3.79E-09	83.0	-5.143E-007	22.1
2012_360H13	H4	6.473E-09	87.5	2.004E-09	81.6	-5.892E-007	20.6
2012_280H	A5	3.674E-09	85.3	4.534E-09	83.2	-6.230E-007	33.4
2012_335H	B5	4.015E-09	85.7	1.078E-09	79.7	-2.064E-006	17.8
2012_324H2	C5	3.307E-09	80.8	8.358E-09	81.6	-1.550E-006	27.4
2012_92H19	D5	3.977E-10	89.6	4.74E-09	82.1	-3.785E-008	36.3
2012_97H24	E5	2.362E-09	88.3	1.215E-08	83.1	-3.773E-007	55.2
2012_161H23	F5	4.007E-09	87.5	3.466E-09	82.5	-3.752E-007	20.3
2012_102H6	G5	9.216E-11	89.5	4.243E-10	86.1	-6.315E-007	45.8
2012_123H18	H5	2.369E-09	84.6	6.646E-10	83.1	-1.582E-006	42.8
2012_112H7	A8	2.801E-09	80.2	-2.380E-008	74.1	-3.334E-008	21.4
2012_201H15	B8	3.54E-09	72.8	7.264E-10	80.3	-3.850E-007	23.4
2012_238H22	C6	4.566E-09	87.3	1.292E-09	82.6	-4.932E-008	22.6
2012_250H7	D6	1.066E-09	89.2	1.336E-08	75.0	-4.885E-007	20.8
2012_246H14	E6	3.866E-09	87.9	2.296E-09	78.6	-8.035E-007	32.7
2012_262H11	F6	1.89E-09	92.2	3.268E-09	86.2	-3.765E-008	33.2
2012_264H24	G6	3.762E-09	90.3	1.75E-10	83.0	-6.320E-008	39.0
2012_342H20	H6	1.252E-09	91.3	7.016E-10	83.0	-8.206E-008	25.0
	#1	-1.652E-0110	51.1	2.955E-10	78.9	-6.380E-008	34.0
	#2	-0.00000022	45.2	-3.878E-006	43.2	-2.823E-007	50.1

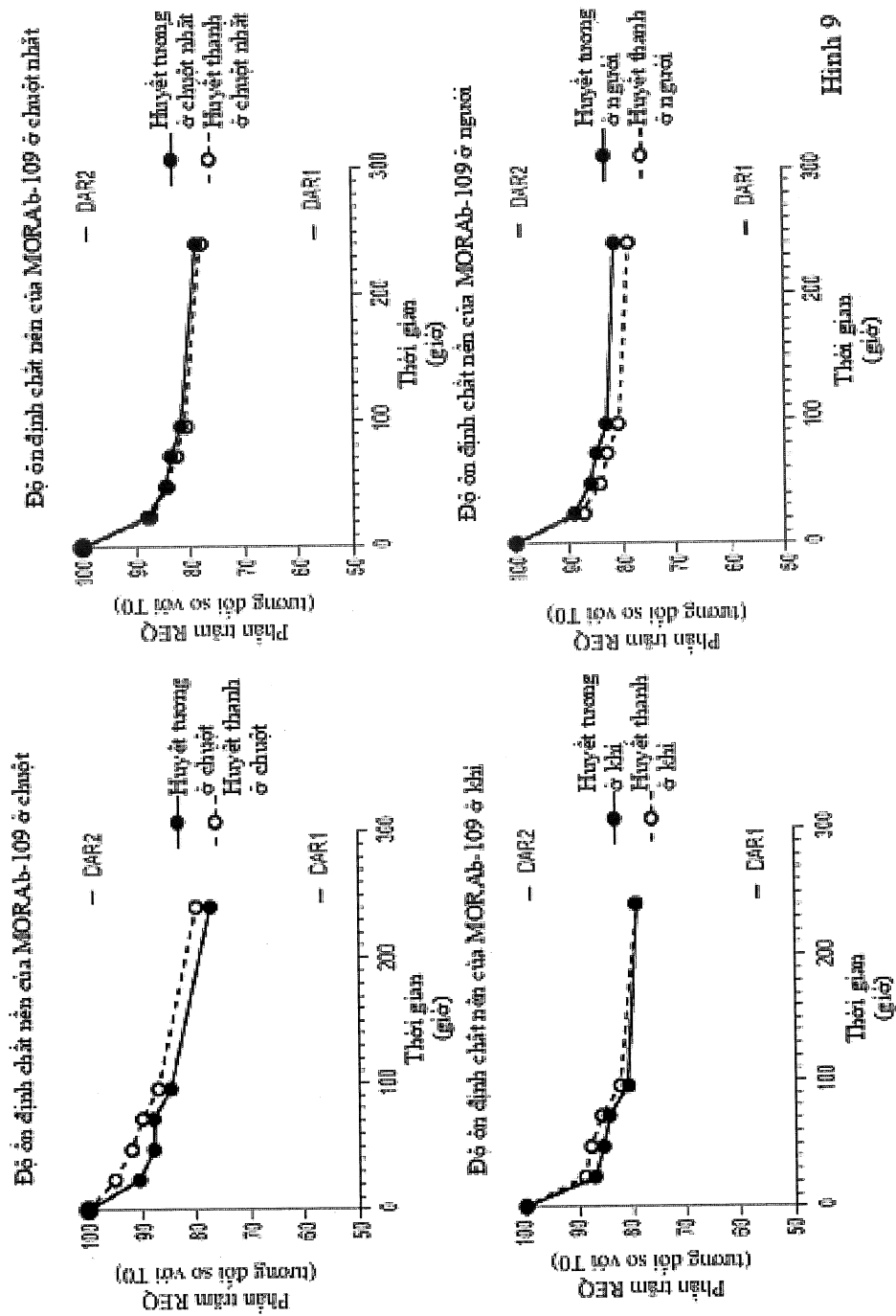
Từ Hình 6

Hình 6
(tiếp tục)

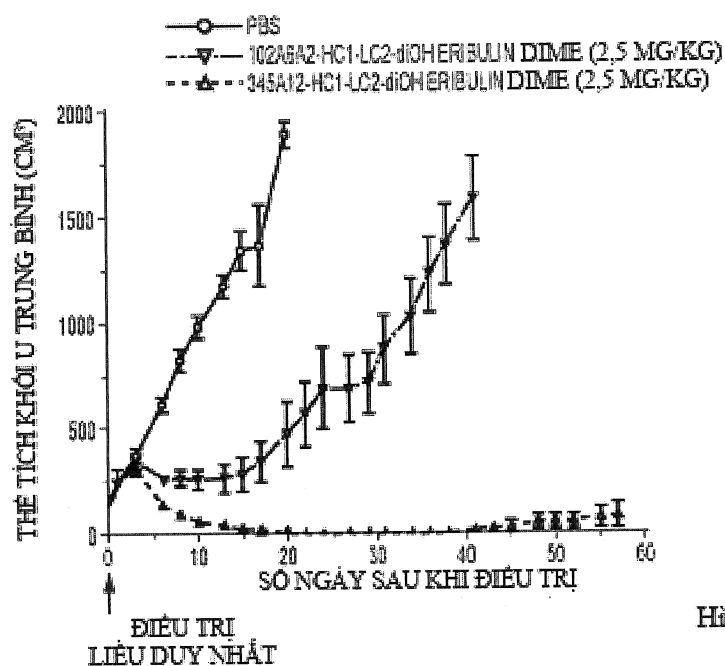




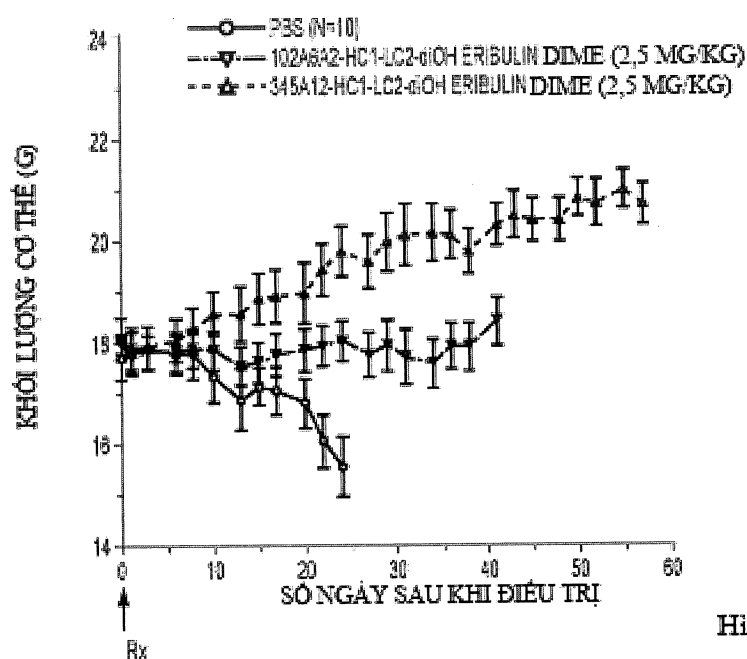
Hình 8



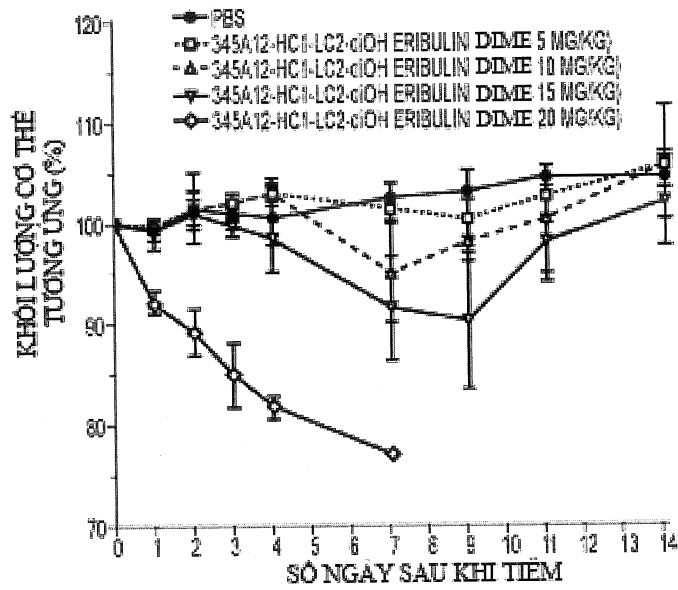
Hình 9



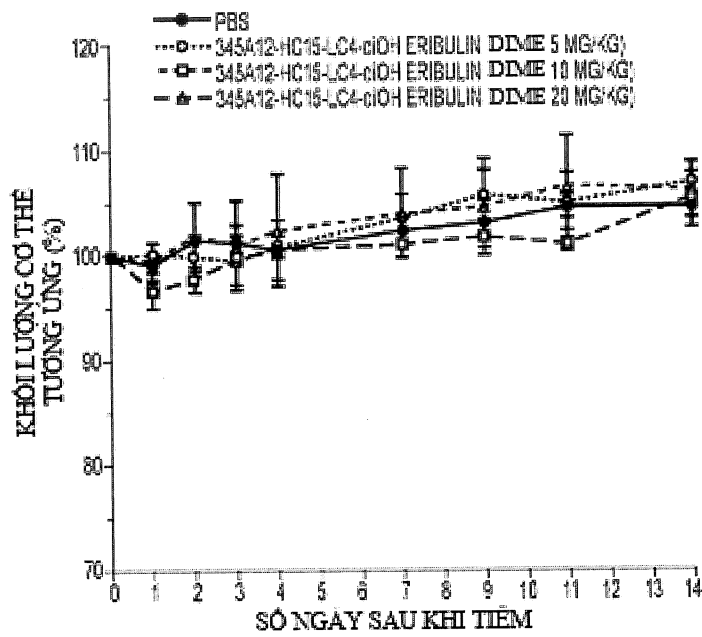
Hình 10A



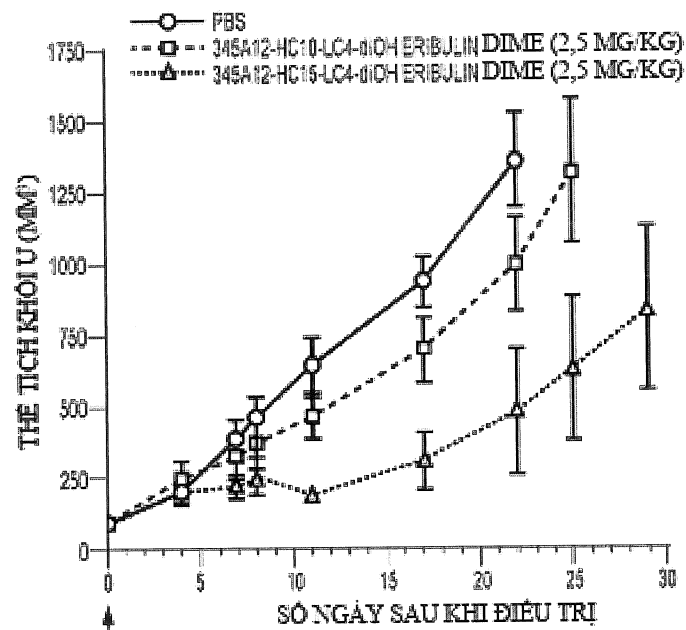
Hình 10B



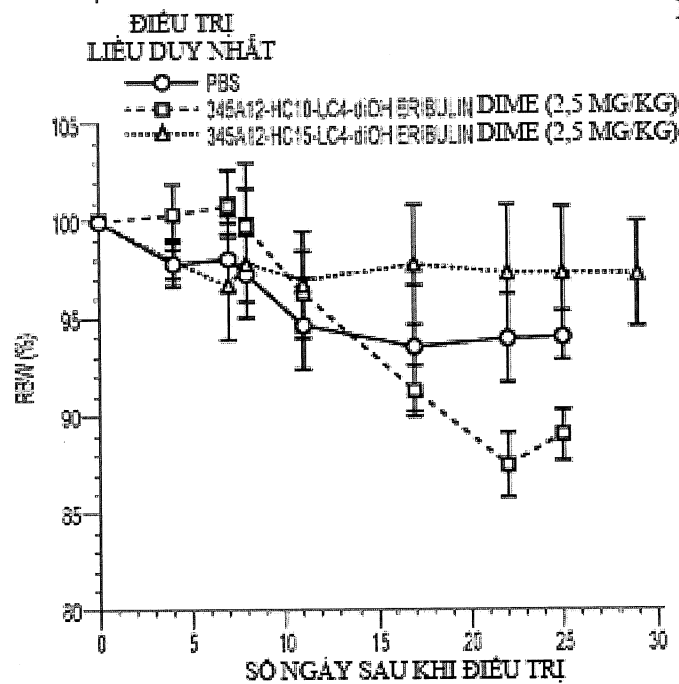
Hình 11A



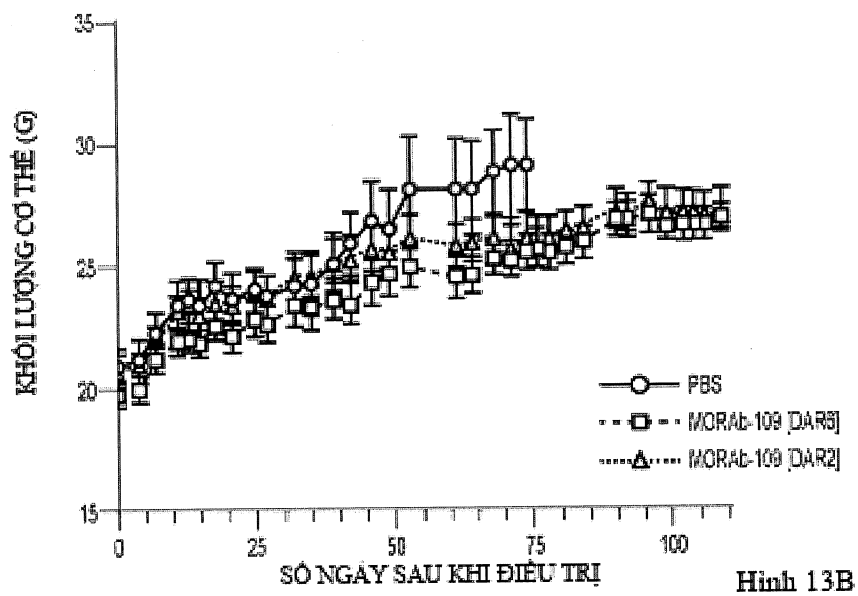
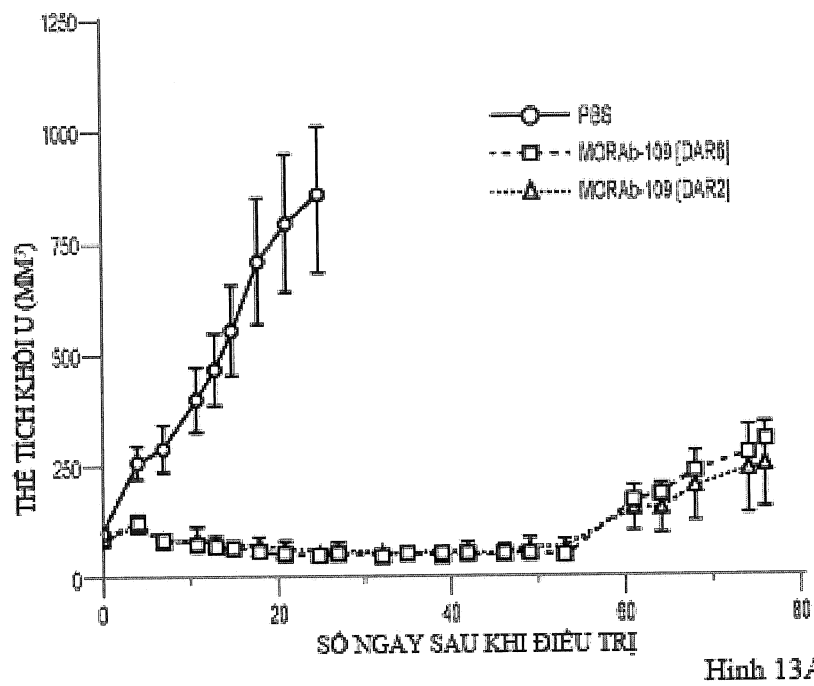
Hình 11B

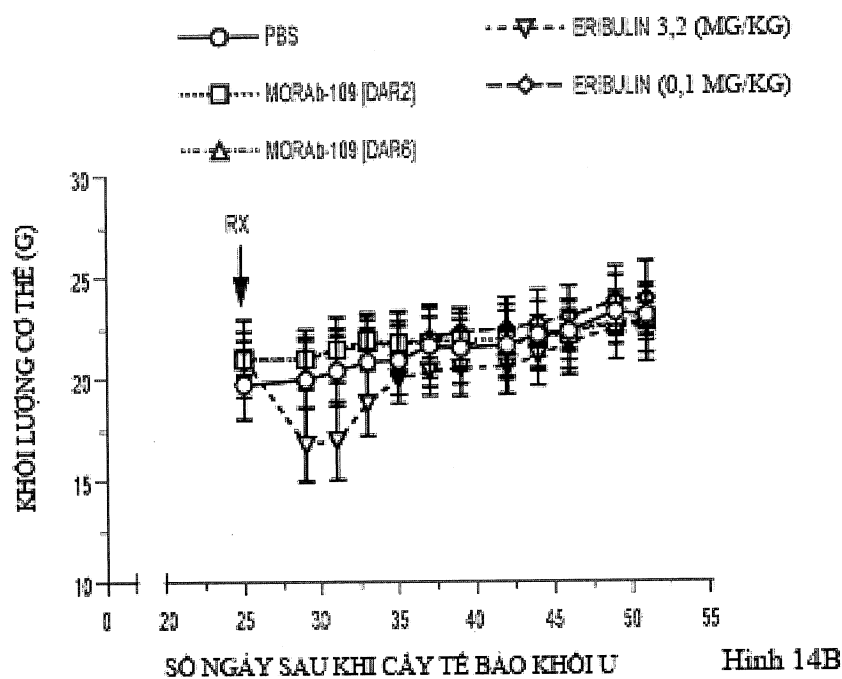
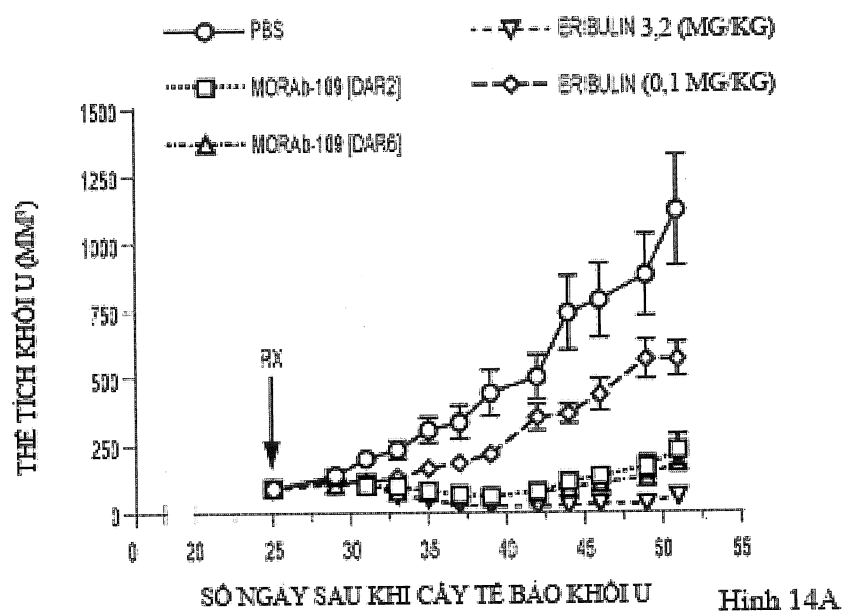


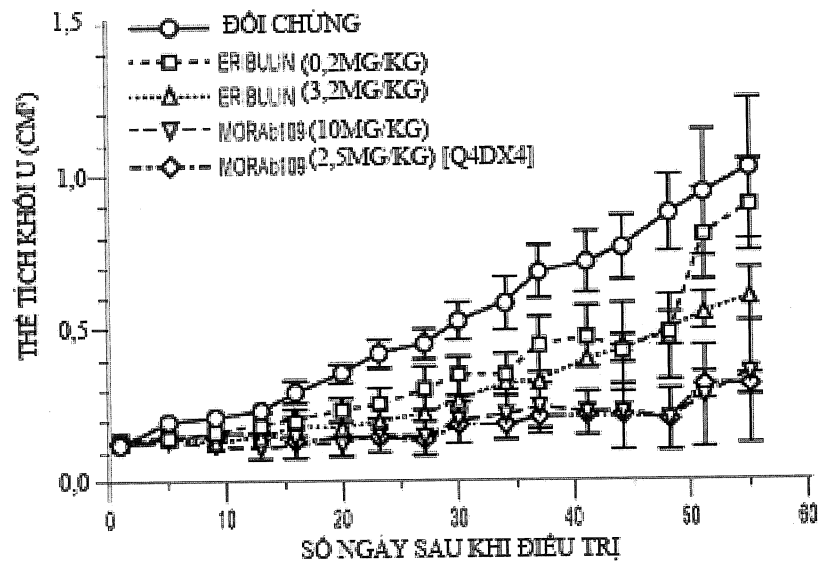
Hình 12A



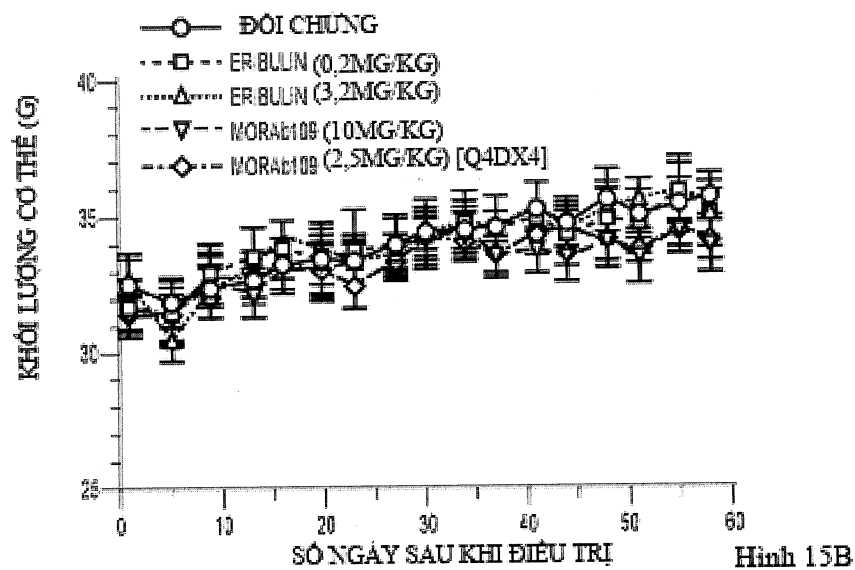
Hình 12B



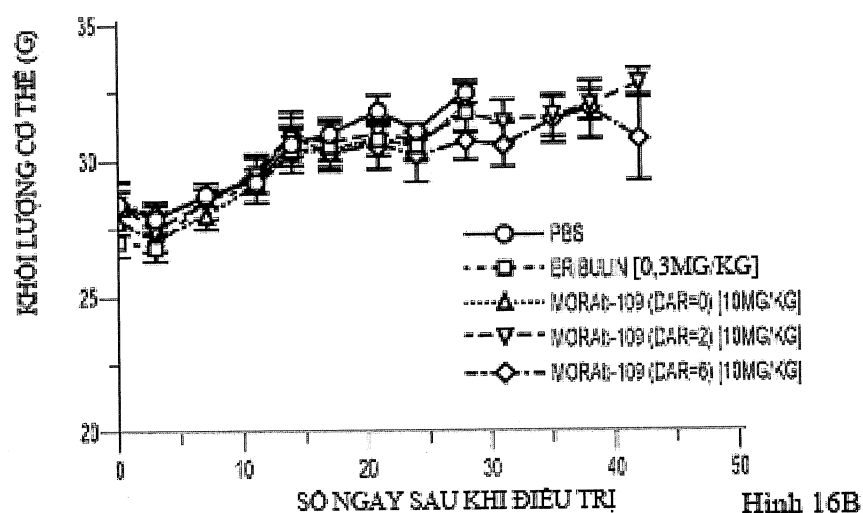
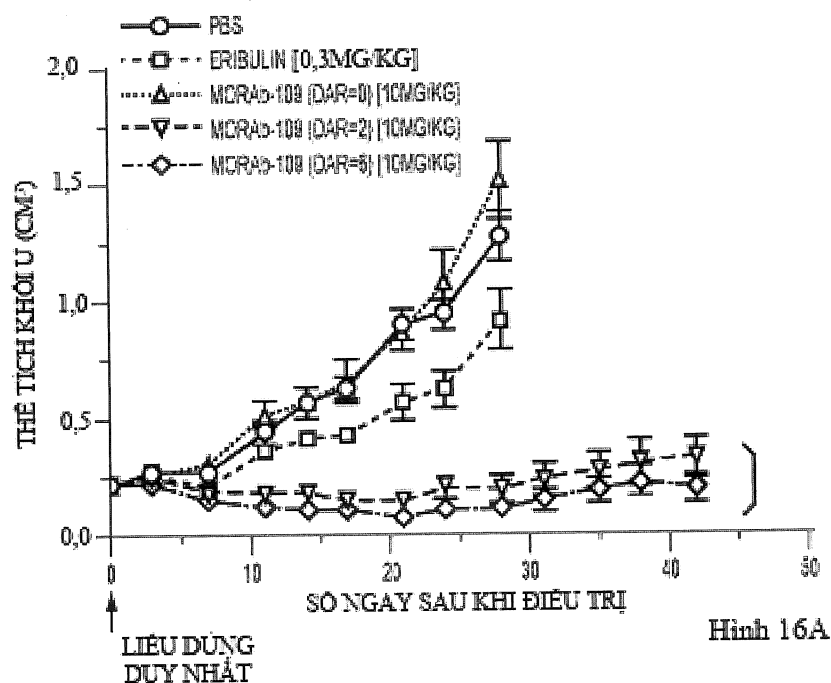


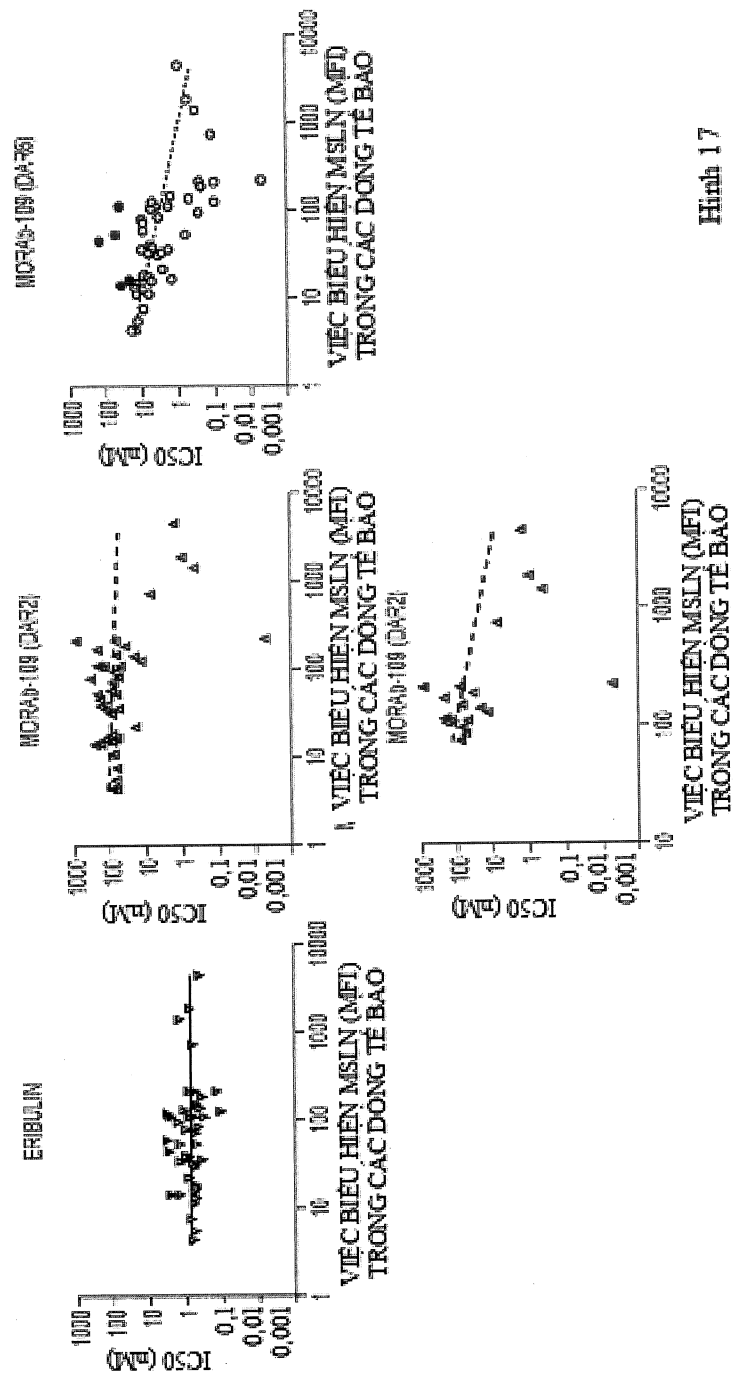


Hình 15A

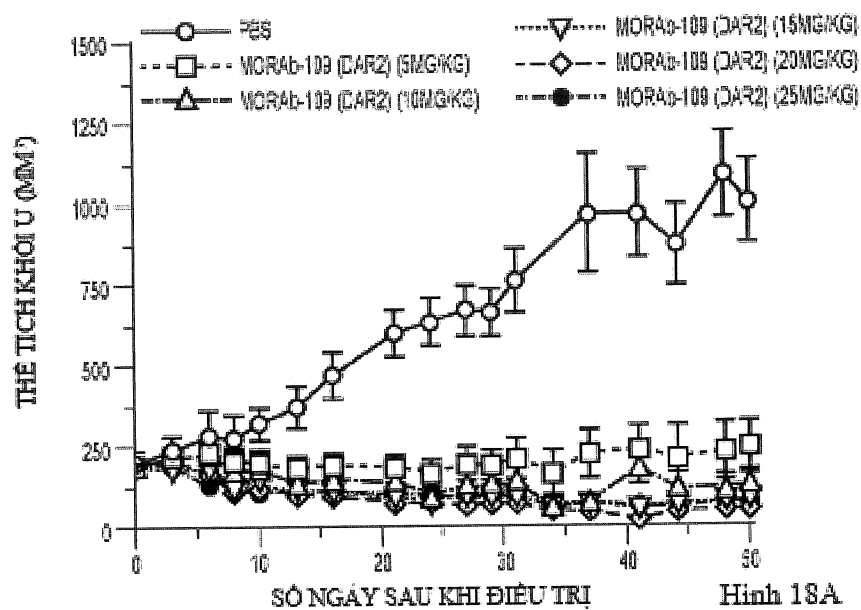


Hình 15B

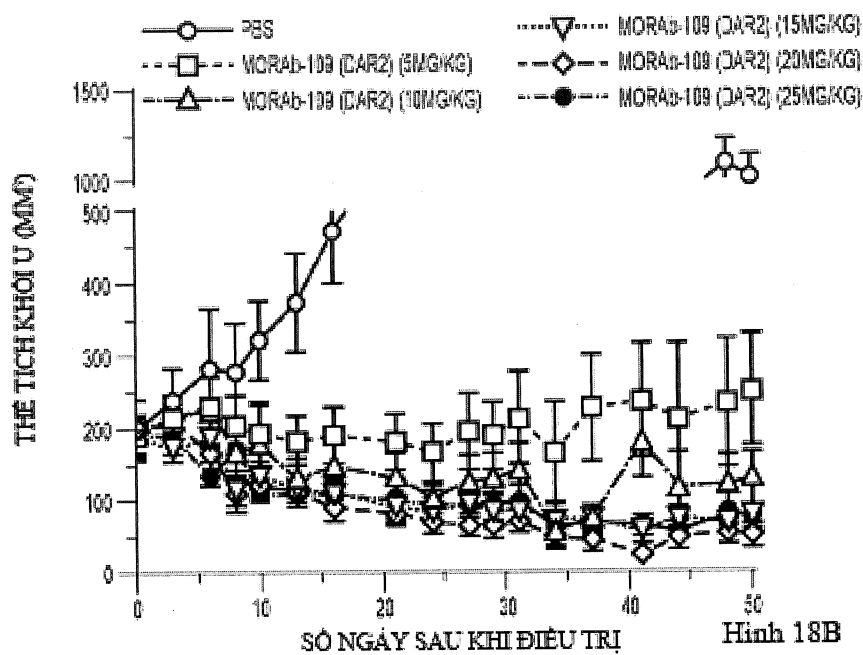




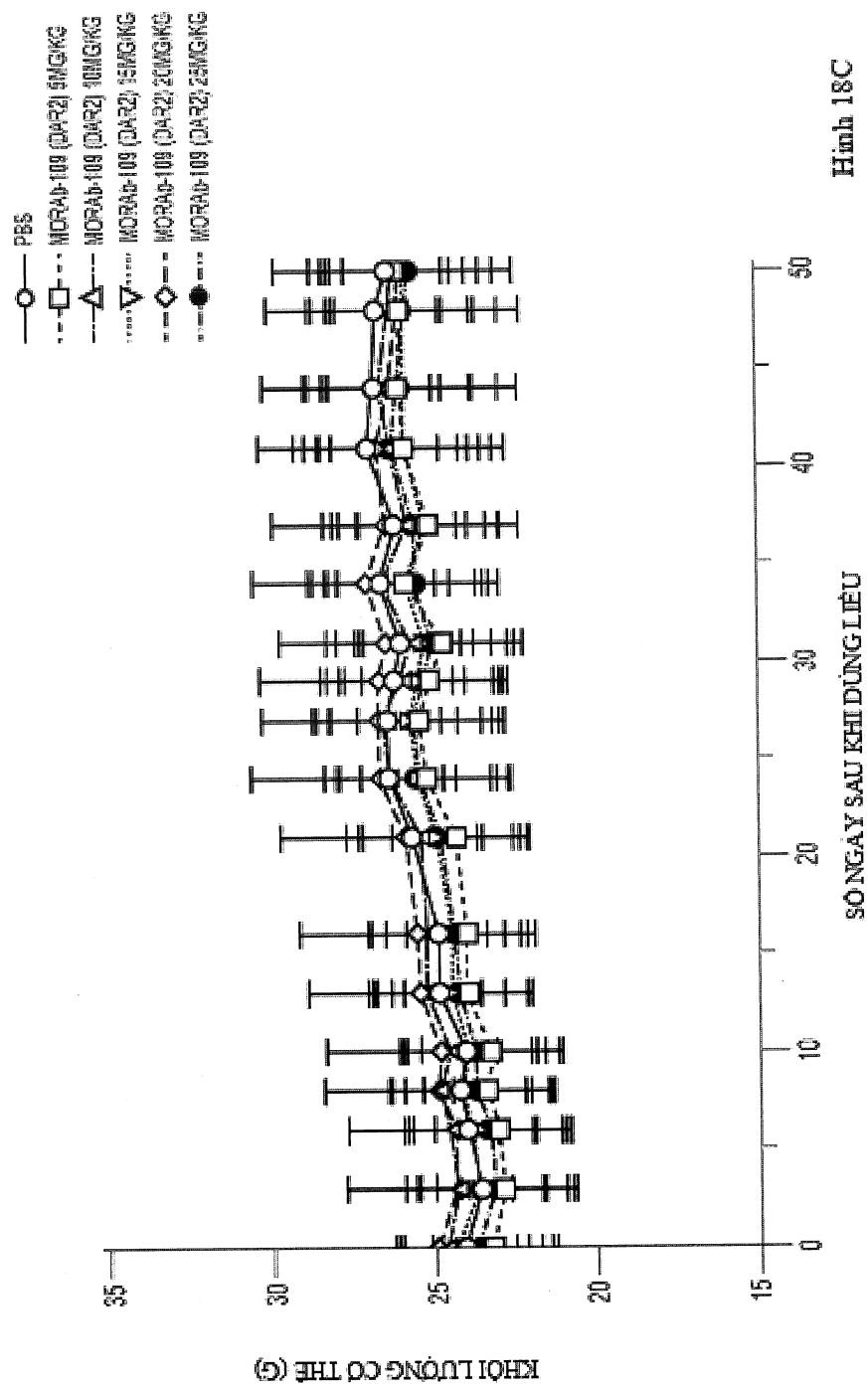
Hình 17

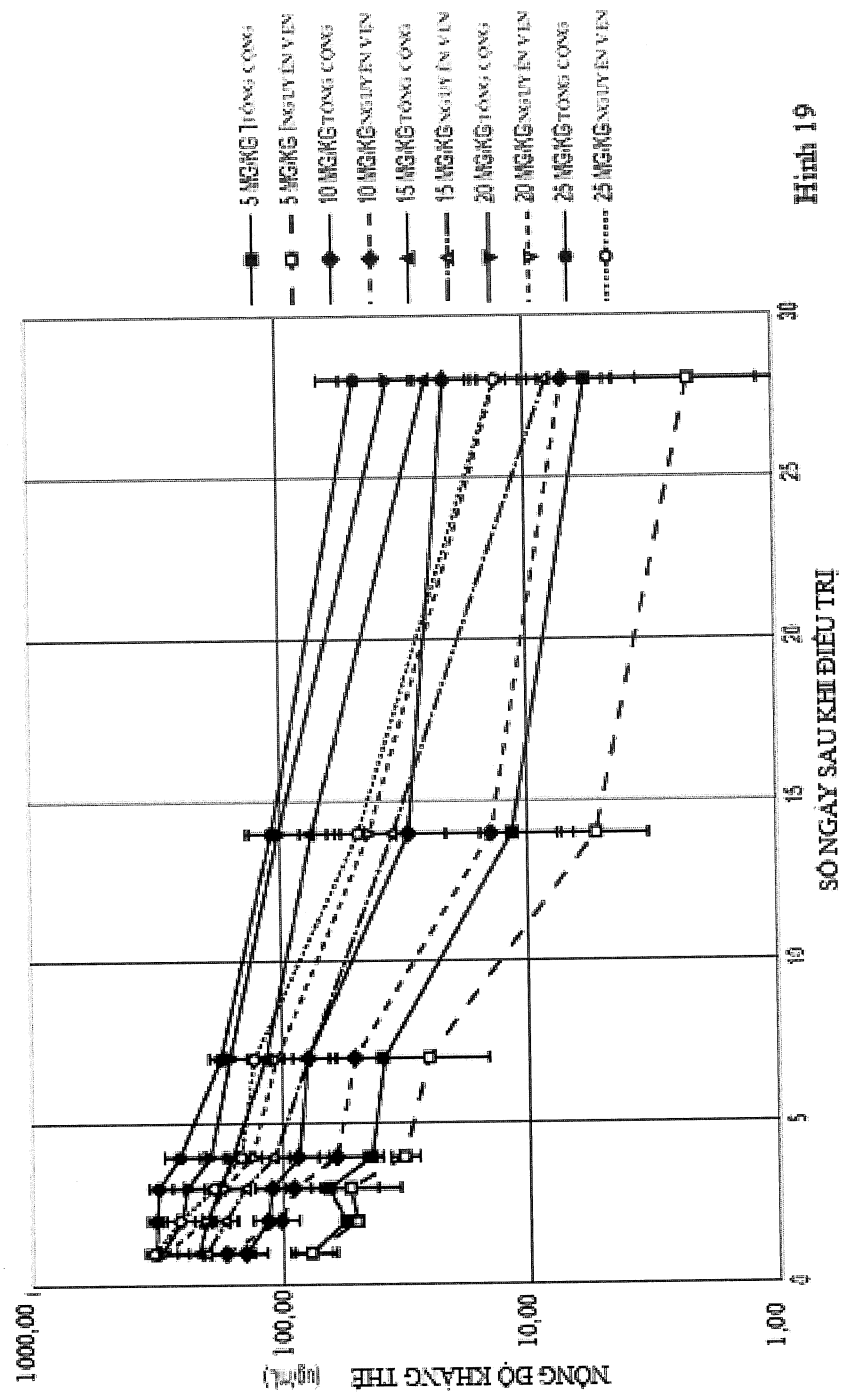


Hình 18A

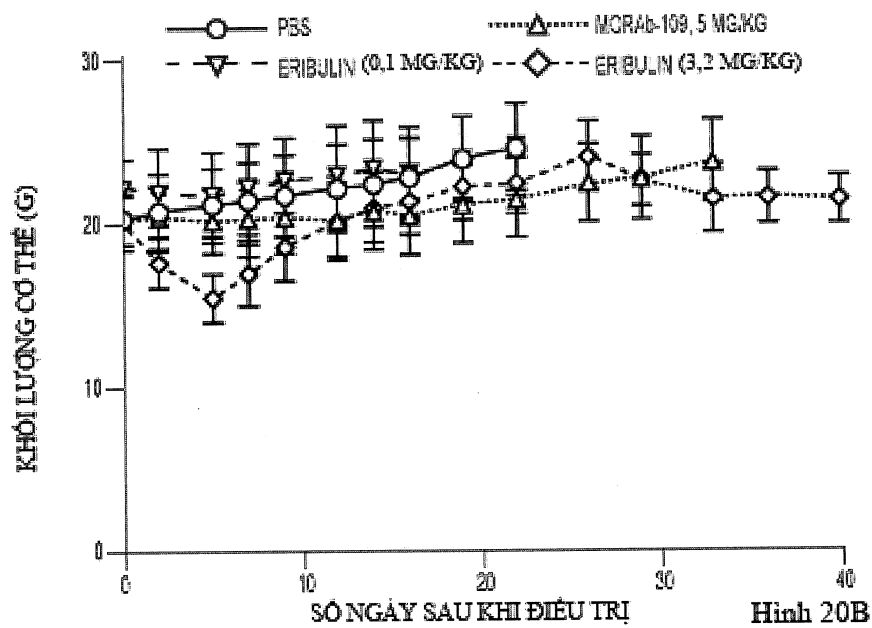
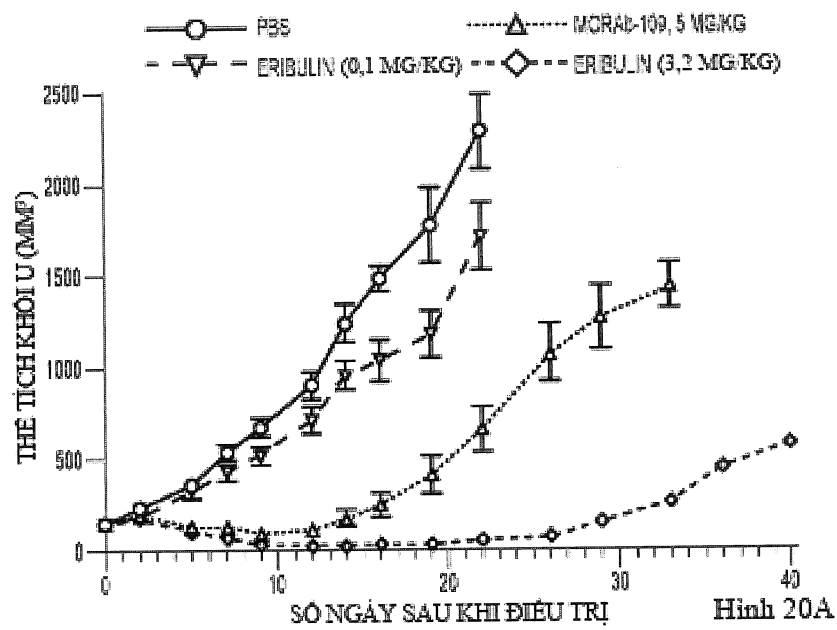


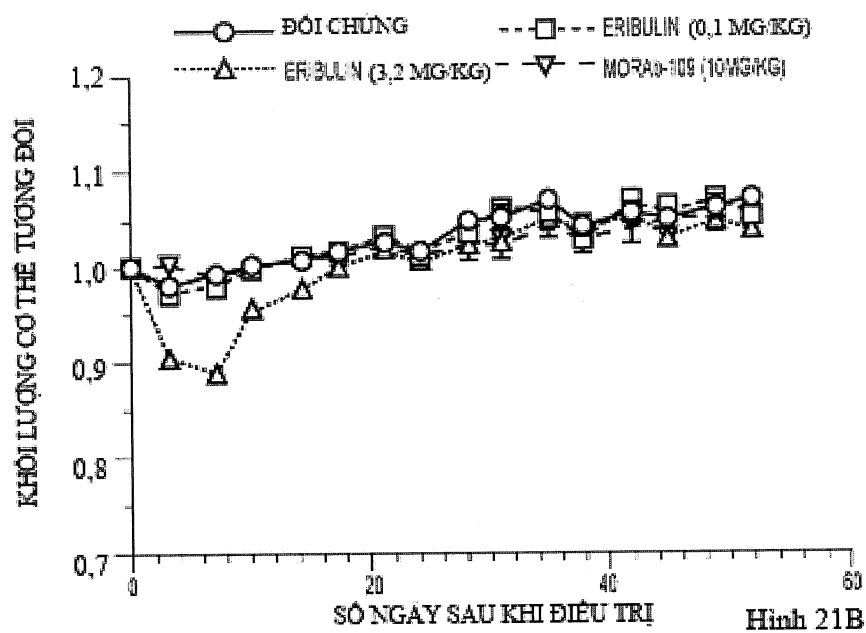
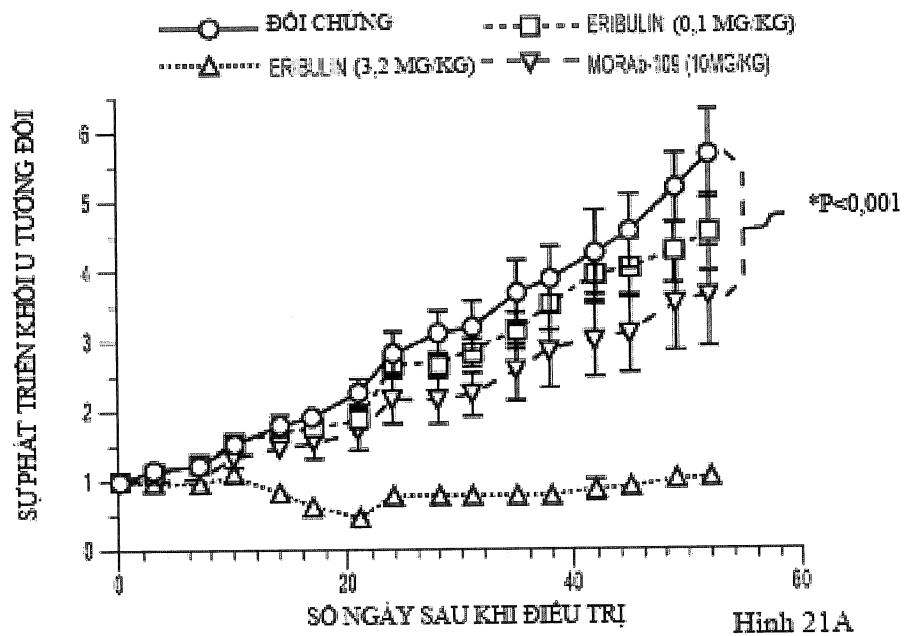
Hình 18B

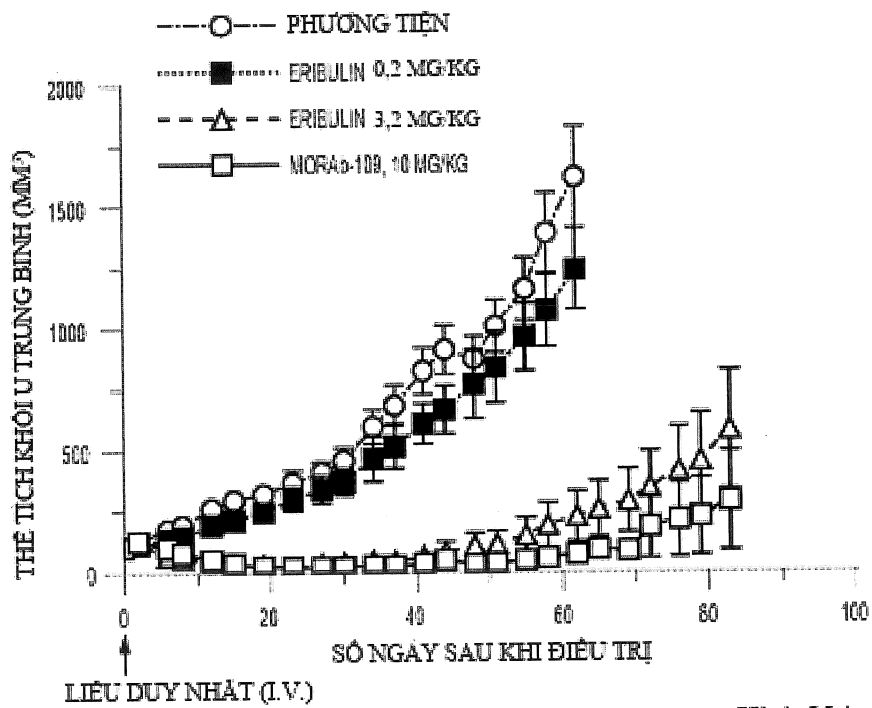




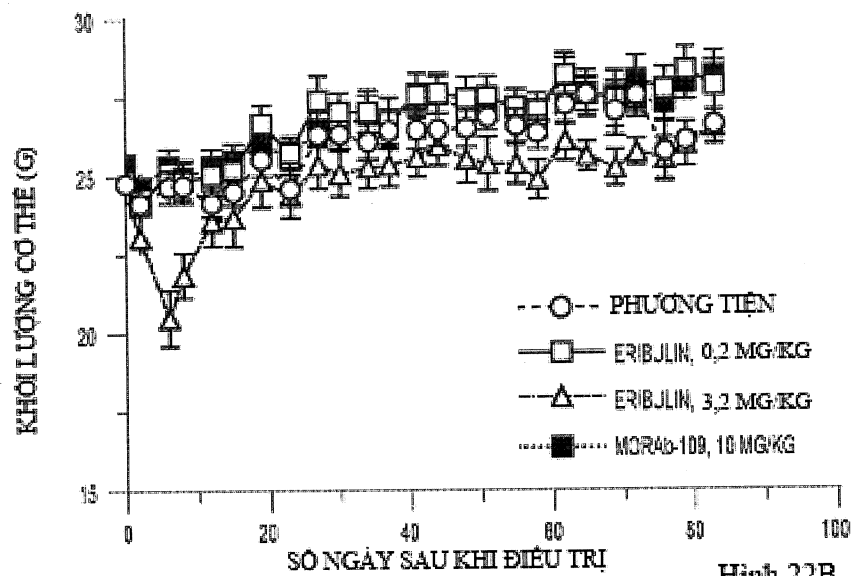
Hình 19



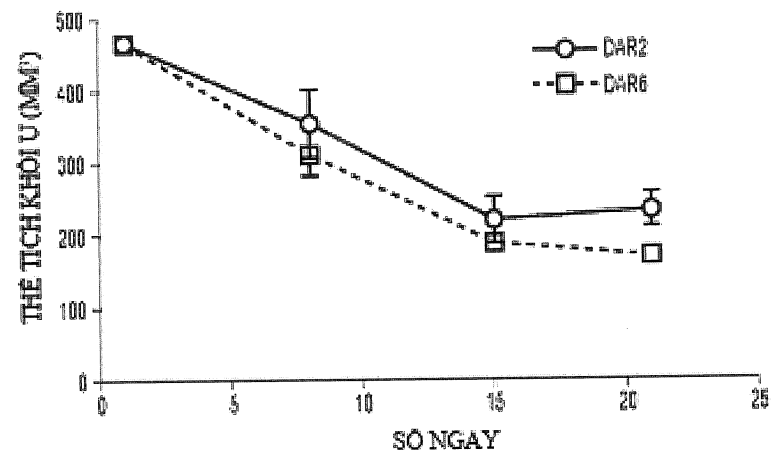




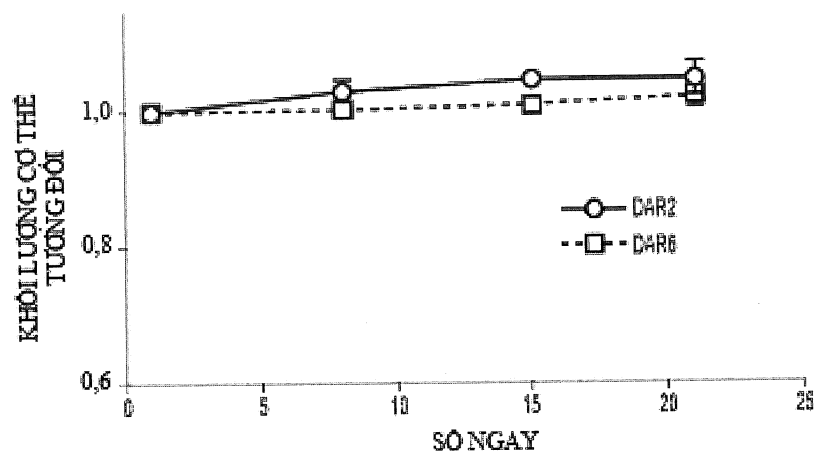
Hình 22A



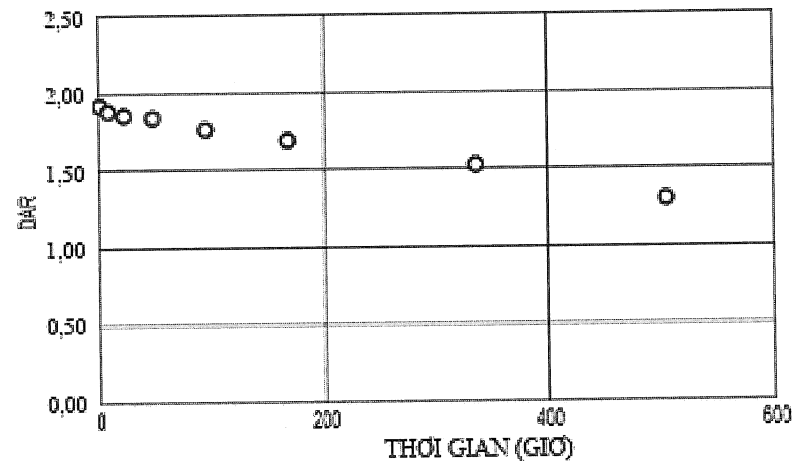
Hình 22B



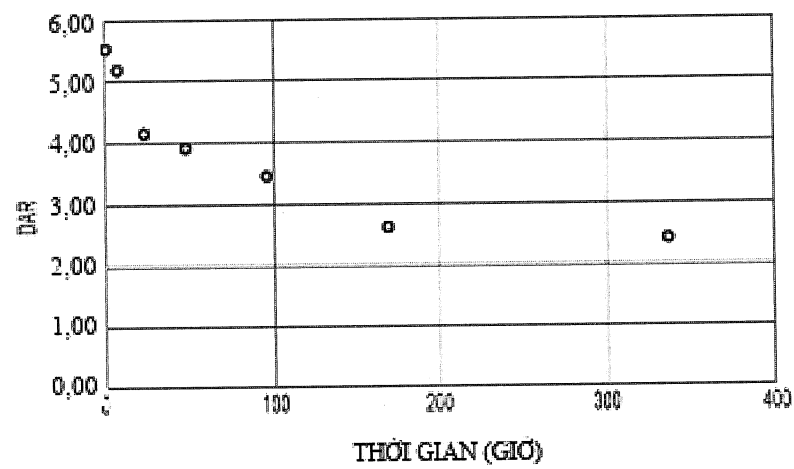
Hình 23A



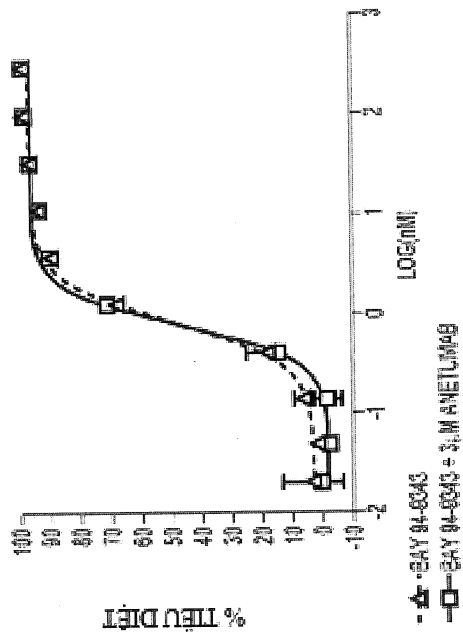
Hình 23B



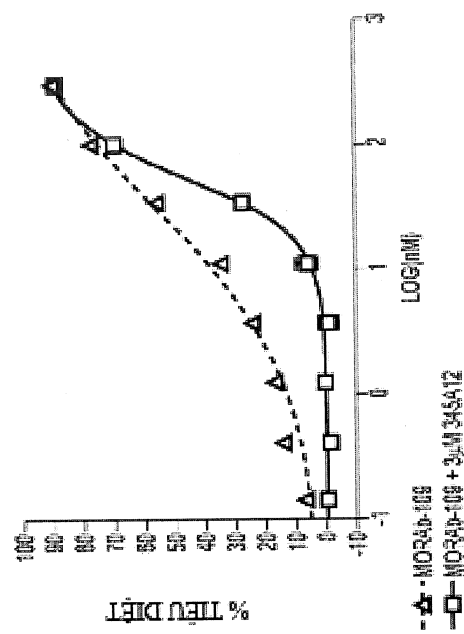
Hình 24A



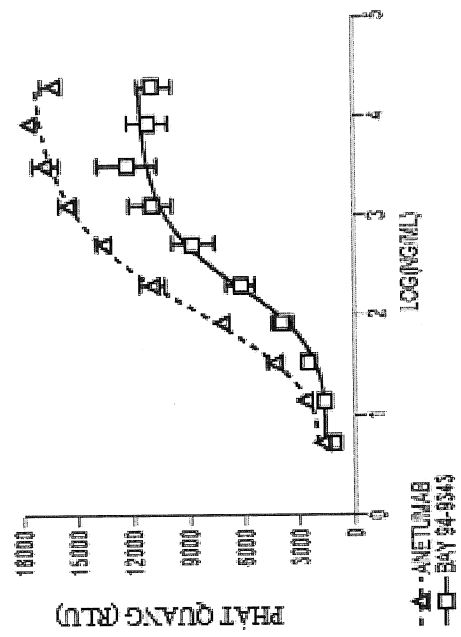
Hình 24B



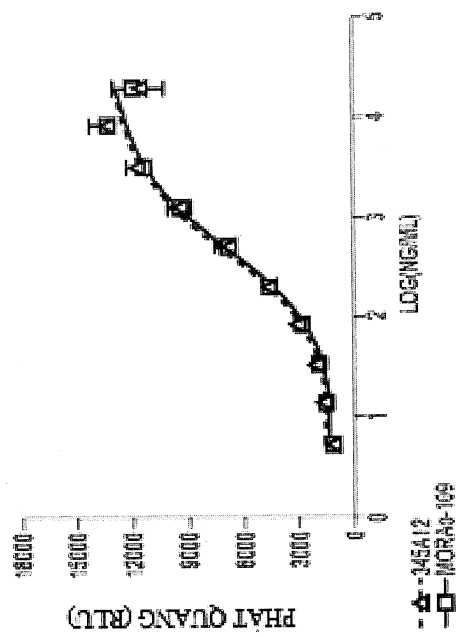
Hình 25B



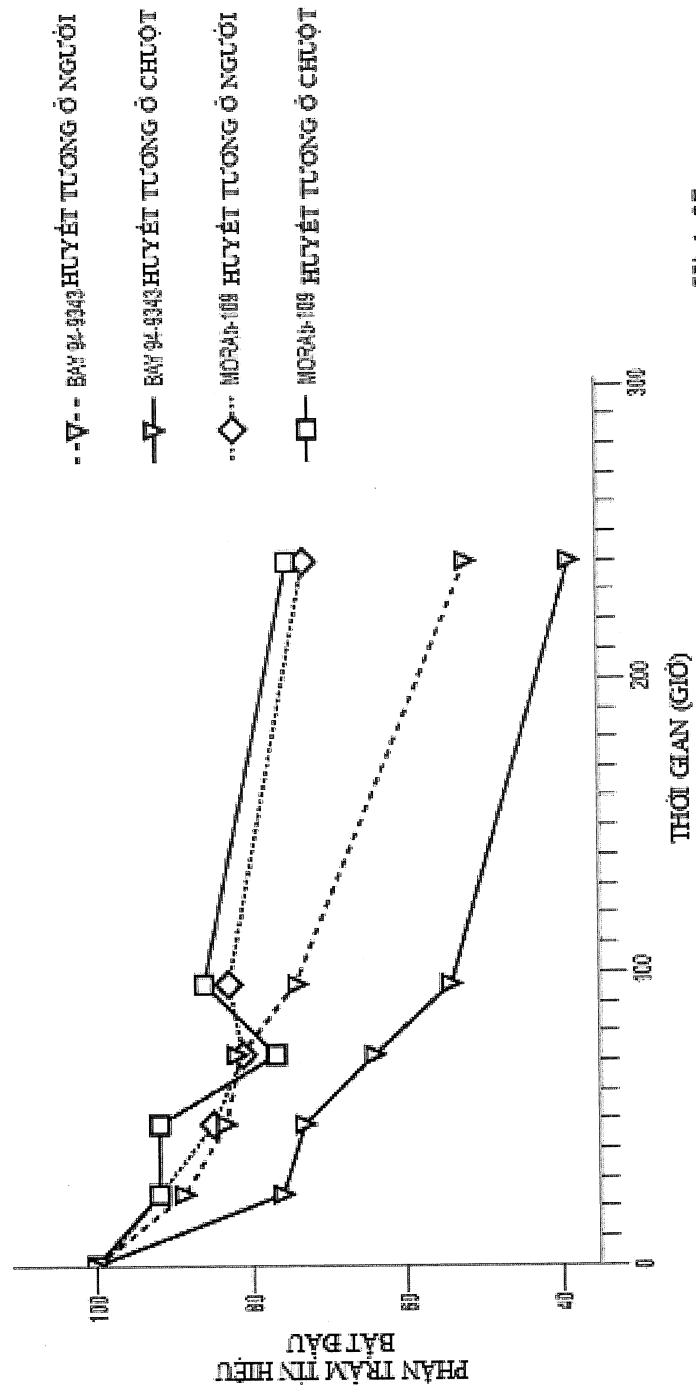
Hình 25A



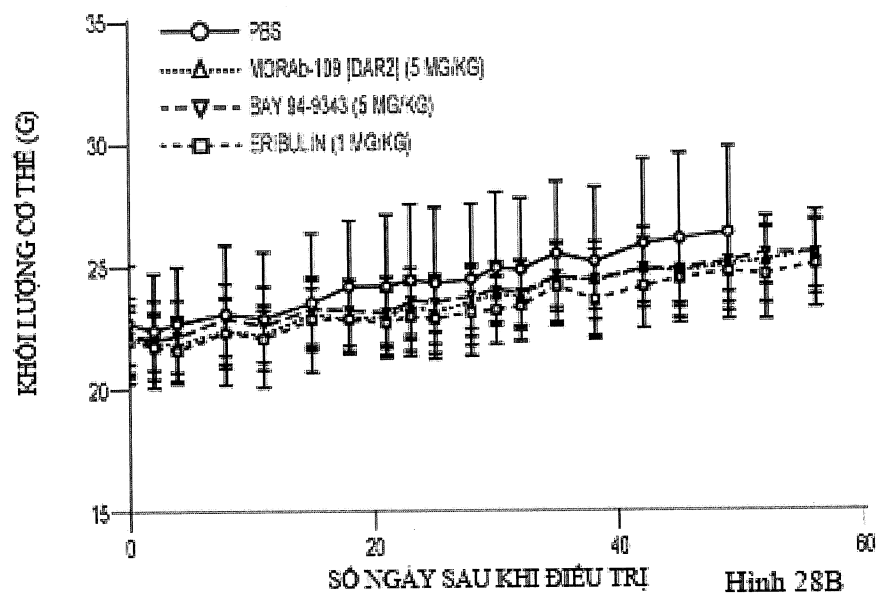
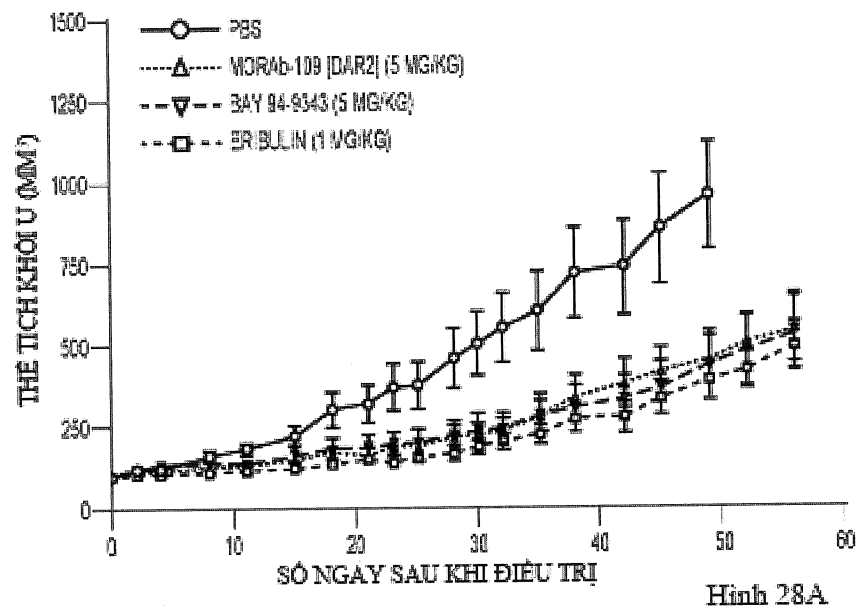
Hình 26B

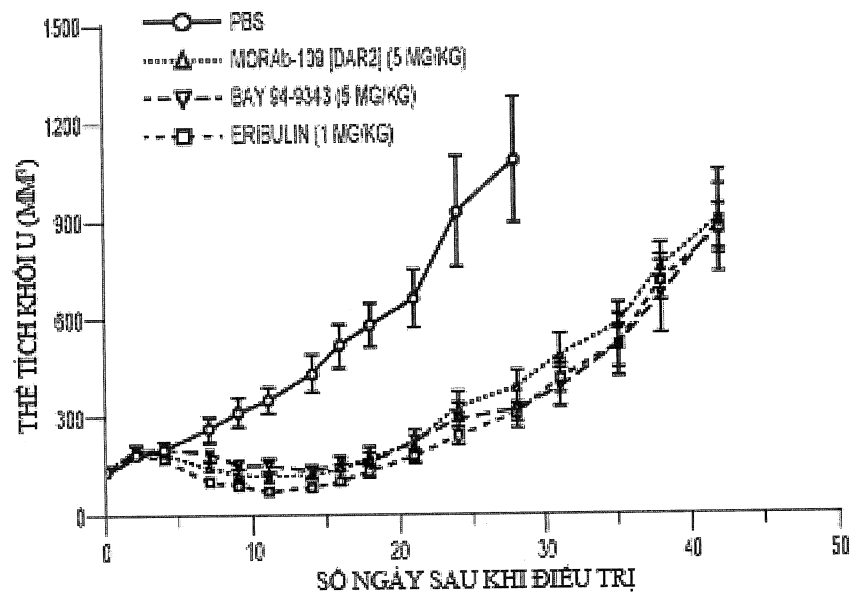


Hình 26A

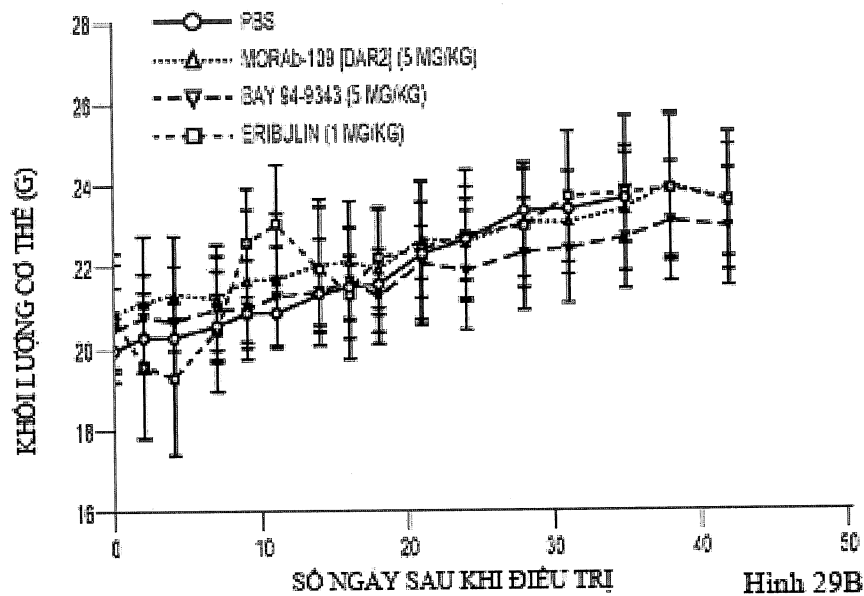


Hình 27

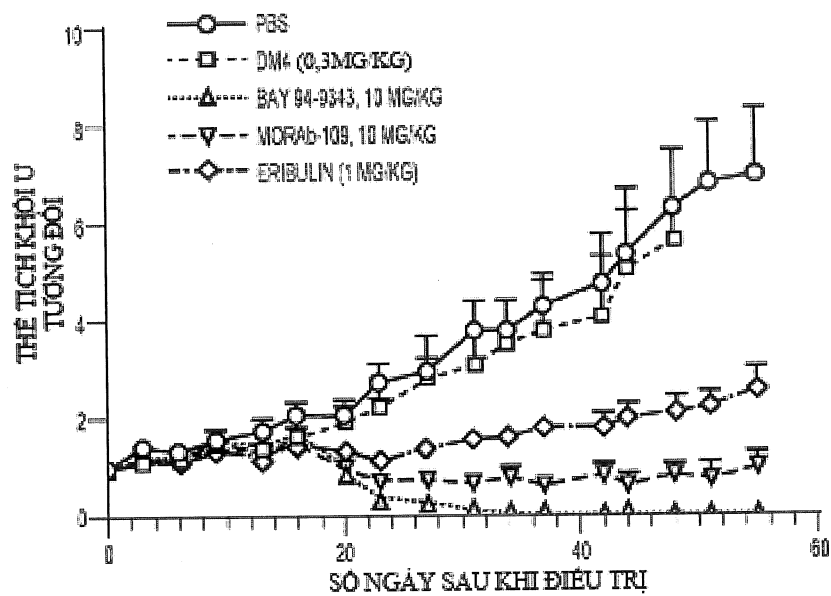




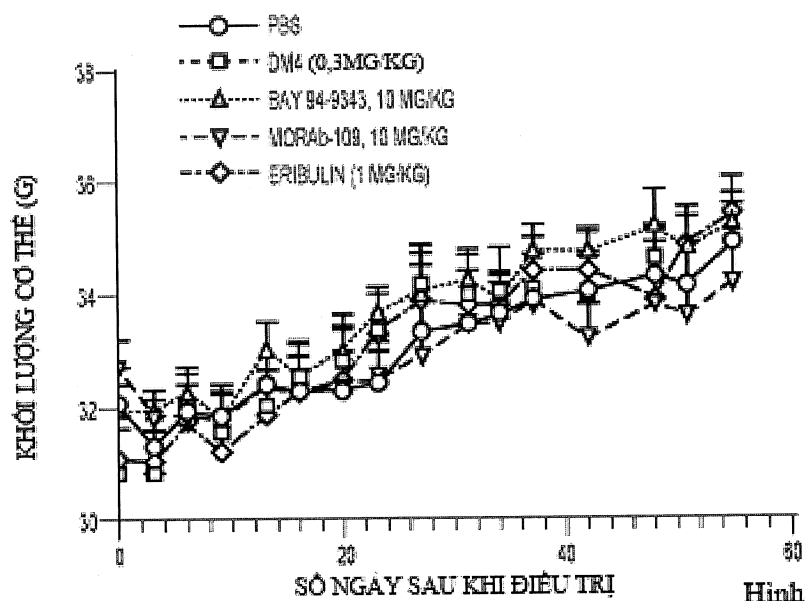
Hình 29A



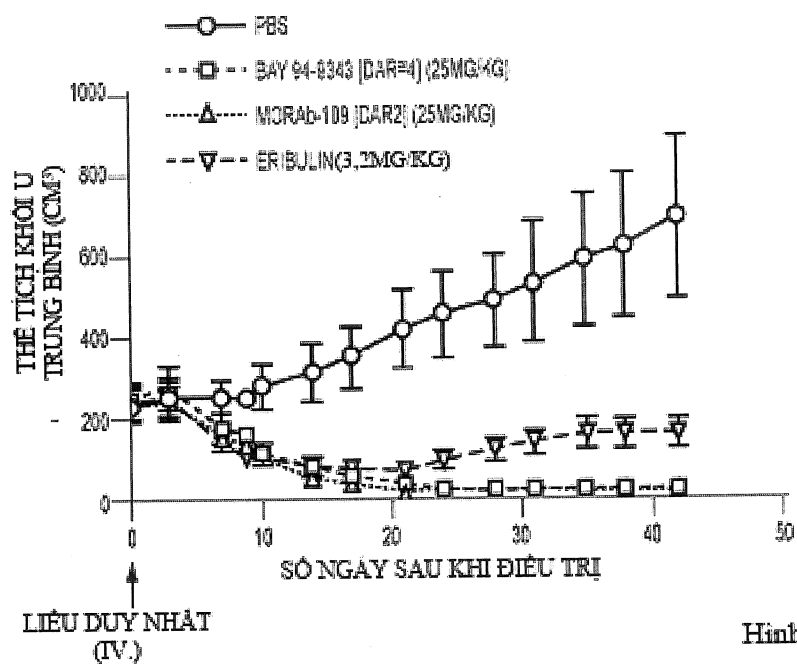
Hình 29B



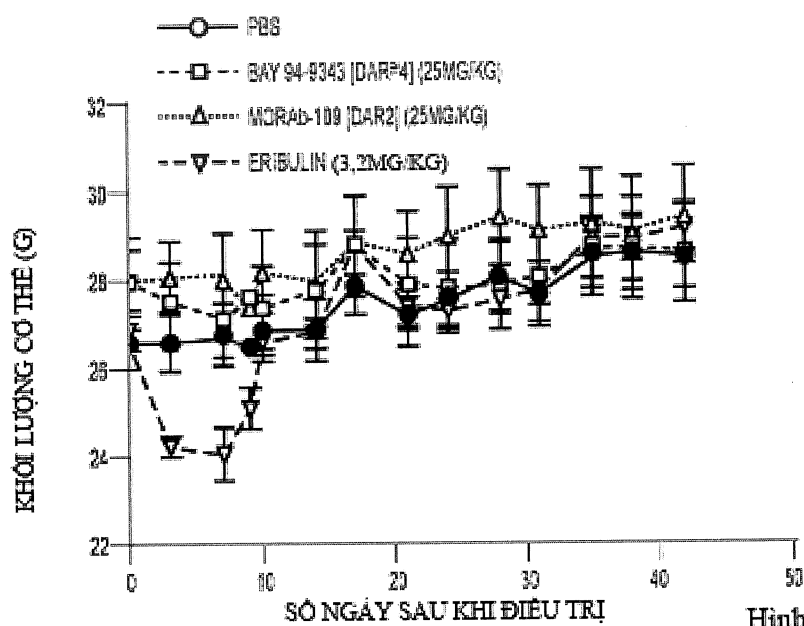
Hình 30A



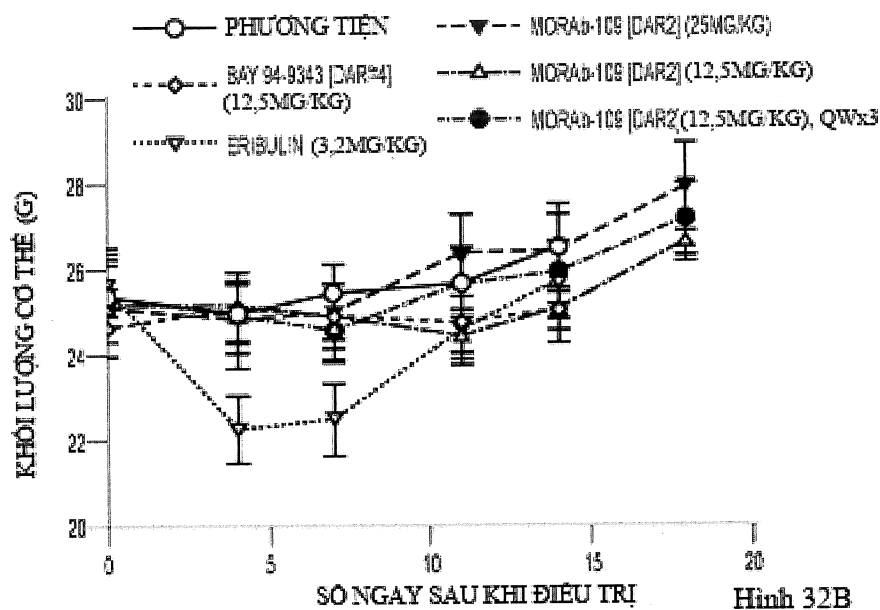
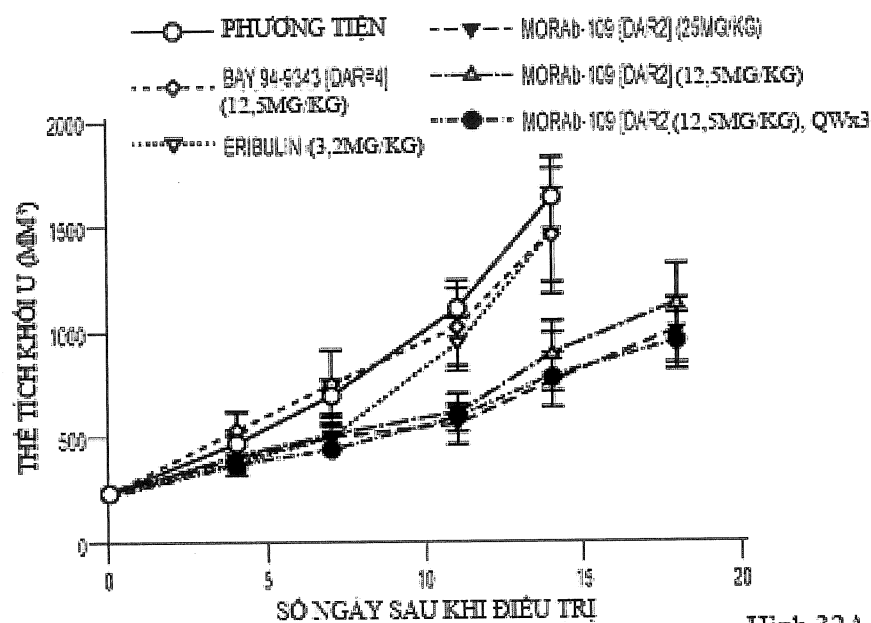
Hình 30B



Hình 31A



Hình 31B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> CÁC THỂ LIÊN HỢP THUỐC-KHÁNG THỂ ERIBULIN KHÁNG
MESOTHELIN VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG

<130> 08061.0043-00304

<140> PCT/IB2020/000917

<141> 2020-11-06

<150> 62/932,373

<151> 2019-11-07

<160> 54

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 1

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 2

Val Ile Asp Ile Ser Gly Asn Arg Phe Tyr Ala Asp Trp Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 3

Val Asp Ser Arg Ala Trp Gly Pro Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 4

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 5

Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 6

Gln Gln Gly Tyr Thr Arg Ser Asp Val Asp Asn Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 7

Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 8

Ile Asp Ile Ser Gly Asn Arg

1 5

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 9

Ala Arg Val Asp Ser Arg Ala Trp Gly Pro Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 10

Gln Ser Ile Phe Ser Tyr

1 5

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 11

Asp Ala Ser

1

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 12

Gln Gln Gly Tyr Thr Arg Ser Asp Val Asp Asn Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asp Ile Ser Gly Asn Arg Phe Tyr Ala Asp Trp Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Asp Ser Arg Ala Trp Gly Pro Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 14

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Arg Ser Asp

85 90 95

Val Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 15

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 16

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85

90

95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 17

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr

20

25

30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asp Ile Ser Gly Asn Arg Phe Tyr Ala Asp Trp Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Asp Ser Arg Ala Trp Gly Pro Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg 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> 18

<211> 217

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 18

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Arg Ser Asp

85 90 95

Val Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

115 120 125

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

130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 19

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 19

tcctacgccca tgtcc

15

<210> 20

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 20

gtgatcgaca tctccggcaa ccggttctac gccgactggg tgaagggc

48

<210> 21

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 21

gtggactcta gagcctgggg cccctcaac ctg

33

<210> 22

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 22

caggcctccc agtccatctt ctcctacctg gcc

33

<210> 23

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 23

gacgcctctg atctggcctc c

21

<210> 24

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 24

cagcagggct acaccagatc cgacgtggac aacgcc

36

<210> 25

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 25

ggaatcgacc tgcctecta cgcc 24

<210> 26

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 26

atcgacatct ccggcaaccg g 21

<210> 27

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 27

gccagagtgg actctagagc ctggggcccc ttcaacctg 39

<210> 28

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 28

cagtccatct tctcctac 18

<210> 29

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 29

gacgcctct

9

<210> 30

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 30

cagcagggct acaccagatc cgacgtggac aacgcc

36

<210> 31

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 31

caggtgcagc tgggtggaatc tgggtggcgga gtggtgcagc ctggcagatc cctgagactg 60

tcttggtccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcca tgcctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcgtg atcgacatct ccggcaaccg gttctacgcc 180

gactgggtga agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgtcct ccctgcgggc cgaggatacc gccgtgtact actgcgccag agtggactct 300

agagcctggg gccccttcaa cctgtggggc cagggaacac tcgtgaccgt gtctct 357

<210> 32

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 32

gattaccaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcca cagagtgacc 60

atcacctgtc aggctccca gtccatcttc tctacctgg cctggatatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gcctctgac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcacggac ttacctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagcag ggctacacca gatccgacgt ggacaacgcc 300

tttggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa 330

<210> 33

<211> 993

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 33

gcatccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120

tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttggt acaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360

ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacccc tcatgatctc ccggaccct 420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttaactgg 480

tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840

ctggactccg acggctcctt ctcttatat tcaaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtcttc c atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa tga 993

<210> 34

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 34

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag 300

agcttcaaca ggggagagtg ttga

324

<210> 35

<211> 1350

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 35

caggtgcagc tgggtgaatc tgggtggcgga gtggtgcagc ctggcagatc cctgagactg 60

tcttgtccg cctccggaat cgacctgtcc tctacgcca tgtctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcgtg atcgacatct ccggcaaccg gttctacgcc 180

gactgggtga agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgtcct ccctgctgggc cgaggatacc gccgtgtact actgcgccag agtggactct 300

agagcctggg gccccttcaa cctgtggggc cagggaacac tcgtgaccgt gtcctctgca 360

tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcaccctct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcgggcc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtaga aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactct ggggggaccg 720

tcagtcttc ttttcccc aaaccaag gacacctca tgatctccg gacctgag 780

gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccg gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtga aggtctcaa caaagccct ccagcccca tcgagaaaac catctccaa 1020

gcaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatccc ggtgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccagcc tccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cttatattca aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350

<210> 36

<211> 654

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 36

gattaccaga tgaccacgac cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcca cagagtgacc 60

atcacctgtc aggctccca gtccatcttc tctacctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gcctctgac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttacctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagcag ggctacacca gatccgacgt ggacaacgcc 300

tttggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 37

tyctcctggt crctsygctc

20

<210> 38

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 38

ttggtgttgg tggctgggtg

20

<210> 39

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 39

gggccccac tcagctgctg

20

<210> 40

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Môi tổng hợp"

<400> 40

gttb tactgk tmtygatgcc

20

<210> 41

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Môi tổng hợp"

<400> 41

tyctcctggt crctsygctc

20

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 42

ttggtgttgg tggctgggtg

20

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 43

actcagctgc tggggctcct

20

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 44

gttb tactgk tmtygatgcc

20

<210> 45

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 45

ttggtgttggtg tggctgggtg

20

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Môi tổng hợp"

<400> 46

gttb tactgk tmtygatgcc

20

<210> 47

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Môi tổng hợp"

<400> 47

gccaccggcg tgcactccca gtcgytggag gaggccgggg g

41

<210> 48

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 48

gggcccttgg tggatgctga rgagacrgtg acsaggggtsc c

41

<210> 49

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Mỗi tổng hợp"

<400> 49

gccaccggcg tgcactccgc ctatgatatg acccagactc ca

42

<210> 50

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Môi tổng hợp"

<400> 50

agccacagtt cgttgacsa ccacctcggc ccc

33

<210> 51

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 51

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Asp Pro Gly Asp Ser Arg Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gln Leu Tyr Gly Gly Thr Tyr Met Asp Gly Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325

330

335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340

345

350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355

360

365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370

375

380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385

390

395

400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405

410

415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420

425

430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

445

Gly Lys

450

<210> 52

<211> 1350

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 52

caggttgaac tgggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaagc ctggcgagag cctgaagatc 60

agctgcaaag gcagcggcta cagcttcacc agctattgga tcggctgggt tcgacaggcc 120

cctggcaaag gactggaatg gatgggaatc atcgaccccg gcgacagcag aaccagatac 180

agccctagct ttcagggcca agtgaccatc agcgccgaca agagcatcag cacagcctac 240

ctgcagtggc ctagcctgaa agccagcgac accgccatgt actattgtgc cagaggccag 300

ctgtacggcg gcacctatat ggatggatgg ggccagggca cactgggtcac agtgtctagc 360

gcctctacaa agggccctag cgttttccca ctggctccta gcagcaagag cacatctggt 420

ggaacagccg ctctgggctg cctggtaag gattacttcc ctgagcctgt gaccgtgtcc 480

tggaatagcg gagcactgac aagcggcgtg cacacatttc cagctgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ctctgtctag cgtcgtgaca gtgcctagca gctctctggg caccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcctagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc 660

aagagctgcg acaagacca cacctgtcct ccatgtcttg ctccagaact gctcggcgga 720

ccctccgttt tctgtttcc acctaagcct aaggacacc tgatgatcag caggaccct 780

gaagtgcct gtgtgggtgt ggatgtgtcc cagaggacc cagaagtga gttcaattgg 840

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ctagagagga acagtacaac 900

agcacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa 960

gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgcctgctc ctatcgagaa aaccatcagc 1020

aaggccaagg gccagccaag agaaccacag gtttacacac tgctccaag caggacgag 1080

ctgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgc ctgctgaagg gcttctaccc ttccgatata 1140

gccgtggaat gggagagcaa tggccagcct gagaacaact acaagacaac ccctcctgtg 1200

ctggacagcg acgggtcatt cttctgttac agcaagctga cagtggacaa gtccagatgg 1260

cagcagggca acgtgttcag ctgttctgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccaactacacc 1320

cagaaaagcc tgtctctgag ccccggaata 1350

<210> 53

<211> 217

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 53

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Asp Ile Glu

85 90 95

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

100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val

145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

215

<210> 54

<211> 651

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp"

<400> 54

gatattgctc tgacacagcc tgccagcgtg tccggatctc ctggccagag catcacaatc 60

agctgtaccg gcacaagcag cgacatcggc ggctacaata gcgtgtcctg gtatcagcag 120

caccccggaaggccctaa gctgatgatac tacggcgtga acaacagacc cagcggcgtg 180

tccaatagat tcagcggcag caagagcggc aataccgcct ctctgacaat tagcggactg 240

caggccgagg acgaggccga ttactactgc agcagctacg acatcgagag cgccacacct 300

gtgtttggcg gcggaacaaa actgacagtg ctgggccaac ctaaggccgc tcctagcggtt 360

acactgttcc cacctagcag cgaggaactg caggctaaca aggccacact cgtgtgcctg 420

atcagcgatt ttaccctgg cgccgtgaca gtggcctgga aaggcgatag ttctcctgtg 480

aaggccggcg tggaaaccac cacacctagc aagcagagca acaacaaata cgccgccagc 540

tcctacctga gcctgacacc tgagcagtgg aagtcccaca gatctacag ctgccaagtg 600

accacgagg gcagcaccgt ggaaaaaaca gtggccccta ccgagtgcag c 651